

# A parlagi sas genetikai változatossága

Vili Nóra, Kalmár Lajos, Kovács Szilvia és Horváth Márton

## Genetikai vizsgálatok a természetvédelmi biológiában

Az elmúlt évtizedekben egyértelműen bebizonyosodott, hogy a veszélyeztetett fajok hatékony védelméhez elengedhetetlen az adott faj biológiájának minél pontosabb ismerete. A veszélyeztetett fajok megőrzéséhez szükséges védelmi intézkedések megtervezéséhez tisztában kell lennünk viselkedésükkel, táplálkozási, fészkelőhely- és párvalasztási szokásaikkal, mekkora területet igényelnek, mennyire tűrik az emberi zavarást (Curio 1996). Az ilyen jellegű vizsgálatok eredményeit jelentősen növeli, ha lehetőség van az egyedek azonosítására, főleg ha azok sorsát akár több éven át is nyomon tudjuk követni (Taberlet & Luikart 1999).

A példányok azonosítására sokféle módszer alkalmas: egyéni jellegzetességek keresése, krotáliák felhelyezése, szőrzet vagy tollazat festése (Nunes et al. 2000), illetve madaraknál a régóta használt gyűrűzés. Egyre gyakoribb a rádiós (Webb & Shine 1997) és a műholdas nyomkövetés (Meyburg et al. 1995). A legtöbb technikának azonban komoly hátránya, hogy használatuk jelentős költségeket igényel (pl. műholdas rendszerek), a jelölések befolyásolhatják az állatok viselkedését, szaporodási képességét (pl. tollazatfestés), vagy alacsony a megkerülési ráta (pl. madárgyűrűzés). Ezek a hátrányok általában ahhoz vezetnek, hogy az ilyen jellegű vizsgálatok kis mintaszámmal tudnak dolgozni és jelentős költségeket igényelnek.

A molekuláris technikák fejlődésével a genetikai módszerek is alkalmassá váltak az egyedek azonosítására (Morin et al. 1994), ezek jelenleg is folyamatosan bővülnek és egyre biztonságosabbá válnak. Mára már hagyományosnak nevezhető az RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) és RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), miközben terjednek a modernebb módszerek, mint a direkt szekvenálás, illetve a DNS-ujjlenyomat készítése mini- és mikroszatelliták vizsgálata alapján (Sunnucks 2000).

Az így nyert adatok alkalmasak arra is, hogy jelölés-vizszo-fogásos vizsgálatokat végezhessünk a populációkon, hiszen a DNS-profil egyedi jelölésnek tekinthető, és az adott populációból évről évre standard módon lehet mintákat venni. Ezzel a módszerrel a populáció máshogy nehezen becsülhető paramétereit tudjuk lemérni (pl. egyedszám, mortalitás, migráció).

A molekuláris genetikai módszerek mellett elengedhetetlenek a veszélyeztetett fajok hatékony védelmében is, mivel ezek segítségével gyorsan és pontosan megállapíthatjuk a különböző populációk genetikai polimorfizmusát és a populációk közötti génáramlás mértékét. Ha kis populációk egymástól távol helyezkednek el, és nem jön létre közöttük migráció és génáramlás, akkor genetikailag izolálódnak, és felbomlik a dinamikus metapopulációs szerkezet, ami természetvédelmi szempontból rendkívül hátrányos (Standovár & Primack 2001). A genetikai állapot minél pontosabb ismerete a súlyosan veszélyeztetett fajok populációiban jelentősen segítheti a hatékony fajvédelmi munkát, hiszen a populációs szerkezet (génáramlás, metapopulációk, genetikai sodródás) alapvetően meghatározza a fajok túlélési esélyeit, és így befolyásolhatja az alkalmazandó védelmi stratégiát is. A mitokondriális DNS kontrollrégióját számos gerinces fajnál használták már fajon belüli populációs összehasonlításokra (Rawlings et al. 2002, Li et al. 2004, Martínez-Cruz et al. 2004).

## A parlagi sas természetvédelmi helyzete a Kárpát-medencében

A parlagi sas számos nemzetközi természetvédelmi egyezményben kiemelt helyen szerepel. Az IUCN (International Union for Conservation of Nature) vörös listáján a „sebezhető” kategóriába tartozik, világgállománya mindössze 2000–3000 párra tehető. Magyarországon fokozottan védett, természetvédelmi értéke egymillió forint.

A faj elterjedési területe Közép- és Délkelet-Európától egészen Közép-Ázsiáig húzódik. Európában jelenleg három, többé-kevésbé elszigetelődött populációt különböztethetünk meg: a Kárpát-medenceit, a Balkán-félszigetet és a kelet-európai-síkságot. Az ázsiai területen élő parlagisaspopulációk Kis-Ázsiában, a Kaukázusban, Nyugat-Ázsiában (Kazahsztánban, Oroszország) és a Távols-Keleten (Oroszország Bajkál-tó környéki területei) találhatóak (Horváth et al. 2002).

A magyarországi állomány a 20. század közepére jelentősen lecsökkent (mindössze 15–25 párra), majd az 1990-es évek elején számuk emelkedésnek indult, valószínűleg a mezőgazdasági művelésben bekövetkezett változásoknak és az aktív fajvédelmi munkáknak köszönhetően (Bagyura et al. 2002). Hazánkban két élőhelytípusban fészkel: középhegységi erdőkben, illetve síkvidéki fasorokban, magányos fán. A hegyvidéki állomány létszáma viszonylag állandó, míg síkvidéken az 1989-es megjelenésük óta mind a mai napig folyamatos egyedszám-növekedés tapasztalható. Jelenlegi hazai költőállománya 80–85 pár, melynek már háromnegyed része síkvidéki mezőgazdasági környezetben fészkel.

A Kárpát-medencében költő öreg madarak állandóak, a költőterület közelében telelnek, a fiatal madarak ivaréretükig a Kárpát-medencében (elsősorban a magyar Alföldön), valamint Délkelet-Európában és a Közel-Keleten kóborolnak. Az 500 km-re délre található balkáni populációból több gyűrűzési megkerülés is volt, de ezek mind telelő fiatalokra vonatkoztak, a költő madarak migrációját a két populáció között nem figyelték meg. A másik szomszédos populáció legközelebbi állománya 900 km-re keletre, Ukrajnában található, amellyel közvetlen kapcsolat nem ismert, de az innen származó fiatal madarak a Kárpát-medencei fiatalokkal közös telelőterületet használhatnak a Közel-Keleten és Kelet-Afrikában.

A Kárpát-medencén belüli szubpopulációk közti távolság a parlagi sas diszperziós képességéhez mérten kicsi, azonban a szomszédos populációktól való távolság már jelentős gátat szabhat a génáramlásnak, így feltételezzük, hogy a Kárpát-medencében egy önálló és egységes populáció él. A Kárpát-medencei populáció belső genetikai struktúrájának (szubpopulációk elkülönülése, madarak egyedi azonosítása és nyomon követése), a szomszédos populációkkal való kapcsolatának (metapopulációs rendszer, génáramlás), valamint a korábbi kis populációméretből adódó jellegzetességek (beltenyésztődés, genetikai sodródás) vizsgálatára kezdtük el populációgenetikai kutatásainkat (Horváth et al. 2005, Vili et al. 2005).

## Módszerek

### Mintavétel

A DNS vizsgálatához szükséges minták begyűjtése gyakran okoz nehézséget. A veszélyeztetett fajoknál különösen fontos, hogy a mintavételi eljárás egyáltalán ne, vagy csak

minimális hatással legyen az állatokra, emellett sok esetben technikailag sem lenne megoldható a megfelelő számú állat befogása (Taberlet et al. 1999, Taberlet & Luikart 1999). A rendelkezésre álló módszereket az irodalom három csoportba sorolja. A destruktív mintavételt gerinctelen szervezetek vizsgálatánál alkalmazzák, ennek során a teljes egyedtet felhasználják. Ennél kevésbé drasztikus megoldást jelentenek a nemdestruktív mintavételi módszerek, amilyen a vérvétel vagy az ujjpercek lecsípése. Az ilyen eljárások során a vizsgálni kívánt állatok nagy valószínűséggel túlélnek, de jelentős stresszt kell elviselniük. A legkevésbé zavaró módszerek a neminvazív kategóriába taroznak. Ezeknél a technikáknál az állatok távollétében lehet a mintákhoz jutni, olyan általuk hátrahagyott nyomokból, mint a szőr, toll, nyál, ürülék. A módszer hátránya, hogy ilyen esetekben nem mindig megfelelő a DNS minősége és mennyisége, így a minták nagy része nem ad használható eredményt, emellett jelentősen megnőhetnek a laborköltségek.

Madarak esetén eddig a tollszár pulpáját, illetve bazális hegyét használták forrásként a DNS-kivonáshoz, de ennél az eljárásnál a megbízható eredményhez egy egyedtetől több, lehetőleg friss tollra van szükség (Taberlet & Bouvet 1991), vagy mintánként mérni kell, hogy megfelelő-e a DNS-koncentráció az analízisekhez. Egy nemrégiben közölt módszer segítségével egyetlen levedlett tollból is elegendő mennyiségű DNS-hez lehet jutni (Horváth et al. 2005). A tollszárban található magvas vörösvérsejteket tartalmazó vérrögéből kivont DNS elég a mikroszatellitákon alapuló DNS-ujjlenyomat meghatározásához, illetve mitokondriális DNS-szakaszok szekvenálásához.

A vizsgálatok során felhasznált vedlett parlagisas-tollakat a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlagisas-védelmi Munkacsoportja gyűjtötte be 1997 és 2007 között. A tollakat a fokozottan védett madarak zavarása nélkül, viszonylag egyszerűen és nagy hatékonysággal be lehet gyűjteni a fészkek, illetve a rendszeresen használt kiülőfák közeléből. Ez lehetőséget nyújt nagyságrendekkel nagyobb mintaszám feldolgozására az – egyébként természetvédelmi szempontból is aggályosnak tekintett – invazív mintavételi eljárásokhoz képest. A tollak az időjárástól és a vedlés óta eltelt időtől függően ép, vagy kevésbé jó állapotban maradnak meg. A tapasztaltak alapján a vedlés után néhány hónap alatt erőteljes bomlásnak indulnak, így annak a valószínűsége minimális, hogy adott évben az előző évből származó jó minőségű, feldolgozásra alkalmas tollat lehessen találni.

Emellett feldolgozásra került 127 vérminta, amelyet a Szlovák Ragadozómadár-védelmi Egyesület (RPS) gyűjtött be 2004 és 2006 között szlovákiai parlagi sas fiókákból IsoCode STIX™ papírra.

### Preparálás

A tollakon található egy felső köldöknek (superior umbilicus) nevezett rész, ahol a tollat a fejlődése során tápláló artéria a cséve külső felszínére lép. Mire befejeződik a fejlődés

dés, ez az ér visszahúzódik, de az átlépés helyén visszamarad egy kis vérrög. A vizsgálatokhoz szükséges DNS nagyrészt ebből a vérrögből származik. Az emlősökkel összehasonlítva a madarak véreből több DNS nyerhető ki, mivel vörösvérsejtjeik is magvasak.

A felső köldök szikepengéjével kerül eltávolításra a toll szárából (1. ábra). A preparálások során minden mintánál steril pengét és gumikesztyűt kell használni, valamint ki kell cserélni a papír alátétet, amelyen a preparálás folyt, a minták keresztkontaminációjának elkerülése érdekében (Horváth et al. 2005).

A preparálást követően a minták  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, fagyasztóban tárolandók, és a lehető legrövidebb időn (általában 1 hónapon) belül feldolgozásra kell kerülniük.

### DNS-kivonás

A DNS-kivonás módosított kisózásos protokollal történik (Gemmel & Akiyama 1998), melyben első lépésként a kivágott darabok egy éjszakán keresztül ( $55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben) enzimes (Proteináz-K-s) emésztésnek vannak kitéve.

A következő lépés a maradék peptidek eltávolítása, majd a tisztítás kloroform-izoamilalkoholos (24:1 arányú) kirázással folytatódik. A DNS tömény etanol hozzáadásával csapható ki, majd 70%-os etanolos rehidráció után megfelelő tárolóoldatban kell felvenni (Tris-EDTA puffer). A kivont DNS mennyisége és minősége 0,8%-os agarózgélben való futtatással ellenőrizhető.

Vérminták esetében a gyártó által mellékelte protokoll alapján dolgoztunk.

### Ivarmeghatározás

A parlagi sasoknál nincs látványos ivari dimorfizmus, csupán a testméretükben figyelhető meg kismértékű eltérés (a tojó mintegy 5–10%-kal nagyobb méretű), de így terepen, illetve a vedlett tollakból morfológia alapján csak ritkán lehet egyértelműen ivarmeghatározást végezni. A vizsgálatunkban alkalmazott módszer PCR-en alapul, így nagyon kis mennyiségű DNS-ből is működik.

A madaraknál a tojó a heterogametikus ivar (WZ ivari kromoszómák) és a hím a homogametikus (ZZ), tehát a



1. ábra  
Tollakból történő DNS-kivonáshoz kiproparált felső köldökrész a beszáradt érszakasszal

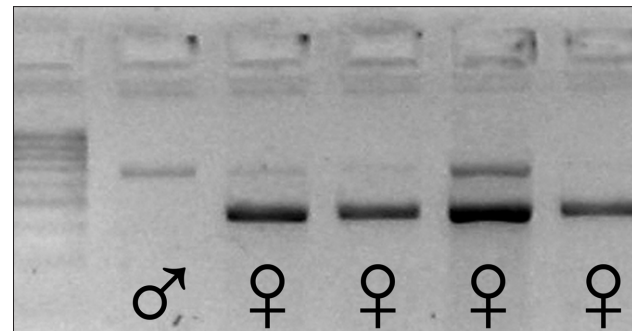
W kromoszómát, vagy annak szekvenciáit kell keresni, és elkülöníteni az ivarmeghatározás során. Az elmúlt évtizedben fedezték fel az első W-hez kötődő gént madarakban (Griffiths & Tiwari 1995), ami a kromo-helikáz DNS-kötő fehérje kódolásáért felel, és a legtöbb fajra jellemző. Mivel nagyon hasonlít az emberi CHD1 gének közül a CHD1-hez, a CHD1W nevet kapta.

A CHD1W-nek van egy nem a W kromoszómához kötődő változata (szintén a legtöbb fajnál), mégpedig a Z kromoszómán. Mivel egyrészt a CHD1 gének az ivari kromoszómák rekombinálandó pszeudoautoszomális régióin kívül helyeződnek, a CHD1W csak tojókra jellemző, másrészt mindkét gén nagyon konzervatív, így alkalmasak lehetnek az ivarok azonosítására (Fridolfsson & Ellegren 1999). A CHD1 géne irányuló specifikus PCR eredményeképpen parlagi sasnál mindkét nem esetében amplifikálható egy mintegy 700 bázispár hosszú termék, míg tojóknál egy további 450 bázispár hosszúságú szakasz készül a CHD1W génről (Horváth et al. 2005). A géntváltozatok méretében jelentkező 250 bázispáros különbség agarózgélben történő futtatással jól kimutatható (2. ábra).

### Mikroszatellita fragmensanalízis

A mikroszatelliták a nukleáris DNS nem kódoló régióiban található di-, tri-, illetve tetranukleotid-ismétlődések, amelyek szerepe jelenleg nem ismert. Valószínűleg nincs genetikai információtartalmuk, ezért szelekciós nyomás sem hat rájuk. Mivel a DNS-polimeráz enzim a hosszú ismétlődések miatt gyakran ejt hibát ezen szakaszok másolásakor, magas polimorfizmust mutatnak. Több ilyen szakaszt vizsgálva, a bázispárokból megadott hosszuk egyedre jellemző mintázatot ad, így egyedi azonosításra használhatjuk őket (DNS-ujjlenyomat, DNS-profil).

A mikroszatellita fragmensek analízise fluoreszcens kapilláris-elektroforézissel történik. Ez nagyobb felbontást tesz lehetővé, mint a poliakrilamid- vagy agarózgélben történő futtatás, és nagyobb mintaszámnál is kényelmesen alkalmazható, ugyanis könnyen automatizálható. A hosszokat a program ismert molekulaméretű markerhez (ún. molekuláris létrához) viszonyítva számítja ki, ami meghatározott fragmenshosszoknál jól elkülönülő jelet ad, így le-



2. ábra  
Az ivarmeghatározásra irányuló PCR termékei

hetővé teszi a különböző időpontokban feldolgozott minták pontos összehasonlítását is. (3. ábra)

A parlagi sasnál ez ideig 18 dinukleotid (Martínez-Cruz et al. 2002), illetve 8 tetranukleotid (Busch et al. 2005) polimorf lokuszt azonosítottak.

### A mitokondriális DNS kontrollrégiójának szekvenenciaanalízise

A mitokondriális DNS (mtDNS) kontrollrégiója egy közel egy kilobázis hosszúságú szakasz, amely a transzkripciót és a replikációt szabályozza. A csak anyai ágon öröklődő mtDNS nem tartalmaz replikációs javító rendszert, ezért a mutációs rátája átlagosan magasabb, mint a nukleáris DNS kódoló szakaszainak, azonban a mikroszatelliták rátájánál alacsonyabb. Így az azonos fajba tartozó egyedek mtDNS szekvenciájában fellelhető különbségek kevésbé alkalmasak egyedi azonosításra, viszont az egy fajhoz tartozó egyedek populációinak összehasonlítására jól használhatók.

A mtDNS kontrollrégiójának szekvenálására az AID1-Fbox primer-pár (Martínez-Cruz et al. 2004, Godoy et al. 2004) által meghatározott, a hipervariábilis részt tartalmazó 345 bázispár hosszúságú amplifikált szakasza használható. A módszer segítségével pontosan meghatározható a kontrollrégió bázissorrendje, majd a benne található 13 polimorf hely által meghatározható az egyed haplotípusa (Martínez-Cruz et al. 2004).

## Eredmények

### DNS-kivonás sikeressége és a minták ivareloszlása

A hazai kutatócsoport eddigi munkája során 615 minta (488 vedlett toll és 127 vérminta) feldolgozását kezdte el, az esetek 94,6%-ában sikerült használható mennyiségű és minőségű DNS-hez jutni. A DNS-kivonás hatékonysága szignifikánsan nem különbözött a vedlett tollak (94,6%) és a szlovák fiókák vérmintái (98,4%) között (Chi-négyzet próba,  $p$  érték=0,785). Ez az eredmény alátámasztja mindkét mintavételi módszer eredményességét és az ilyen vizsgálatokban való alkalmazhatóságát.

A munka során a következő lépés volt az egyes madarak ivarának meghatározása. A PCR-reakciók 92,7%-a adott értékelhető eredményt. Az ivarmeghatározás hatékonysága szignifikánsan nem különbözött a vedlett tollak (90,1%) és a szlovák fiókák vérmintái (98,4%) között (Chi-négyzet próba,  $p$  érték=0,5455). A vizsgált vedlett tollminták 87,1%-a származott tojóktól és csupán 12,9%-a hímeiktől. Ezt a szignifikáns eltérést (Chi-négyzet próba,  $p$  érték < 0,0001) valószínűleg az okozza, hogy a tollakat legnagyobb számban a fészkek alatt lehet megtalálni, és itt a tojók lényegesen több időt töltenek, mint a hímek. Utóbbiak főleg a kiülőfák környékén tartózkodnak, de ezek a helyek kevés esetben ismertek. A fiókák esetén a tojó-hím ivararány 61:65

volt, amely nem különbözött szignifikánsan az 1:1 ivararány eloszlástól (Chi-négyzet próba,  $p$  érték=0,7216).

### Egyedek azonosítása

A mikroszatellita fragmensanalízisek során 172 egyed DNS-profilja készült el. A 38 hazai madártól származó minta 9 dinukleotid, míg a szlovák populációból származó 134 minta 8 tetranukleotid mikroszatellita fragmensanalízise alapján került elemzésre. Egyelőre a hazai és a szlovák madarak eredményei nem összevethetők, mivel a dinukleotidok és tetranukleotidok alapján készült DNS-profilok nem hasonlíthatók össze.

### Hazai minták

A vizsgálatok első körében 17 olyan magyarországi területre került kiválasztásra, ahonnan 2002-ből és 2003-ból is rendelkezésre állt megfelelő minőségű tollminta (Vili et al. 2005). A vizsgált területek közül 15-ből csak a tojóktól, kettőből csak a hímeiktől és egyből a pár mindkét tagjától származtak értékelhető minták. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy négy területen történt váltás, amikor is 3 tojó és 1 hím nem volt azonos a két évben, így az éves kicserélődési ráta 22%-os volt.

### A szlovák minták

A Szlovákiából kapott minták döntő többsége fióktól származott (126 egyed, három egymást követő évből), sajnos a tollak többsége nem volt elég jó állapotú a fragmensanalízishez. Érdekes ugyanakkor, hogy az ivarmeghatározás ezen minták legtöbbszörénél sikeres volt. Ezért egyelőre az eredetileg tervezett jelölés-visszafogásos elemzést nem lehetett elvégezni, azonban szülő-utód, illetve testvérek azonosítása több esetben lehetséges volt (szülő-utód párt 2 esetben, testvéreket 4 esetben). A molekuláris variancia elemzése alapján az egymástól mintegy 150 km távolságra található kelet- és nyugat-szlovákiai állományt genetikai szempontból egységesnek lehet tekinteni (AMOVA,  $RST=0,014$ ,  $p$  érték=0,065).

### Populációs szerkezet

A mitokondriális DNS kontrollrégiójának szekvenenciaanalízise 20 Kárpát-medencei madár mintája alapján történt meg, melyek magyarországi fészkelőhelyekről (16) és a Hortobágyi Nemzeti Park górési ragadozómadár-telepéről (2) gyűjtött tollakból, továbbá két szlovákiai fióka vérmintájából származtak.

A 13 publikált polimorf lokusz közül a 20 Kárpát-medencei madárban négy volt polimorf (a 45. bázispárnál, a 96. bázispárnál, a 118. bázispárnál és a 227. bázispárnál lévő). A négy polimorf lokusz pedig négy különböző hap-

lotípust határozott meg (E: 40%, G: 15%, K: 30%, L: 15%). A Kárpát-medencei populációban kettő, eddig még nem publikált haplotípust is sikerült azonosítani, még hozzá elég nagy gyakoriságokkal (K: 30% és L: 15%). Az új haplotípusok ismeretében felvázolható volt a haplotípusok legvalószínűbb törzsfája (4. ábra). A 16 hazai költőterritórium vizsgálatok az L haplotípus csak a mátrai régióban volt megtalálható. A K haplotípus a Zempléni-hegységben nagyobb gyakorisággal (57,1%) fordult elő, mint a Hevesi-síkon (14,3%). A Hevesi-sík territóriumában az E haplotípus gyakorisága 57,1%, a Zempléni-hegységben pedig 28,6% volt. A G haplotípus 28,6%-os gyakorisággal fordult elő a Hevesi-síkon és 14,3%-os gyakorisággal a Zempléni-hegységben.

A kapott szekvenciák haplotípusát összehasonlítva egy északnyugat-kazahsztáni stabil populáció már publikált eredményeivel (Martínez-Cruz et al. 2004) meghatározhatók a két populáció genetikai összetételében lévő különbségek. Az északnyugat-kazahsztáni populációban négy különböző haplotípust találtak (D: 50%, E: 40%, F: 5%, G: 5%) öt polimorf lokusszal (a 96. bázispárnál, a 118. bázispárnál, a 134. bázispárnál, a 219. bázispárnál és a 227. bázispárnál lévő). A kazahsztáni és a Kárpát-medencei populáció haplotípus-megoszlásai között szignifikáns különbség észlelhető (Fisher-féle egzakt teszt,  $p$ -érték < 0,001,  $N_1=20$ ,  $N_2=20$ ) (5. ábra). A két populáció haplotípus-variabilitása is szignifikánsan eltér (Mann-Whitney-féle  $U$ -teszt,  $V=36$ ,  $p$ -érték < 0,001,  $N_1=20$ ,  $N_2=20$ ). Az AMOVA (molekuláris-variancia-elemzés) eredménye alapján a fixációs index szignifikáns genetikai izoláltságot mutatott ki a két populáció között ( $\Phi_{PT}=0,3936$ ,  $p$ -érték = 0,0001). A haplotípus és nukleotid diverzitási indexek nagyobbak voltak a Kárpát-medencei populációban. Eredményeink alapján a két populáció

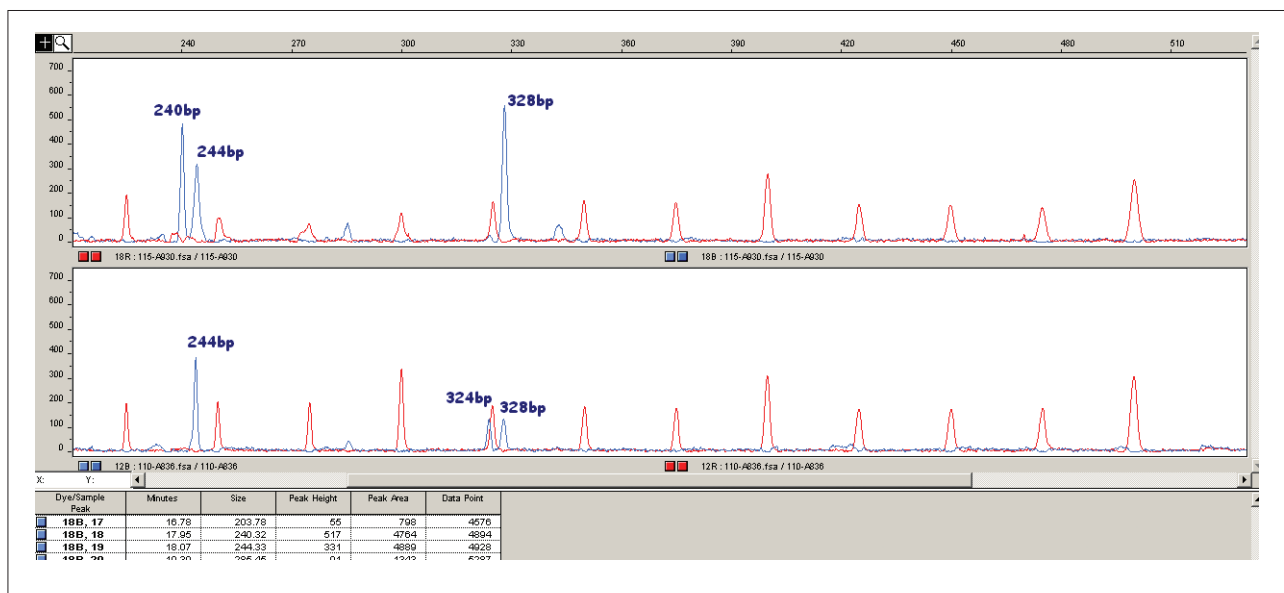
genetikailag izolálódott egymástól, és a Kárpát-medencei populáció genetikai diverzitása nagyobb.

## Következtetések

### A parlagi sas példányok genetikai azonosítása

A hazai populáció esetében a kis mintaszám ellenére is mindenképpen figyelemre méltó, hogy hímeknél 30% körüli, tojóknál 20% volt a madarak kicserélődési rátája egyik évről a másikra egy adott territóriumban. Egy esetben sem figyelhető meg átmozdulás a territóriumok között, és az eddigi madárgyűrűzési adatok alapján csekély az esély a madarak elvándorlására egy másik populációba (a legközelebbi életképes populációk mintegy 500 km-re vannak), így a további vizsgálatok során várható, hogy a madarak kicserélődési rátája túlnyomórészt a költő madarak mortalitásával lesz arányos. A hazai állományban tapasztalt arányhoz hasonló mértékű (16%-os) kicserélődési arányról számolnak be északnyugat-kazahsztánban is (Rudnick et al. 2005). Amennyiben nagyobb mintaszámmal is hasonló kicserélődési arány tapasztalható, akkor az alapjaiban változtatná meg a Kárpát-medencei parlagisas-populáció dinamikájáról kialakult képet. Egy ilyen éves mortalitási arány a költő madaraknál, egy ilyen hosszú életű faj esetében (természetes életkorra bizonyítottan meghaladhatja a 26 évet is) rendkívül magasnak számítana (vö. pl. 6% az ibériai sasnál, Ferrer 2001).

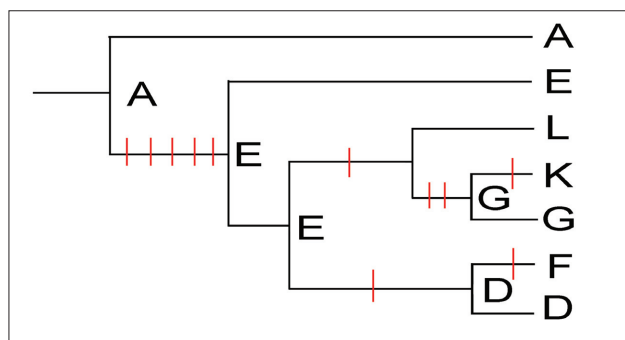
A szlovák fiókkák vér-, és a magyar fiókkák tollmintái, valamint a költő madarak vedlett tollai alapján jelenleg is folyamatosan bővülő „Kárpát-medencei parlagi sas DNS-ujjlenyomat adatbázis” megalapozza a jelölés-visszafogásos vizsgálatok nagy, több száz mintaszámon alapuló jövőbeli alkalmazását.



3. ábra

Két különböző egyed DNS-profilja (tetranukleotidok alapján, az azonos színű festékkel jelölt fragmensek láthatóak).

- egyed: A: lokusz heterozigóta (240–244 bp), B: lokusz homozigóta (328 bp);
- egyed: A: lokusz homozigóta (244 bp), B: lokusz heterozigóta (324–328 bp)



4. ábra

A mtDNS kontrollrégiója parlagi sasoknál ismert haplotípusainak legvalószínűbb törzsfája. Az ágvégeken a jelenlegi, a csomópontoknál a feltételezett őshaplotípusok találhatóak, az ágakon lévő piros vonalak a szubsztitúciókat jelölik. A K és az L haplotípusok a Kárpát-medencei populációból kerültek először leírásra

#### A Kárpát-medencei parlagisas-populáció belső genetikai struktúrája

A mikroszatellita fragmensanalízis eredményeiből megállapítható, hogy a kelet- és nyugat-szlovákiai szubpopuláció a viszonylag nagy földrajzi távolság (150 km) ellenére sem tagolódik külön populációkra. Ezt nagy valószínűséggel a velük feltehetően szintén genetikailag egységes magyar állomány segíti elő, amelynek dél felől komoly a „folyosó” szerepe. A hazai szomszédos szubpopulációk gyakorlatilag folytonos állományt alkotnak, amely csak egy régióban szakad meg (Cserhát), de ez sem haladja meg a 60 kilométert.

A Kárpát-medencei populáció mtDNS vizsgálatai során az északi-középhegységi magterületeken lévő territóriumok és az újabb síkvidéki territóriumok (Hevesi-sík) kerültek összehasonlításra. A Kárpát-medencében az egyes szubpopulációk gyakorlatilag folytonosnak tekinthető elhelyezkedése alapján, egy ilyen jó diszperziós képességgel rendelkező fajnál azt várnánk, hogy az állomány keveredése teljes, és egységesnek tekinthető a populáció. A haplotípusok térbeli eloszlása azonban nem teljesen homogén a 16 hazai territórium adata szerint. A kis mintaszám ellenére is az északi-középhegységi régióban nagyobb genetikai polimorfizmus figyelhető meg, amelynek lehetséges oka, hogy a 70-es, 80-as években átélt demográfiai katasztrófa idején egyedül ezeken a magterületeken maradtak fent költő párok. Így itt jelenleg is megtalálható a haplotípusok legnagyobb része, míg a síkvidéki területek későbbi visszahódításakor nem feltétlenül jutott le minden haplotípus. A feltételezés bizonyításához nagyobb mintaszám vizsgálata szükséges.

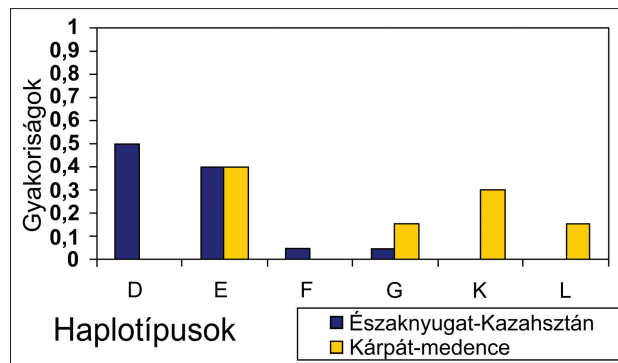
#### A Kárpát-medencei és egy kazahsztáni parlagisas-populáció összehasonlítása

A vizsgálatok harmadik része arra irányul, hogy más populációkkal is összehasonlíthassuk a Kárpát-medencei po-

puláció genetikai helyzetét. Jelen vizsgálatban az északkazahsztáni Naurzum Nemzeti Parkban élő parlagisas-populáció mtDNS-elemzésének adataival történt összehasonlítás. Az érintett mintegy 100 páros populáció a 25 éve tartó monitorozási adatok szerint demográfiaailag stabil (Bragin 1999; Katzner et al. 2006), és a 3000 km-es távolság miatt feltehetően nincs közvetlen kapcsolatban a Kárpát-medencei populációval. A vizsgált kazah populáció jelenleg kisebb méretű a Kárpát-medenceinél (126–139 pár), azonban a hazai állomány a 80-as évek elejére mindössze 15–25 párba csökkent (Haraszthy et al. 1996, Bagyura et al. 2002), és a szlovák populáció sem lehetett nagyobb 10–15 párnál (Danko & Chavko 1996). A hazai állományra (80–85 pár) az elérhető demográfiai adatok alapján kiszámolt effektív populációméret csupán 35 pár, amely jelentős genetikai degradációt eredményezhet. Ezzel ellentétben az északkazahsztáni stabil populációban az effektív populációméret 90 párba becsülhető (Bragin 1999, Katzner et al. 2006). A vizsgált kazah populáció valószínűleg összeköttetésben áll a régióban található jelentős, több száz páros állományokkal, így mindent összevetve a hazai populációban lenne várható alacsonyabb genetikai diverzitás.

A statisztikai elemzések szignifikáns különbséget mutattak ki a két populáció haplotípus-eloszlása között, azonban a várttal ellentétben szignifikánsan nagyobb volt a Kárpát-medencei parlagisas-populáció genetikai variabilitása a kazah populációénál. A kontrollrégió vizsgálata alapján tehát a Kárpát-medencei parlagisas-populációból származó mintákban nagyobb genetikai polimorfizmust találtunk, mint a Naurzum Nemzeti Parkban. A megfigyelt, nem várt eltérést az is okozhatta, hogy a kazah minták egy kisebb, mintegy 4000 km<sup>2</sup>-es, míg a hazai minták egy mintegy 9000 km<sup>2</sup>-es vizsgálati területről származtak. A kiszámolt fixációs index a vártnak megfelelően szignifikáns genetikai izoláltságot mutatott ki a két távoli populáció között.

Összességében elmondható tehát, hogy a Kárpát-medencei populáció a jelenlegi adatok alapján genetikailag megfelelően diverznek tűnik, így remélhetőleg nem kell tartani a genetikai leromlás negatív hatásaitól, a múlt század kedvezőtlen demográfiai változásai ellenére sem.



5. ábra

A mtDNS kontrollrégió egyes haplotípusainak eloszlása a Kárpát-medencei és az északnyugat-kazahsztáni populációban

## Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatban felhasznált hazai vedlett parlagisas-tollak begyűjtését a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) és a nemzeti parkok szakemberei által működtetett Parlagisas-védelmi Munkacsoport, míg a szlovákiai minták begyűjtését a Szlovák Ragadozómadár-védelmi Egyesület (RPS) végezte.

Külön köszönettel tartozunk a SZIE ÁOTK Zoológiai Intézet (dr. Kabai Péter, dr. Hornung Erzsébet és Schrott Anikó), valamint az Országos Gyógyintézet Központ Hematológiai és Immunológiai Intézet Molekuláris Biológiai Laboratórium munkatársainak (dr. Tordai Attila, Andrikovics Hajnalka, Bors András, Szilvási Anikó és Meggyesi Nóra), valamint dr. Harnos Andreának és dr. Zöldág Lászlónak, hogy segítettek a vizsgálat háttérének megteremtésében és a munkák során felmerült nehézségek leküzdésében. Köszönjük továbbá spanyol (Begoña Martínez-

Cruz, Juan José Negro és José Antonio Godoy) és amerikai kollégáink (Tod Katzner, Jamie Ann Rudnick) együttműködését, akik segítségével megalapozta a parlagi sasokon folyó hazai genetikai vizsgálatokat.

A laborvizsgálatokat, illetve a tollak terepi begyűjtését az MME, az RPS, az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) és a Magyar Természettudományi Múzeum (MTM) következő pályázatai finanszírozták 2002 és 2007 között: Európai Bizottság LIFE Nature programja (MME: LIFE02NAT/H/8627, RPS: LIFE03 NAT/SK/00098), Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium (ELTE: K-36-02-0005H, MME: K-36-03-00008T, K-36-04-00008L), Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok – 2004 (MTM: NKFP3-3B023-04).

## Irodalom

- Bagyura, J., Szitta, T., Haraszthy, L., Firmánszky, G., Viszló, L., Kovács, A., Demeter, I. & Horváth, M. (2002): Population increase of imperial eagle (*Aquila heliaca*) in Hungary between 1980 and 2000. *Aquila* **107–108**: 133–144.
- Bragin, E. A. (1999): Status of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Kazakhstan. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Eurasian Conference of the Raptor Research Foundation, Mikulov, Czech Republic, 21–26 September 1999. Buteo (Supplement) 1999*: 51.
- Busch, J. D., Katzner, T. E., Bragin, E. & Keims, P. (2005): Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaetus eagles. *Molecular Ecology Notes* **5**: 39–42.
- Curio, E. (1996): Conservation needs ethology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 260–263.
- Danko, S. (1996): Beringungsergebnisse am Kaiseradler *Aquila heliaca* im Nordwesten des Brutareals. Pp. 389–403. In: Meyburg, B.-U. & Chancellor, R. D. (szerk.): *Eagle Studies*. World Working Group on Birds of Prey (WWGBP), Berlin, London & Paris.
- Danko, S. & Chavko, J. (1996): Breeding of the Imperial Eagle *Aquila heliaca* in Slovakia. Pp. 415–423. In: Meyburg, B.-U. & Chancellor, R. D. (szerk.): *Eagle Studies*. World Working Group on Birds of Prey (WWGBP), Berlin, London & Paris.
- Ferrer, M. (2001): The Spanish Imperial Eagle. Lynx Edicions, Barcelona, 224 pp.
- Fridolfsson, A. K. & Ellegren, H. (1999): A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* **30**: 116–121.
- Gammel, N. & Akiyama, S. (1998): An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. *Trends in Genetics* **12**: 338–339.
- Godoy, J. A., Negro, J. J., Hiraldo, F. & Donazar, J. A. (2004): Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **13**: 371–390.
- Griffiths, R. & Tiwari, B. (1995): Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* **375**: 454.
- Haraszthy, L., Bagyura, J., Szitta, T., Petrovics, Z. & Viszló, L. (1996): Biology, Status and Conservation of the Imperial Eagle *Aquila heliaca* in Hungary. Pp. 425–427. In: Meyburg, B.-U. & Chancellor, R. D. (szerk.): *Eagle Studies*. World Working Group on Birds of Prey (WWGBP), Berlin, London & Paris.
- Horváth, M., Haraszthy, L., Bagyura, J. & Kovács, A. (2002): Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) populations in Europe. *Aquila* **107–108**: 193–204.
- Cruz, Juan José Negro és José Antonio Godoy) és amerikai kollégáink (Tod Katzner, Jamie Ann Rudnick) együttműködését, akik segítségével megalapozta a parlagi sasokon folyó hazai genetikai vizsgálatokat.
- A laborvizsgálatokat, illetve a tollak terepi begyűjtését az MME, az RPS, az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) és a Magyar Természettudományi Múzeum (MTM) következő pályázatai finanszírozták 2002 és 2007 között: Európai Bizottság LIFE Nature programja (MME: LIFE02NAT/H/8627, RPS: LIFE03 NAT/SK/00098), Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium (ELTE: K-36-02-0005H, MME: K-36-03-00008T, K-36-04-00008L), Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok – 2004 (MTM: NKFP3-3B023-04).
- Horváth, M. B., Martínez-Cruz, B., Negro, J. J., Kalmár, L. & Godoy, J. A. (2005): An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* **36**: 84–88.
- Katzner, T. E., Bragin, E. A. & Milner-Gulland, E. J. (2006): Modelling populations of long-lived birds of prey for conservation: A study of imperial eagles (*Aquila heliaca*) in Kazakhstan. *Biological Conservation* **132**: 322–335.
- Li, M., Wei, F., Goossens, B., Feng, Z., Tamate, H. B., Bruford, M. W. & Funk, S. M. (2004): Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**: 78–89.
- Martínez-Cruz, B., David, V. A., Godoy, J. A., Negro, J. J., O'Brien, S. J. & Johnson, W. E. (2002): Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes* **2**: 323–326.
- 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**: 2243–2255.
- Meyburg, B.-U., Haraszthy, L., Meyburg, C. & Viszló, L. (1995): Satelliten- und Bodentelemetrie bei einem jungen Kaiseradler *Aquila heliaca*: Familienauflösung und Dispersion. *Vogelwelt* **116**: 153–157.
- Morin, P. A., Moore, J. J., Chakraborty, R., Jin, L., Goodall, J. & Woodruff, D. S. (1994): Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science* **265**: 1193–1201.
- Nunes, S., Muecke, E.-M., Ross, H. E., Bartholomew, P. A. & Holekamp, K. E. (2000): Food availability affect behavior but not circulating gonadal hormones in maternal Belding's squirrels. *Physiology & Behavior* **71**: 447–455.
- Rawlings, L. H. & Donellan, S. C. (2002): Phylogeographic analysis of the green python, *Morelia viridis*, reveals cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**: 36–44.
- Rudnick, J. A., Katzner, T. E., Bragin, E. A., Rhodes, O. E. & DeWoody, J. A. (2005): Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular Ecology* **14**: 2959–2967.
- Standovár, T. & Primack, R. B. (2001): *A természetvédelmi biológia alapjai*. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 542 pp.

- Sunnucks, P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 199–203.
- Taberlet, P. & Bouvet, J. (1991): A Single Plucked Feather as a Source of DNA for Bird Genetic Studies. *The Auk* **108**: 959–960.
- Taberlet, P., Waits, L. P. & Luikart, G. (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 323–327.
- Taberlet, P. & Luikart, G. (1999): Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 41–55.
- Vili, N., Kalmár, L. & Horváth, M. B. (2005): Individual identification of imperial eagles using non-invasive sampling methods. P. 237. In: Schrott, A. (szerk.): *XXIX. International Ethological Conference Abstracts, Budapest, Hungary, 20–27 August 2005*. Hungarian Ethological Society, Budapest.
- Webb, J. K. & Shine, R. (1997): A field study of spatial ecology and movements of a threatened snake species, *Hoplocephalus bungaroides*. *Biological Conservation* **82**(2): 203–217.