

SZENT ISTVÁN EGYETEM ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR
Ökológia Tanszék

**A KÁRPÁT-MEDENCE RÉTISAS-POPULÁCIÓJÁNAK
(*HALIAEETUS ALBICILLA*) FILOGEOGRÁFIAI ÉS
POPULÁCIÓ-GENETIKAI VIZSGÁLATA**

**Készítette:
Nemesházi Edina**

**Témavezető:
Szabó Krisztián**

**2012
BUDAPEST**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	3.
1.1. Taxonómiai besorolás.....	3.
1.2. A <i>Haliaeetus albicilla</i> általános jellemzői	3.
1.3. Egyedek vonulása, mozgási mintázatai.....	4.
1.4. A rétisas elterjedése és filogeográfiája.....	6.
1.5. Az európai rétisas-populációk a 20. században.....	7.
1.6. A rétisas-populáció története a Kárpát-medencében a 19. század végétől.....	9.
1.6.1. A Kárpát-medence délnyugati területeinek rétisas-állománya.....	9.
1.6.1.1. Kopácsi-rét rétisas-állománya.....	10.
1.6.2. Tiszántúl rétisas-állománya.....	10.
1.6.3. A Magyarországgal határos területek rétisas-populációi.....	11.
1.7. Korábbi populációgenetikai vizsgálatok.....	12.
2. CÉLKITŰZÉS.....	13.
3. MÓDSZEREK.....	14.
3.1. A tollminták gyűjtése, tárolása.....	14.
3.2. Preparálás.....	15.
3.3. DNS-kivonás.....	15.
3.3.1. Kisózásos protokoll.....	15.
3.3.2. Izoláló kit használata.....	15.
3.4. A mtDNS szakasz felszaporítása és szekvenálása.....	16.
3.5. Mikroszatellita fragmensek amplifikálása és analízise.....	17.
3.6. Molekuláris ivar-meghatározás.....	21.
4. EREDMÉNYEK.....	21.
4.1. Molekuláris ivar-meghatározás.....	21.
4.2. A mtDNS-szakasz vizsgálata.....	20.
4.3. Mikroszatellita fragmens-analízis.....	24.
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	26.
5.1. A Kárpát-medence rétisas-populációja.....	26.
5.2. A Tisza hazai területeinek rétisasállománya.....	27.
6. ÖSSZEFOGLALÓ.....	29.
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	30.
IRODALOMJEGYZÉK.....	I.
FÜGGELÉK.....	VIII.

1. BEVEZETÉS

A rétisas (*Haliaeetus albicilla*) jelentős zászlóshajó- és esernyőfaj, és a természetvédelem szimbóluma Európában (Probst és Gaborik 2011). A faj szempontjából Európa (elsősorban Közép-Európa) rendkívül nagy jelentőségű terület, mind a költőpárok száma, mind a genetikai diverzitás tekintetében. (Hailer et al. 2006, 2007; Honnen et al. 2010)

A rétisas hazánkban fokozottan védett faj, melynek pénzben kifejezett értéke Magyarországon 1.000.000 Ft. (13/2001. (V. 9.) KöM rendelet) A Természetvédelmi Világszövetség vörös listája a nem fenyegetett fajok közé sorolja, de 2004-ben még a mérsékelten fenyegetett helyzetű fajként tartották számon (IUCN). A Washingtoni Egyezmény (CITES) I. és II. függelékében szerepel.

A rétisas európai populációi drámai mértékű hanyatlást mutattak a huszadik század során. Az 1970-es évekre számos helyi populáció kihalt, és a legtöbb fennmaradó szubpopuláció mindössze egy vagy néhány tíz költőpárt számlált. Az 1970-es évek után a rétisas-populációk újra növekedésnek indultak, mely folyamat a mai napig tart. (pl. Probst és Gaborik 2011; Literák et al. 2007; Kolisnyk és Gorban 1996; Kjellén és Roos 2000; Dementavičius 2007; Ganusevich 1996) (Bővebben ld: 1.5. és 1.6. fejezet)

1.1. Taxonómiai besorolás

A rétisas (*Haliaeetus albicilla*, Linnaeus, 1758) a Falconiformes (súlyomalkatúak) rend Accipitridae (vágómadárfélék) családjába, azon belül a Haliaeetinae („tengeri sasok”) alcsaládba tartozó faj. Az alcsaládba két nemet sorolnak (*Haliaeetus*, *Ichthyophaga*), elterjedésük globális, Dél-Amerika és az Antarktisz kivételével minden kontinens partvidékein és folyói mentén megtalálhatók. Morfológiai és genetikai vizsgálatok szerint közeli rokonságban állhatnak a Milvinae (kányaformák) alcsaláddal (Lerner és Mindell 2005; Schreiber és Weitzel 1995), és a valódi sasoktól (*Aquila*) jobban elkülönülnek (Schreiber és Weitzel 1995). A Haliaeetinae monofiletikus, a *Haliaeetus* nem azonban parafiletikus taxonnak mutatkozik. (Lerner és Mindell 2005)

1.2. A *Haliaeetus albicilla* általános jellemzői

Magányosan fészkelő, territoriális faj, melynek egyedei jellemzően ártéri erdők, illetve vizek menti erdőségek környékén, fák lombkoronájába, illetve sziklaszirtekre, vagy a talajra, pl. mocsarak, turjánok területén, valamint Norvégia, Grönland és Izland bizonyos területein (Schenk 1929; Helander és Stjernberg 2003; Cramp 1982) építik gallyakból készült fészkeiket. A Kárpát-medencében gyakran idős erdőrészekben és facsoportokban, jellemzően

a fő állományalkotó fajokra (*Populus sp.*, *Quercus robur*, *Fraxinus angustifolia*) építkeznek, általában 18-25 m magasságban (Horváth és Pintér 2005; Radović és Mikuska 2009). Évente egyszer költenek (a költés kezdete Közép-Európában: március első felében (Sándor és Ecsedi 2004); Észak-Európában később, pl. Svédországban: március-április időszakban kezdődik (Helander 1985a)), a fészekaljak 1-3 (jellemzően 2) fiókából állnak (pl. Helander 1985a; Pocora 2010; Ganusevich 1996; Sándor és Ecsedi 2004).

A szomszédos fészkek távolsága élőhelyenként eltérő lehet, és a populáció egyedsűrűsége is befolyásolhatja (600m-5 km: Bank et al. 2004; min. 348 m: Radović és Mikuska 2009; min. 4.5 km: Ganusevich 1996).

A rétisas nagyon eltérő élőhelyeken költ (fátlan fjordok, brakkvízi erdőségek, a tajga tavainak és folyóinak mentén, Közép-Európa ártéri erdőségeinek környékén). A legtöbb helyen azonban erősen függnék vizes élőhelyek nyújtotta táplálékforrástól. (Helander és Stjernberg 2003)

Zsákmányuk legjelentősebb részét halak és vízimadarak, kisebb részben emlősök (gyakran döggént fogyasztva, főleg a téli hónapokban (Dementavičius 2004; Pocora 2010; Probst és Gaborik 2011)), és ritkábban hüllők teszik ki. Ezek aránya a széles elterjedési területük egyes részein különböző, az élőhely adottságai szerint változik (Deme et al. 2009; Dementavičius 2004; Ganusevich 1996; Wille és Kampp 1983; Pocora 2010). Nem ritka más (akár ragadozó) fajok fiókáinak elhurcolása sem (pl. gém: Pocora 2010; egerészölyv (*Buteo buteo*), melynek fiókáját akár etetheti, és fel is nevelheti a sas pár (Horváth 2006; Dementavičius 2004; Literak és Mraz 2011; Palkó 1997)). Több kutató is beszámolt arról, hogy néhány költőpár specializálódott egyes nem-típusos zsákmányállat-fajokra (pl. a Kárpát-medencében mocsári teknősre (*Emys orbicularis*)). (Deme et al. 2009; Sándor és Ecsedi 2004; Dementavičius 2004)

1.3. Egyedek vonulása, mozgási mintázatai

A faj idősebb egyedei az elterjedési területen, néhány északi populáció kivételével, általában egész évben helyben maradnak, a fiatal egyedekre viszont jellemző a migráció, illetve a kóborlás (az Atlanti-óceán partjai mentén a fiatalok általában állandóak, de ott is nagy területeket járhatnak be). Az Európa számos régiójában megtalálható vonuló- és telelőterületek általában egybeesnek a költőterületekkel. (Helander és Stjernberg 2003)

Az egyes területeken általában nem ismert pontosan a telelőként megjelenő egyedek eredete, csupán szórványos gyűrűzési adatok alapján tudnak következtetéseket levonni a kutatók. Például Svédország északi és középső régiói fontos telelőterületei mind Svédországból, mind a finn Lappföldről származó rétisasoknak, de láttak itt Lengyelországból

és Németországból származó egyedeket is (*Helander 1985b*), és a Cseh Köztársaságban is leírtak Finnországból gyűrűzött madarat (*Literák et al. 2007*). Magyarországon feljegyeztek pl. Észtországból származó idős, és oroszországi eredetű egyedet is (*Sándor és Ecsedi 2004*). 2007 januárjában a Hortobágyi Nemzeti Park működési területén telelő állományban megfigyeltek Észtországból, Litvániából, Lengyelországból és Oroszország európai területéről származó egyedeket, valamint a három évvel korábban a közelben fiókaként gyűrűzött hét egyed közül kettőt. (*Dudás 2007*)

A költőpárok a legtöbb területen egész évben a territóriumuk közelében maradnak, bár jelenlétük a fészük közelében a november-január időszakban sokkal alacsonyabb, mint szeptemberen, illetve februárban (Litvánia: *Dementavičius és Treinys 2009*).

Az rétisasok tollazata 5 éves korukban nyeri el a felnőtt kori színezetét, és általában akkor kezdődik meg a szaporodásuk, de előfordul, hogy már korábban költésbe kezdenek (pl. *Helander és Stjernberg 2003; Sándor és Ecsedi 2004*). A fiókák kirepülésük után még 10-20 napig a fészek mellett maradnak, és kb. 6 hónapig követik a szüleiket (pl. *Sándor és Ecsedi 2004*), majd önállóvá válnak (pl. Litvániában ősz végén válnak önállóvá fiatalok, de olykor október elejéig is a szülők etetik őket (*Dementavičius és Treinys 2009*)). Az immatur egyedekre jellemző a véletlenszerű kóborolás, irányát valószínűleg az elérhető táplálékforrások szabják meg (pl. *Shiraki 2002; Dudás 2007*). A téli időszakban számos területen megfigyelhető a migrációjuk (pl. *Probst és Gaborik 2011; Helander és Stjernberg 2003*). Ebben a korban igen nagy távolságokat tehetnek meg a származási helyüktől (pl. a Cseh Köztársaságban feljegyeztek Észtországból és Finnországból származó egyedeket, több, mint 1000, illetve 2000 km-re a kikelésük helyétől (*Literák et al. 2007*). Ilyen nagy távolságok megtétele nem okoz nehézséget ezeknek a madaraknak, pl. Magyarországról 2 napon belül jutott el egy példány Oroszországba, 1500 km-t megtéve (*Sándor és Ecsedi 2004*).

Több kutatás eredményei alapján a rétisasok jellemzően területhűnek tekinthetők, párba állás után gyakran a kikelési helyükhöz közel telepednek le (pl. *Helander és Stjernberg 2003; Hailer et al. 2006; Helander 2003a, 2003b*). Ezzel szemben a rétisas láthatóan nagy távolságú terjedésre és kolonizációra képes, hiszen a faj megtalálható Izlandon, Grönlandon és valószínűleg Hawaiiin is élt kb. 3300 évvel ezelőtt (*Fleischer et al. 2000*), és a téli migrációk alkalmával is nagy távolságokat tesznek meg (pl. *Literák et al. 2007; Sándor és Ecsedi 2004; Dudás 2007*).

1.4. A rétisas elterjedése és filogeográfiája

A rétisas (*Haliaeetus albicilla*) mai fészkelő állományai a Nearktisz legkeletibb részén (Grönland) és a Palearktisz területének északi felén (Izland, Európa, Közép- és Észak-Ázsia és Japán) találhatók. Az európai rétisas-populáció több, mint 55%-át Norvégia és Oroszország állománya teszi ki, a teljes európai állományt 5000-6600 költőpárra becsülik. (*BirdLife International 2004*)

A mitokondriális kontroll DNS régió egy 500 bp hosszú szakasza alapján alacsony genetikai variabilitást (13 haplotípus) mutattak ki a faj teljes mai elterjedési területét nézve (*Hailer et al. 2007*). E mitokondriális DNS szakasz vizsgálata során a közép-európai állományban megnövelt mintaszám mellett az ismert haplotípusok száma 23-ra emelkedett, ami azt jelzi, hogy Közép-Európa jelentős terület lehet a faj szempontjából (*Honnen et al. 2010*). A jelenleg ismert 23 haplotípus (egy kivételével) két nagy haplocsoportra különül el, melyek keleti és nyugati elterjedésre oszthatók, Európában jelentős átfedést mutatva egymással. (*Hailer et al. 2007; Honnen et al. 2010*)

Ez a két ág a késő Pleisztocénben különülhetett el. Úgy látszik, hogy ebben az időszakban a keleti haplocsoport gyors populációs növekedésen és kolonizációs folyamaton ment keresztül Euráziában, míg a nyugati haplocsoport kisebb változatosságot, és a kelet-ázsiai populációtól való nagy távolságot mutat. Mindezek alapján feltehetően 2 nagy refúgiumban vészeltette át a faj az utolsó jégkorszakot, melyek Közép-, illetve Nyugat-Euráziára tehetők. (*Hailer et al. 2007*) Összhangban áll ezzel az elmélettel a Gibraltár Pleisztocén kori barlangi lerakódásából származó bal humerus (*Lydekker 1891*), de a Bükk-hegység háromi Puskaporos barlangjában is találtak két Pleisztocén kori rétisas leletet (egy metacarpus és egy ulna, a rágsálós réteg alatti sárga agyagból) (*Lambrecht 1914*). Az utolsó glaciális időszak végén jelen volt a faj az Egyesült Királyság területén is (*Harrison 1988*), és a Neolitikumból (Pleisztocén vége, Holocén eleje) származó leleteket találtak Finnországban is (*Mannermaa 2003*).

Az eljegesedés elmúltával a populációk újra növekedésnek indulhattak, és keveredhettek egymással. Az északi területeket az utolsó eljegesedés maximumának idején jégpáncél borította, így a glaciális időszak után keletkező olvadékvíz-folyók és a már kialakult tavak nyújtotta élőhelyen a populáció újra növekedésnek indulhatott. (*Hailer et al. 2007*)

1.5. Az európai rétisas-populációk a 20. században

A rétisasok számára hosszú ideje veszélyt jelent az erdőgazdálkodási tevékenység, az építkezésből adódó élőhelycsökkenés, a folyók szabályozása és vizek kiszáritása, az emberi zavarás, a táplálékforrások csökkenése, a vadászat (pl. *Fintha 1976; Chernel 1899; Kolisnyk és Gorban 1996*), a tojások és fiókák gyűjtése, a különböző eredetű mérgezések, és a 20. század második felétől az elektromos vezetékek okozta áramütések. (*Helander és Stjernberg 2003; Tevely 1996; Bank et al. 2004; Haraszthy és Bagyura 1993; Sterbetz 1993*)

A 20. század közepén a rétisas-populáció Európa-szerte drámai mértékű csökkentést mutatott, de az észak- és közép-európai populációban kiemelkedően stabil volt Norvégia állománya, mely kevésbé volt kitéve az addigra Európa-szerte elterjedt mezőgazdasági szennyező anyagok (elsősorban a DDT (dikloro-difenil-triklóretán) és származéka, a DDE (dikloro-difenil-diklóretén), valamint a PCB (poliklórozott bifetil) vegyületek) hatásának. Míg más országokban kimutatható volt a DDE és a PCB vegyületek jelentős reprodukcióra csökkentő hatása (pl. Svédország: *Helander 1985a, Helander et al. 2002*; Németország: *Koeman 1972*) – első sorban a tojáshéjak elvékonyodása, a tojások kiszáradása révén (*Helander et al. 2002; Haliaeetus leucocephalus*, USA: *Wiemeyer 1984*) –, Norvégiában nem csökkent jelentősen a populáció szaporodási sikere 1974 és 1994 között, és a tojásoknak mindössze 3%-ában haladta meg a kritikus értéket a DDE-koncentráció (*Nygård és Skaare 1998*) (habár a közelmúltban Észak-Norvégiában a tengerparton magas POP (perzisztens organikus szennyező anyagok) szennyezettséget mutattak ki (*Eulaers et al. 2011*)). A Balti-tenger partján a DDT betiltása után 10 évbe telt, mire a reprodukció siker újra emelkedni kezdett, de a szennyezés előtti értékeket további 15 év elteltével sem érte el (*Helander et al. 2002*). A közeli rokon *Haliaeetus leucocephalus* faj esetén kimutatták, hogy e perzisztens mérgek mennyisége az egyedekben nő a trofikus szintek számával és a tengeri táplálék arányával (*Elliott et al. 2009*).

Az 1970-es évek (a DDT, és más lassan bomló vegyületek mezőgazdasági használatának betiltása és számos védelmi intézkedés elindítása) után Európa országainak rétisas-populációi gyors növekedésnek indultak. Például a Cseh Köztársaságban 60 évig nem fordult elő, majd az 1980-as évek elején ismét megjelent, és 2007-re az állomány elérte a 25-30 költőpárt (*Literák et al. 2007; Helander és Stjernberg 2003*); a Kola-félszigeten 1976 és 1990 között kettőről 13-ra emelkedett a költő-territóriumok száma (*Ganusevich 1996*); Litvániában fészkelésének 1978-as teljes megszűnése után 1987-ben kezdett költeni ismét, és 2007-re a területiális párok száma elérte a 90-et (*Dementavičius 2007*); Németországban 1981 és 2005 között a területiális párok száma 130-ról 500-ra emelkedett (*Sulawa et al. 2010*);

Magyarországon 1987 és 2010 között kb. 15-16-ról 226-ra emelkedett a költőpárok száma (Probst és Gaborik 2011; Horváth 2009).

Annak ellenére, hogy a globális populáció-hanyatlás idején az európai állományok több, mint 70%-át jelentette a Norvégia atlanti-óceáni partjai mentén élő populáció, Észak- és Közép-Európában a génáramlás mértéke alacsonynak mutatkozik, így a mai európai állományok alapvetően nem származtathatóak a norvégiai populációtól. (Hailer et al. 2006)

Probst és Gaborik (2011) szerint az európai állomány egy északkeleti (első sorban Norvégia, Svédország, Finnország, Oroszország, Lengyelország, Németország) és egy délkeleti (alapvetően a Duna-völgy országai, melyek közül a legfontosabbak: Magyarország, a Bajorország (Németország tartománya), Ausztria, Szlovákia, Horvátország, Szerbia, Bulgária, Románia, és Ukrajnának a Duna-delta vidékére eső része) szubpopulációra osztható. Németország esetén a Dunát egyfajta folyosónak tekintik, amely összeköti a nagy észak-európai populációt a Duna-völgy populációjával. A délkeleti régióba sorolt állományokban a Dunához közel költő párok aránya magasabb (pl. Bulgária: 80%, Románia: közel 90%), míg a németországi állomány a Dunától távolabb, az ország északi régióiban költ, kapcsolatban állva a lengyel állománnyal. (Probst és Gaborik 2011)

Az említett délkeleti állományban kb. 650 rétisas pár él, melyből közel 200 függ ökológiailag a Dunától. Emellett a Duna folyórendszere jelentős telelőterülete is a fajnak. (Probst és Gaborik 2011)

1.6. A rétisas-populáció története a Kárpát-medencében a 19. század végétől

A Kárpát-medence rétisas (*Haliaeetus albicilla*) elterjedési területének déli határán helyezkedik el. (Helander és Stjernberg 2003)

Magyarországon az 1800-as évek végén a rétisas gyakori faj, és a leggyakoribb sasfaj volt (Európában és Ázsiában szinte mindenütt honos volt akkoriban) (Wildburg 1897; Chernel 1899). Sokáig gazdasági kártevőként tartották számon és irtották a rétisast (Fintha 1976; Chernel 1899). Az egyedszám az 1900-as évek elején csökkenésnek indult (pl. Fintha 1976; Bank et al. 2004).

Magyarország rétisas-élőhelyeit Tevely két nagy csoportra osztja: a nagy folyóinkhoz (Duna, Dráva, Tisza) kapcsolódó galériaerdők (kiterjedésük jelentősen csökkent a folyószabályozások következtében); valamint az alföldi erdők, természetes törendszerekkel és mesterséges halastavakkal (a dél-dunántúli régió jellegzetes élőhelyei). (Tevely 1996)

Az 1950-es évek elején a teljes hazai állományt 9-10 párba becsülték (Fintha 1976), pl. Szegeden (Beretzk 1955) és Várászlón (Somogy megye) (Breuer 1955) jegyezték fel költést.

Az 1970-es években 2-12 párba becsülték a költő állományt Magyarország egész területén

(Fintha 1976; Haraszty és Bagyura 1993). Fészkelőként az ország jelentős részéről eltűnt, mindössze néhány pár maradt a Duna hazai szakaszain, és bizonyos években egyetlen fióka sem repült ki az országban (Fintha 1976; Haraszty és Bagyura 1993).

Az 1980-as években a hazai állomány emelkedni kezdett, és az 1990-es évek elejére elérte a 35 párt (Haraszthy és Bagyura 1993), melyben jelentős szerepe lehetett a „dúvad-mérgezések” betiltásának, a vizek vegyi-szennyezés-csökkentésének, és az ország több pontján rendszeressé vált téli etetésnek, valamint műfészek-kihelyezésnek (Haraszty és Bagyura 1993; Bank et al. 2004).

1996-ban a hazai állományt Tevely 36 párra becsülte (Tevely 1996), más források szerint ebben az évben 54 költőpár lehetett az országban, mely folyamatosan növekedve, 2007-re elérte a 166-ot (Horváth 2009), 2010-ben pedig már 230 párra becsülték a költőállományt. (Probst és Gaborik 2011)

Magyarország kiemelkedő fontosságú telelőterületei a biharugrai halastavak, a Hortobágy, és a Duna-völgy (Bank et al. 2004).

1.6.1. A Kárpát-medence délnyugati területeinek rétisas-állománya

Az 1970-es években az országban csak a dél-dunántúli területeken volt ismert rétisas-fészkelés. A Hanság, Szigetköz, Hortobágy, Csongrád megye és a Közép-Felső-Tisza régióban biztosan nem költött rétisas. (Horváth 2009)

Jelentős költő- és telelőterület az Alsó-Duna-völgy, melynek körülbelül 75 km-es szakaszán költött 2004-ben a hazai állomány egyötöde (Bank et al. 2004). Gemenc és Somogy megye a legjelentősebb telelőterületek közé tartoznak az országban (Haraszthy et al. 2003).

1955-re legfeljebb 9-10 lakott fészek volt ismert Gemencen (Böröczky 1957). 1996-ban Tevely úgy jellemezte a Gemenci Erdőt, mint az egyetlen kivételt a Duna szabályozásából adódó élőhelycsökkenés alól (Tevely 1996).

2002-ben 10 pár költött sikeresen a területen, a telelni érkező egyedek száma pedig kb. 60-80 (Bank et al. 2004). Nem ismert pontosan, hogy honnan érkeznek ide a telelő egyedek, de feljegyezték itt pl. az egykori Jugoszlávia területéről származó egyedeket (Ham et al. 1990).

2007-ben a hazánkban ismert 166 költőpár közül 17 a Duna déli szakaszán, 12 Tolna megyében, 23 Baranya megyében, 41 pedig Somogy megyében fészelt (Horváth 2009).

1.6.1.2. Kopácsi-rét rétisas-állománya

A Kopácsi-rét (korábbi nevén Bellyei uradalom) a Duna és Dráva összefolyásánál található árterület, mely mindig ideális élőhelyet kínált a rétisasok számára. Ezen a területen régóta jelentős állományt tartottak számon (Schenk 1929). Jelenlétüket és fészküket

feljegyezték 1944-ben (*Horváth 1952*), 1976-ban pedig minimum 20 lakott fészek volt jelen a 30 000 hektáros területen, bár a táplálékhiány és a mérgezések jelentős hatással voltak erre az állományra is (*Mikuska 1978*).

A környező élőhelyek drasztikus átalakulása (számos területet mezőgazdasági művelés alá vontak) ellenére a Kopácsi-rét vizes élőhelyei ma is megfelelőek a rétisas számára. 2009-ben a terület rétisas-állományát 42-45 költőpárra becsülték (*Radović és Mikuska 2009*), napjainkban világszinten kiemelkedő egyedsűrűségben költ itt a faj (*Mikuska 2009*).

1.6.2. Tiszántúl rétisas-állománya

A Hortobágy vidéke jelentős élőhelye és telelőterülete számos madárfajnak (pl. *Nagy 1924*). Az első telelő rétisas-példányok szeptemberben érkeznek, és létszámuk novemberben éri el a csúcst, a nyári lúd csapatok érkezésével (az 1970-es években 15-30, a 2000-es évek elejére 35-60, vagy akár 80-120 példány is előfordult) (*Fintha 1976; Horváth 2009; Sándor és Ecsedi 2004*). A tavak befagyása után (többnyire november második felében) a rétisasok többsége tovább vonul, de enyhe tél esetén az áttelelők száma is magas lehet (*Sándor és Ecsedi 2004*). Február-március körül a számuk ismét megemelkedik, a területről március végén (vagy április elején) vonulnak el (pl. *Kovács 1984*). Előfordul, hogy a hazai párok már megkezdik a költést, amikor még jelen vannak az északibb területekről származó példányok is (*Horváth 2009; Sándor és Ecsedi 2004*). A telelő állomány eredete nem tisztázott, de pl. 2007-ben feljegyezték Észtországból, Litvániából, Lengyelországból és Oroszországból származó egyedeket is (*Dudás 2007*).

A Tisza Csongrád megyei szakaszán 1976-ban szűnt meg a költés (*Sterbetz 1993*), a Hortobágy területén pedig az 1970-es évek előtt már hosszú ideje nem költött a rétisas (*Fintha 1976*), bár október és március között a telelő példányok minden évben felkeresték a Hortobágyi-halastó és az Ohati-tavak vidékét és még néhány tavat (*Fintha 1976; Kovács 1984*). A telelő állomány az 1970-es évek közepén 8-30 egyedből állt, amely nagy létszám ritkaságnak számított Európában (*Fintha 1976*). 1981-ben a Hortobágyon is megkezdtek a rendszeres téli etetésüket (*Kovács 1984*). 1997-ben az országban előfordult 300-400 telelő egyed közül kb. 50-60 volt jelen a Hortobágyon, és kb. 40 Békés megyében (*Haraszthy et al. 2003*).

Az Alföldön először a Közép-Tisza régióban jegyezték fel sikeres költést 1987-ben, majd az 1990-es évek elejétől fokozatosan jelentek meg újabb területeken (Csongrád megye, Hortobágy, Békés megye) (*Horváth 2009*).

A Hortobágyon már 1972-ben voltak költési próbálkozások (*Fintha 1976*), de az első sikeres fészkelést csak 1995-ben jegyezték fel, majd 1997-ben és 2000-ben újabb párok kezdtek sikeres költésbe (*Sándor és Ecsedi 2004*). Mára állandó, növekvő fészkelő állomány

jött létre, 2007-ben már 13 költőpárt tartottak számon a Hortobágy területén (*Horváth 2009*).

2007-ben a Jászságban 1, a Kiskunságban 6, a Felső-Tisza vidékén 2, Csongrád megyében 10, Békés megyében 5 költőpárt számláltak (*Horváth 2009*).

1.6.3. A Magyarországgal határos területek rétisas-populációi

Szlovákiában 1965 és 1997 között, Ausztriában 1964 és 1999 között nem jegyezték fel rétisas-költést, 2001-ben pedig kb. 4, illetve 1 pár költött országonként (Rác személyes közlése: *Literák et al. 2007*; *Zuna-Kratký et al. 2000*; *Probst 2002*; *Helander és Stjernberg 2003*). Szlovéniában 2000 körül lehet, hogy nem költött több 1 párnál (*Helander és Stjernberg 2003*).

Más területeken az állomány igen jelentős maradt. Ukrajnában 1965-ben mindössze 15 párt tartottak számon, de 1996-ban becslések szerint az állomány megközelítette az 50 költőpárt (*Kolisnyk és Gorban 1996*). Romániában 1964 és 1967 között 32, 1980 és 1982 között már csak 7 fészek volt ismert, az országos állományt ma 25-30 párra becsülik (*Probst és Gaborik 2011*). Horvátországban a költőpárok száma 1997 és 2009 között 60-70-ről min.135-re emelkedett (*Radović és Mikuska 2009*), Szerbia állományát pedig 2002-2003-ban kb. 52 párra becsülték (*Helander és Stjernberg 2003*). Feltehetően a Tisza déli szakaszán mindvégig jelen voltak fészkelő párok a nagy állománycsökkenések idején is (*Horváth Zoltán pers.comm.*)

A Cseh Köztársaságból való 1920-as teljes eltűnése után a déli országészben 1984-ben, az északi régióban pedig 1990-ben kezdődött újra a költés (*Literák et al. 2007*). 2001-ben a Cseh Köztársaság állományát kb. 25, Lengyelországot kb. 500 párra becsülték (*Helander és Stjernberg 2003*).

1.7. Korábbi populációgenetikai vizsgálatok

A 20. században kialakult palacknyak-effektus következményeként várt csökkent genetikai diverzitással szemben, DNS vizsgálatok (a mitokondriális kontroll régió egy szakasza, és 26 mikroszatellita lokusz) alapján a vizsgált európai populációk genetikai diverzitása nem csökkent olyan mértékben, mint ahogyan várható lett volna. A kutatók véleménye szerint ennek okai között szerepelhet, hogy bár az észak-és közép-európai rétisas populációk elsősorban lokálisnak tekinthetők, néhány bevándorló egyed befolyásolhatja a helyi genetikai készletet, valamint a fajra jellemző hosszú generációs idő (17 év átlag élettartam) csökkenthette a genetikai sodródást, és pufferként hathatott a gyors genetikai diverzitás-csökkenéssel szemben. A kutatók hangsúlyozzák, hogy az említett palacknyak-effektus időtartama 20-30 év volt, ami körülbelül 2 generációt érint. (*Hailer et al. 2006*)

A mitokondriális kontroll DNS-régió egy 500 bp hosszúságú szakasza alapján az európai rétisas-populáció két nagy haplocsoportra oszlik, jellemzően keletibb és nyugatibb elterjedéssel (*Hailer et al. 2007; Honnen et al. 2010*). (ld. 2.4. fejezet) A vizsgált közép-európai populációk 7 mikroszatellita marker alapján két klaszterre voltak oszthatók, szintén keletibb és nyugatibb elterjedéssel (habár a minták halott egyedekből, vedlett tollakból és múzeumi példányokból származtak, és pl. az Ausztriában vizsgált 13 egyedből egy Finnországból, egy pedig Észtországból származott). Ez a vizsgálat is nagy genetikai diverzitást mutatott ki, nem volt jele palacknyak-effektusnak (*Honnen et al. 2010*) (ld. 2.5. fejezet)

A Cseh Köztársaságban a rétisas teljes eltűnését követő újra-kolonizációban résztvevő madarak eredetének vizsgálata nem szolgált egyértelmű eredményekkel. 45 – nem csak a területen fészkelő vagy kirepülő – egyeden, 6 mikroszatellita lókuszt vizsgáltak a kutatók. A Cseh Köztársaság és Szlovákia rétisasállománya keveredő populációnak mutatkozott. 18 ismert származású (Cseh Köztársaság, Románia, Németország) egyed külön vizsgálata során azonban a cseh állomány egy északi és délnyugati, valamint egy délkeleti (Szlovákiával összefüggő) állományra volt osztható. A kutatók feltételezik, hogy a délkeleti régiót a Dunához kötődő, Szlovákiából, Ausztriából, illetve Magyarországról származó rétisasok, míg a délnyugati és északi területeket más, pl. németországi, illetve lengyelországi eredetű egyedek foglalták vissza. (*Literák et al. 2007*)

2. CÉLKITŰZÉS

Jelen kutatásban két fő célt tűztünk ki. Egyik célunk a Kárpát-medencei állomány (mint a rétisas elterjedési területének legdélebbi populációja) és az eddig vizsgált állományok filogeográfiai viszonyainak feltérképezése. Másik célunk az volt, hogy a Kárpát-medence területén belül finomabb felosztást hozzunk létre a populáció genetikai vizsgálata révén.

Két szinten vizsgáltuk tehát a populációt: filogeográfiai (a faj elterjedési területe és Kárpát-medence összehasonlítása) és populáció-genetikai (a Tisza menti területek a Kárpát-medencén belül; délnyugati és tiszai populáció közti génáramlás feltérképezése) skálán.

3. MÓDSZEREK

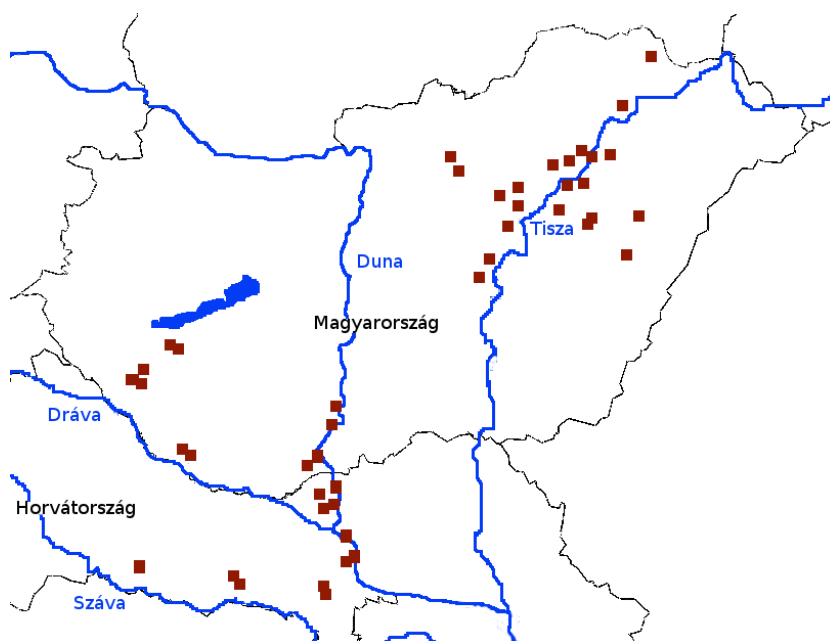
3.1. A tollminták gyűjtése, tárolása

2010-2012-ben a Kárpát-medence Tisza menti és délnyugati területeinek élőhelyein található fészkekből, fiókáktól gyűjtöttek tollmintát a területileg illetékes nemzeti parkok gyűrzési engedéllyel rendelkező munkatársai, az éves gyűrzési program keretében (Engedélyek: Országos Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Főfelügyelőség 14/1514-3/2010 és 14/433-4/2011 ügyszámú határozata). (A mintavételi területek a 3.1. ábrán láthatók.) Rétisasok esetén a gyűrzési időszak hazánkban április közepétől május közepéig tart.

A genetikai analízisbe összesen 71 egyed tollmintáját vontuk be, ebből 61 minta esetén voltak sikeresek a PCR reakciók. A tollminták gyűjtésének pontos helye (GPS koordináták révén) rögzítésre került. Az egyes egyedektől származó tollak külön (96%-os etanolt tartalmazó) műanyag csőbe kerültek a laboratóriumi feldolgozásig.

A laboratóriumba érkezésük után minden tollmintát 96%-os etanolban, 4°C-on tároltunk a feldolgozásig.

Minden egyed tollmintái egyedi mintakódot kaptak, táblázatban rögzítettük a gyűjtés pontos helyét, időpontját, valamint a gyűrűszámot, és (amennyiben volt ilyen) a gyűrűző által becsült ivart.



3.1. ábra: A rétisas-fiókák mintavételi helyei.

3.2. Preparálás

A fiókáktól származó, tépett tollak esetén könnyen juthatunk nagy mennyiségű DNS-hez a tollvégből (ezt a módszert sikerrel alkalmazta pl. *Markis 2010; Morin et al. 1994*). Ezekből a tollakból a tollvég 0.5 cm-es darabját vágtam le steril szikepenge segítségével, parafilm alátétén, majd a levágott darabot 1-5 ml-es centrifugacső belső falára helyezem, hogy a konzerváló alkohol elpárologhasson. A kipreparált tolldarabokat -20°C-on tároltuk a DNS-kivonásig.

3.3. DNS-kivonás

3.3.1. Kisózásos protokoll

A tokos fióka tollak esetén a DNS kivonására kisózásos protokollt alkalmaztunk (*Gemmell és Akiyama 1996*), néhány módosítással.

A tolldarabokat Proteináz-K enzimmel emésztettük. Ennek során minden mintához 15 µl Proteináz-K enzimet (Fermentas), 100 µl Proteináz-K puffert, 15 µl 20%-os SDS-t, 155 µl desztillált vizet és 10 µl DTT-t (1,4-dit iotretitol, a tollban lévő keratin feloldásához) adtam, majd 15 mp-ig vortexen ráztam. Ezután a minták 12 óra hosszan 55°C-os vízfürdőbe kerültek. Ezután az emésztetlen darabokról a DNS-t tartalmazó oldat leszívásra került, majd 315 µl 5 mol/l koncentrációjú LiCl-oldat és 630 µl kloroform-izoamil alkohol (24:1 arányú keverék) hozzáadása következett. Ez az elegy is 15 mp vortexelésnek lett kitéve, majd 14100 rpm (fordulat/mp) sebességgel 10 percig centrifugáltam. A felső fázisba került DNS-ből 400 µl-t új csőbe mértem, majd 400 µl izopropanol (Reanal) hozzáadása, és a csövek forgatása (az elegy elkeveredése) után a minták 12 órára -20°C-ra kerültek.

Ezután 15 percig 14100 rpm-en történő centrifugálás után a DNS-ről a propanolt leöntöttem, majd 800 µl 70%-os etanolt (Reanal) mértem rá. Újabb 15 perc centrifugálás után a felülúszót leöntöttem a kicsapódott DNS-ről, majd a nyitott csöveket száradásig sötét helyre tettem. A minták végül 50 µl TE pufferben (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) kerültek beoldásra, és -20°C-on tároltuk őket.

3.3.2. Izoláló kit használata

A kisebb fiókatollak, illetve azon nagyobb tollak esetében, melyekből a kisózásos protokollal nem kaptunk értékelhető DNS-izolátumot, DNS-izoláló kit-et használtunk (Quiagen - DNEasy Blood & Tissue Kit). Ennek előnye, hogy a DNS kivonása gyorsabb, egyszerűbb, és a kapott DNS-oldat nagyobb tisztaságú lehet, mint a kisózásos módszerek esetén. Mintáinkon a gyártó által „állati szövetekhez” javasolt protokoll szerint végeztük el az

izolálást. A minta ezután -20°C-on került tárolásra.

3.4. A mtDNS szakasz felszaporítása és szekvenálása

A Kárpát-medence különböző területein gyűjtött, 18, különböző fészkekből (illetve két minta esetén azonos fészkekből de különböző évből) származó fiókatól gyűjtött tollmintán vizsgáltuk a mitokondriális DNS kontroll régiójának egy szakaszát, amelyet korábban más kutatók is használtak a rétisasok genetikai vizsgálata során (*Hailer et al. 2006; Hailer et al. 2007; Honnen et al. 2010*).

A mtDNS vizsgálandó 500bp-os szakaszának felszaporítását a HalHVR1F-HalHVR1R (*Hailer et al. 2007*) primer pár (3.2. táblázat) segítségével végeztük. A PCR reakció 25 µl térfogatban zajlott (2,5 µl PCR Puffer (10x DreamTaq™, Fermentas), 1 egység DreamTaq™ (Fermentas), 0,5 mM dNTP (Fermentas), 1 µl MgCl₂ (25mM, Promega), 10-10 pM primerenként, 15,4 µl H₂O és 20 ng izolált genomi DNS hozzáadásával).

A PCR reakció *Hailer et al. 2007* nyomán zajlott (95°C 2 perc, majd 37 ciklusban: 95°C-on 30mp, 56°C: 1 perc, 72°C: 1 perc. Végső extenziós lépés: 72°C, 7 perc).

A kapott termékeket 2%-os agaróz gélen történő elektroforézis (100 V, 30 perc, GeneRuler 50 bp, Fermentas létrával) során ellenőriztük, és sikeres reakció esetén a minták szekvenálásra kerültek. Az elektroforézis után a gél 5 percig etídium-bromid oldatban festettem meg, majd 10 percig deszillált vizes öblítés következett. A termékeket ezután UV-asztalra (Vilber Lourmat ECX-20.C) helyezve ellenőriztem.

A PCR termék a gélből szikével kivágásra került, majd Millipore Montage Kit segítségével tisztítottuk ki.

A szekvenáló PCR-t a tisztított PCR terméken mindkét irányban elvégeztük Abi - BigDye® Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit, (Applied Biosystems). Használatával. A reakcióelegy 50 ng PCR termék, 2 µl primer (5pM), 2 µl BigDye Terminator és 2 µl BigDye puffer keverékéből állt.

A szekvenáló PCR ciklus során a kezdeti denaturáló lépés 96 °C-on zajlott 1percig, majd 25 ciklusban a denaturáció 96°C-on 10 mp-ig, az annelláció 50°C-on 5 mp-ig, az elongáció pedig 60°C-on 4 percig zajlott. A szekvenáló PCR termékeinek kapilláris elektroforézise Abi 3130 automata szekvenálóval (Applied Biosystems) történt.

A futásfajok ellenőrzése és összerakása a Staden programcsomaggal (*Staden et al. 2000*), az ellenőrzött szekvenciák összeillesztése, a homológ pozíciók azonosítása ClustalW (*Thompson et al. 2002*) szoftverrel történt. Az összeillesztett szekvenciákból a Splitstree 4 szoftver (*Huson és Bryant 2006*) segítségével median-joining haplotípus-hálózatot számoltunk (*Bandelt et al. 1999*).

Vizsgálatunk eredményeit ezután összehasonlítottuk más kutatók korábbi eredményeivel. Ehhez az összehasonlításhoz a szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nyilvános adatbázisából vettük (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; AM156933.1 – AM156945.1, GU134347.1 – GU134358.1).

3.5. Mikroszatellita fragmensek amplifikálása és analízise

Vizsgálatunkban 10 mikroszatellita lókuszt használtunk, melyek *Haliaeetus albicilla* és *Aquila heliaca*, valamint *Aquila adalberti* sasokra publikáltak (részletes adatokat lásd a 3.2. táblázatban), és amelyeket a faj széles elterjedési területének számos populációjában vizsgáltak már (Hailer et al. 2006; Honnen et al. 2010; Literák et al. 2007). Ezeket az analíziseket minden minta esetében (melyek között testvérpárok is voltak) elvégeztük.

Az egyes lókuszok felszaporítását külön-külön PCR reakciók során végeztük, minden esetben 25 µl térfogatban (2,5 µl PCR Puffer (10x DreamTaq™, Fermentas), 1 egység DreamTaq™ (Fermentas), 0,5 mM dNTP (Fermentas), 1 µl MgCl₂ (25mM, Promega), 10-10 pM primer, 15,4 µl H₂O és 15 ng izolált genomi DNS).

Az Aa35 lókuszt kivételével minden esetben a kezdeti denaturáló lépés követően (95°C, 2 perc) 37 ciklusban ismétlődtek a denaturáció (95°C, 30 mp), annelláció (45 mp), és az elongáció (72°C, 45 mp) lépései, a végső extenziós lépés pedig 72°C-on 7 percig zajlott. Az annellációs hőmérséklet beállítása néhány kivétellel az adott primer párt leíró publikáció szerint történt (ld. 3.2. táblázat).

Az Aa35 lókuszt esetén „touch-down” PCR ciklust alkalmaztunk (Martínez-Cruz et al. 2002). A kezdeti denaturáló lépés 94°C-on zajlott 2 percig, majd 17 ciklusban a denaturációt (92°C, 30 mp) követően az annellációs (30 mp) hőmérséklet ciklusonként 1°C-kal csökkent (66°C-ról 50°C-ra), majd az elongáció (72°C, 30 mp) következett. További 19 ciklusban a denaturáció 92°C-on 30 mp-ig, az annelláció 50°C-on 30 mp-ig, az elongáció pedig 72°C-on 30 mp-ig zajlott. A végső extenziós lépés során a hőmérséklet szintén 72°C, 5 percre csökkent.

Minden PCR reakció sikerességét gélelektroforézis során ellenőriztem (1,5% agaróz gél, 100 V, 35 perc, GeneRuler 50 bp, Fermentas létrával). Az elektroforézist követően a gél etídium-bromid oldatban festettem meg (részletesen ld. 3.4. fejezet).

Az egyes PCR reakciók termékeiből a 3.1. táblázatban látható módon mintánként két keveréket hoztam létre, majd az így kapott termék-elegyekből 1-1 µl-t új csövekbe helyeztem. Ehhez 14-14 µl-t mértem formamid (Promega) és létra (Gene Scan™-500LIZ™ Size Standard) 200:3 arányú keverékéből, majd 95°C-on 5 percig denaturáltam. Az egyszálúvá vált DNS újraegyesülését a formamid akadályozta meg.

3.1. táblázat: A mikroszatellita lókuszok PCR termékeiből összeállított keverékek a fragmens-analízishez

1. Mix			2. Mix		
Lókusz	Mennyiség (μl)	Jelölés	Lókusz	Mennyiség (μl)	Jelölés
Hal04	6	●	Hal01	5	●
Hal09	5	●	IEAAAG04	4	●
Hal10	6	●	IEAAAG05	5	●
Hal13	3	●	IEAAAG14	5	●
Hal14	5	●	Aa35	6	●

A színes pontok az alkalmazott fluoreszcens jelölés színét mutatják.

A feltüntetett mennyiségek mixenként 25 μl térfogatban értendők.

(Az egyes lókuszokon várt allél méreteket a 3.2. táblázat mutatja.)

A denaturált mintákat Abi3130 automata szekvenálóban (Applied Biosystems) futtattuk meg, a leolvasott fragmensek hosszát Peak Scanner™ (v1.0, Applied Biosystems) szoftver segítségével azonosítottuk.

Az esetleges genotipizálási hibákat és nullallél-előfordulást a Micro-checker (*Oosterhout et al. 2004*), szoftver segítségével detektáltuk. Az alapvető populáció-genetikai mérőszámokat, valamint az F-statisztikákat a Genepop 4.0 (*Raymond és Rousset 1995*), az Arlequin 3.1 (*Excoffier és Schneider 2005*) és a Genetic Studio (*Dyer 2009*) szoftverek segítségével számoltuk ki.

A Kárpát-medencén belüli költőállomány genetikai struktúráját három bayes-i megközelítést használó, egyedi genotípusok alapján klaszterező programmal becsültük. Ezek közül a Structure 2.3 (*Pritchard és Wen 2003*) és a BAPS 3.2 (Bayesian Analysis of Population Structure, *Corander et al. 2003*) a klaszterezés során kizárólag a genetikai adatokat használja fel (előbbi MCMC (Markov Chain Monte Carlo), utóbbi Metropolis-Hastings algoritmust használ), míg a Geneland (*Guillot et al. 2005*), amely az R statisztikai környezet (*Ihaka és Gentleman 1996*) csomagja, viszont figyelembe veszi a mintázott egyedek földrajzi távolságait is (szintén MCMC algoritmust használ).

3.6. Molekuláris ivar-meghatározás

A vizsgált egyedek ivarának meghatározásához a 2550F-2718R primer párt (*Fridolfsson és Ellegren, 1999*) használtuk (3.2. táblázat), ami az ivari kromoszómákon található CHD1 génhez kötődik. Ez a gén két változatban létezik a madarak esetén: W kromoszómához (*Griffiths és Tiwari 1995*), illetve Z kromoszómához (az eredetileg CHD-NW néven közölt változat a Z kromoszómán található (*Griffiths és Korn 1997*)) kötött változatban. A 2550F-2718R primer pár a két génváltozaton az eltérő méretű intronok miatt eltérő méretű termékeket eredményez. Ez a különbség a fajok többségénél kb. 150 bp. (*Fridolfsson és Ellegren, 1999*)

Mivel madarak esetén a tojó a heterogametikus (WZ), a hím pedig a homogametikus (ZZ) ivar, ennek a szakasznak a felszaporítása hímek esetén egy (rétságokban kb. 750 bp (*Helander et al, 2007*), míg tojók esetén két eltérő (rétságokban kb. 750 és 450 bp (*Helander et al, 2007*) hosszúságú terméket eredményez.

A PCR reakció során a kezdeti denaturáló lépést (94°C, 2 perc) követően 36 ciklusban ismétlődtek a denaturáció (94°C, 30 mp), az annelláció (50°C, 1 perc) és az elongáció (72°C, 1 perc) lépései, a végső extenziós szakasz pedig 72°C-on 7 percig tartott. A reakciók 25 µl térfogatban zajlottak (részletesen ld. 3.5. fejezet)

A PCR reakció termékeit 1,5%-os agaróz gélen futtattam meg DNS-létra (GeneRuler 50 bp, Fermentas) mellett (100V, 40 perc). Az elektroforézist követően 5 percig etídium-bromid oldatban festettem meg, majd 10 percig deszillált vízbe helyeztem. A megfestett termékek méreteit ezután UV-asztalra (Vilber Lourmat ECX-20.C) helyezve olvastam le.

3.2. táblázat: A PCR reakciók során vizsgált lókuszok és a legfontosabb információk

Génbanki szám	Lókusz	Primer szekvencia (5'-3')	Termék hossza (bp)	Típus	T (°C)	Publikálta
	Hal-HVR1	F: CCCCCCTATGTATTATTGT R: TCTCAGTGAAGAGCGAGAGA	544	mt (cr)	56	Hailer et al. 2007
AY631064	IEAAAG05	F: GTCTGAATCCAGCACAGGGAC R: GGCAGAAAGCTCATGTTTGC	127-163	ms	56 ¹	Busch et al. 2005
AY631063	IEAAAG04	F: GCATGTAACAAGTTAATGTTGATGG R: GTTGGAACAGGACATGTTAAGC	199-219	ms	56 ¹	Busch et al. 2005
AY631069	IEAAAG14	F: GTCCAGATTCCCTGCTAGAAAGC R: GTTGAGAGTCTAAGCACTGAATCAG	176-188	ms	56 ¹	Busch et al. 2005
AY817040	Hal01	F: GAATACACCCAGAACAGCAACC R: CCCAGCTGTGCTCATAACATAC	128-140	ms	60	Hailer et al. 2005
AY817043	Hal04	F: TAAGGCTTTTCTTCGCGTGT R: TCAACAACCCCTCCGTAGAC	155-163	ms	57	Hailer et al. 2005
AY817048	Hal09	F: TGAGCTTTGTAGTAGCAGTGGTG R: TGCAAAAATAGAGCCAATACCC	133-151	ms	64	Hailer et al. 2005
AY817049	Hal10	F: CATGCACGCTGTGAATCAG R: ACCCACCAACGTTACCAGTG	232-240	ms	64	Hailer et al. 2005
AY817052	Hal13	F: CCACTCAGTAAGGAGCTTTGC R: CCTTGTGTTTGCTGCAGATG	154-168	ms	64	Hailer et al. 2005
AY817053	Hal14	F: GCTGCAGCTCTCTTGACAC R: CAACACTTTCAGCGATGCTC	166-251	ms	60	Hailer et al. 2005
AF469503	Aa35	F: GCAGCAGAAAGTGCATACGA R: GACCAAATGAAATGCGCC	250-264	ms	*	Martínez-Cruz et al. 2002
	CHD1	2550F: GTTACTGATTCGTCTACGAGA 2718R: ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	450; 750 ³	i	50 ²	Fridolfsson és Ellegren 1999

¹: Az annellációs hőmérséklet beállítása Hailer et al. (2006) nyomán történt

²: Az annellációs hőmérséklet beállítása saját optimalizálással történt

³: A két felszaporítható szakasz hossza rétisasok esetén (Helander et al. 2007)

*: 66-50°C annellációs hőmérsékletű „touch-down” reakciót alkalmaztunk (ld. 3.5.1. fejezet)

mt (cr): mitokondriális DNS kontroll régió

ms: mikroszatellita

i: ivari kromoszómához kötött

4. EREDMÉNYEK

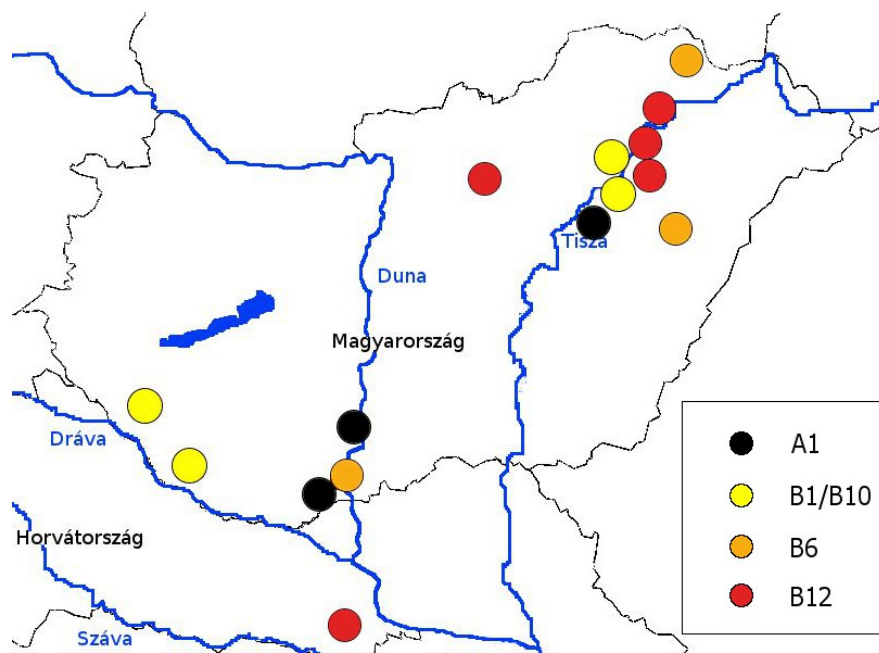
4.1. Molekuláris ivar-meghatározás

Az ivar-meghatározás 61 minta közül két esetben nem sikerült, így összesen 26 hím és 33 tojót azonosítottunk. Az analízisbe bevont mintákban a Kárpát-medence délnyugati területein 13 hím, 16 tojó, a Tisza menti költőterületeken 13 hím és 17 tojó volt az ivarok megoszlása.

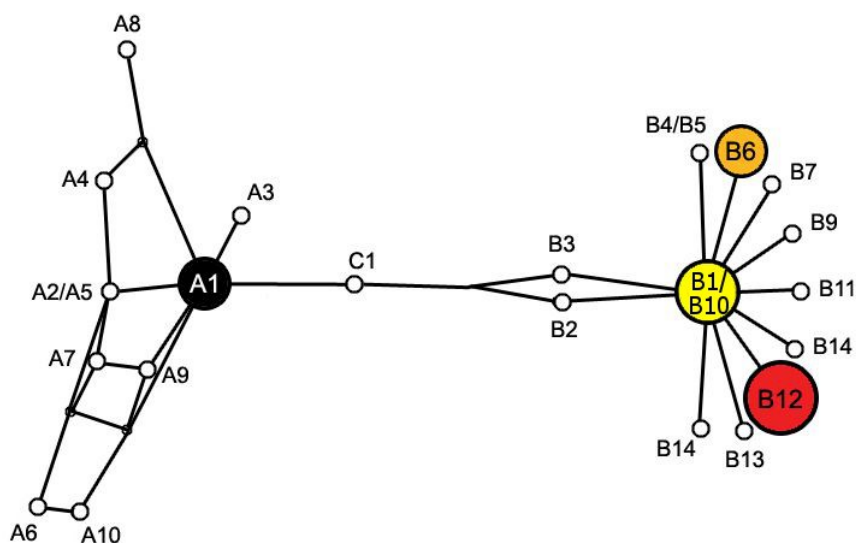
4.2. A mtDNS-szakasz vizsgálata

A mitokondriális kontroll DNS-régió 500 bázispáros szakaszát felszaporító primerek közül a reverz (HalHVRR1, *Hailer et al. 2007*) primerrel történő szekvenálás során rövid leolvasásokat kaptunk, így a vizsgált szakaszt csak 482 bp hosszúságban tudtuk elemezni. Emiatt négy variábilis pozíció az 5' végen nem volt bevonható az analízisekbe, és az eddig leírt 26 haplotípus helyett csak 21 haplotípus szekvenciáival tudtuk összevetni a mintáinkat (4.2. ábra, 4.1. táblázat).

A 18 szekvenált mintából 16 esetben volt vizsgálható a 482 bp-os szakasz. A két azonos fészekből, de különböző évből származó fióka haplotípusa ugyanaz volt (A1), nagy valószínűséggel ugyanattól az anyától származnak, ezért a későbbi analízisekbe csak az egyiküket vettük be. Az így kapott 15 mintában a 482 bp-os szakaszon összesen hat variábilis pozíciót tudtunk azonosítani (az eddig publikált 16-ból), ezek négy haplotípust határoztak meg (4.1. ábra, 4.1. táblázat), melyek mindegyike ismert volt már korábbi vizsgálatokból: A1 (n=3), B1/B10 (n=4), B6 (n=3) és B12 (n=5). A rövidebb leolvasási hossz miatt a B1 és B10 haplotípusok elkülönítése nem volt lehetséges. Mind a négy megtalált haplotípus előfordult mind a Kárpát-medence délnyugati területein (n=6), mind a Tisza menti (n=9) költőterületen (4.1. ábra)



4.1. ábra: A Kárpát-medencében megtalált haplotípusok földrajzi előfordulásai (színessel jelölve).



4.2. ábra: Median-joining hálózat (Splitstree 4.1) az eddig leírt rétisas-haplotípusokkal (a színek megegyezik a 4.1. ábrával).

4.1. táblázat: A 482 bp-os mtDNS-szakaszon azonosított *H. albicilla* haplotípusok és variábilis pozíciók (Hailer et al. 2007; Honnen et al. 2010).

Haplotípus	Génbanki szám	Variábilis pozíciók															
		27	30	41	44	51	92	108	172	177	192	201	236	478	481	494	497
A1	AM156933.1	A	C	T	T	T	A	T	C	A	G	C	T	T	G	C	G
A2/A5	AM156934.1	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	–
	GU134358.1	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	–
A3	AM156935.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	T
A4	GU134347.1	–	–	A	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	–
A6	GU134348.1	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	T	C	–
A7	GU134349.1	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	C	–
A8	GU134350.1	–	–	–	A	C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	–
A9	GU134351.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	C	–
A10	GU134352.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	T	C	–
B1/B10	AM156937.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	–	–	–	–	T	A
	GU134353.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	–	–	–	–	T	A
B2	AM156938.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	–	–	–	–	T	A
B3	AM156939.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	–	–	–	–	T	–
B4/B5	AM156940.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	T	–	–	–	T	A
	AM156941.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	T	–	–	–	T	A
B6	AM156942.1	–	–	–	–	–	G	C	–	–	A	–	–	–	–	T	A
B7	AM156943.1	–	–	–	–	–	–	C	–	G	A	–	–	–	–	T	A
B8	AM156944.1	–	–	–	–	–	–	C	T	–	A	–	–	–	–	T	A
B9	AM156945.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	–	–	–	–	–	T	A
B11	GU134354.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	–	–	–	A	T	A
B12	GU134355.1	–	–	–	–	–	–	C	–	–	A	–	C	–	–	T	A
B13	GU134356.1	–	T	–	–	–	–	C	–	–	A	–	–	–	–	T	A
B14	GU134357.1	T	–	–	–	–	–	C	–	–	A	–	–	–	–	T	A
C1	AM156936.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	–	–	–	–	C	–

Szürkével jelölve a Kárpát-medencében talált haplotípusok és variábilis pozíciók

4.3. Mikroszatellita fragmens-analízis

Az mikroszatellita vizsgálatokba bevont 61 mintából 60 mintánál sikerült mind a 10 lókuszt felszaporítani, így ezek kerültek bele az analízisbe. Közülük 30 származott a Kárpát-medence délnyugati területeiről, és szintén 30 a Tisza hazai szakaszának környékéről. A vizsgált mikroszatellita lókuszok közül a Hal14 monomorfnak bizonyult, így az analíziseket kilenc lókuszon végeztük el.

A genotipizálási hibák ellenőrzése során a Micro-checker szoftver nem talált „dadogásból” (stutter bands) vagy allélkiesésből (large allele dropout) származó hibát, viszont a Hal13 lókuszon nullaléleket azonosított (0.106-es gyakorisággal), így a további analízisek során ezen a lókuszon a Micro-checker által, Oosterhout módszerével, módosított allélgyakoriságokat használtuk.

A kilenc lókuszon összesen 50 allélt azonosítottunk. Közülük a délnyugati populációban összesen 43, a Tisza menti populációban szintén 43 allél fordult elő (részletesen ld. 4.3. ábra és a függelék F.1. táblázata). A populációnkénti allélszámok, a várt, illetve megfigyelt heterozigótia, az átlagos allélszám, az átlagos géndiverzitás, az egyedi allélek számának, valamint a θ populációs paraméter értékeit a 4.2. táblázat mutatja.

A Hardy-Weinberg Egyensúlytól (HWE) csak a Hal13 lókuszt tért el (Genepop 4; $p=0.0559$), feltehetően a Micro-checker által is detektált nullalélek miatt.

A két, földrajzilag elkülönülő állomány (délnyugati és Tisza menti) közötti genetikai differenciáltság igen alacsonynak bizonyult, az összes genetikai variancia minimális részét (1.89%) adta a populációk közötti különbség, az összes variancia 98.11%-a a populációkon belülre esett (AMOVA, Arlequin 3). A két állomány között a páros F_{ST} értéke (Genepop 4) 0.0241, a Nei-féle genetikai távolság (Genetic Studio) értéke 0.046 volt.

A genetikai strukturáltságot becsülő, egyedi mikroszatellita genotípusok alapján klaszterező szoftverek mindegyike a $K=1$ particionálást tartotta a legvalószínűbbnek, vagyis mind a Structure 2.3 (burnin periódus hossza 20.000, 200.000 MCMC lépés, admixture modell, korrelált allélgyakoriságokkal, $\ln \Pr(X|K) = -1176.1$), mind a BAPS (mixture modell, $\log(\text{ml})$ érték = -1248.3462), mind a Geneland (uncorrelated, spatial modell, három független futás 200000 iterációval, átlagos log posterior valószínűség értékei = -1882.28 – -1906.88) úgy becsülte, hogy a Kárpát-medence különböző helyeiről származó rétisasok egyetlen összefüggő populációba tartoznak.

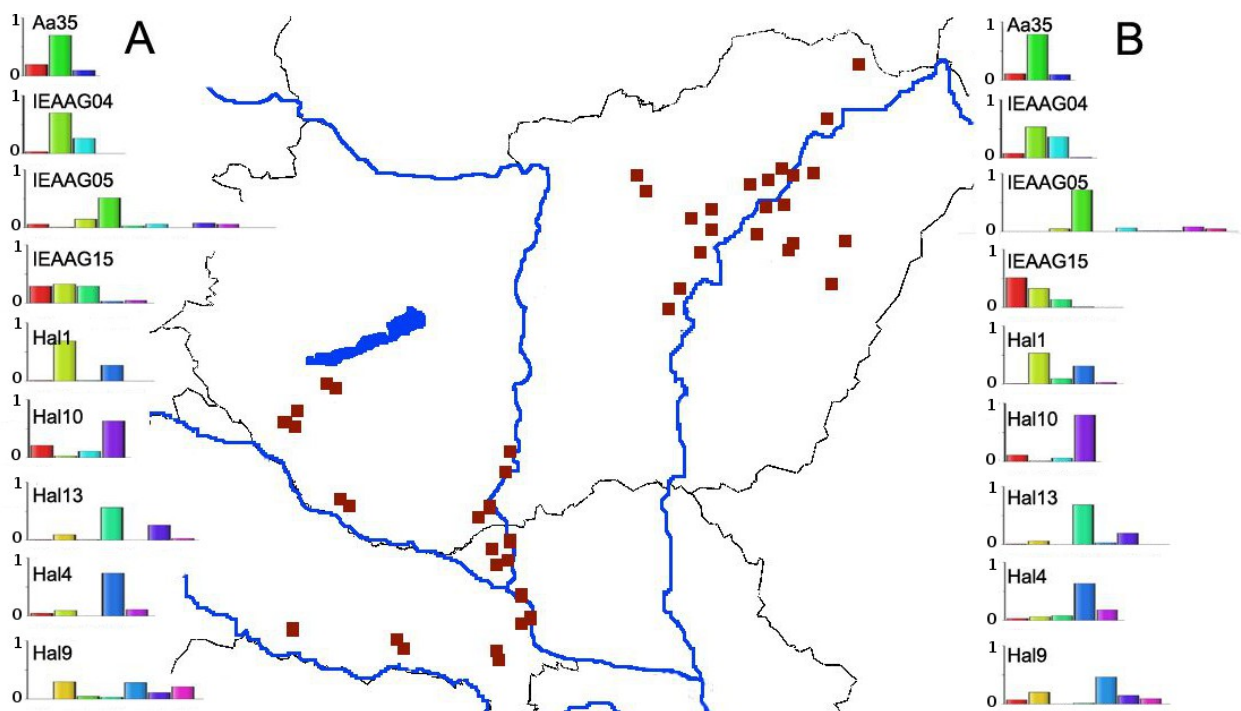
4.2. táblázat: A két földrajzi populáció alapvető mérőszámai a mikroszatellita vizsgálatok alapján

	DNY- Kárpát-medence	Tisza menti területek
Összes allélszám	43	43
Átlagos géndiverzitás	0.56 ± 0.30	0.503 ± 0.28
Átlagos allélszám	4.77 (1.6)	4.77 (1.2)
H_0	0.601 (0.17)	0.559 (0.16)
H_E	0.574 (0.13)	0.531 (0.12)
θ	1.54	1.50
Egyedi allélek száma	7	7

H_0 : tapasztalt heterozigócia

H_E : várt heterozigócia

A zárójelekben a szórás értékek láthatók



4.3. ábra: A vizsgált mikroszatellita lokuszok allélgyakoriságai a délnyugati (A) és Tisza menti (B) állományban

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A Kárpát-medence rétisas-populációja

A mitokondriális kontroll DNS-régió vizsgálata során a Kárpát-medencei mintákban nem találtunk olyan új haplotípust, amelyet a faj észak-, illetve közép-európai populációiban nem írtak le. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a „reverz” primerrel történő sikertelen szekvenálás miatt elvesztettünk néhány variábilis pozíciót, így nem zárható ki a nem-detektált új haplotípusok előfordulása sem.

A mintáinkban azonosított öt potenciális haplotípus közül kettőt (B10, B12) csak Közép-Európában (Ausztria) írtak le eddig (*Honnent et al. 2010*), a B6 haplotípust pedig az eddig vizsgált közép-európai országok közül csak a Cseh Köztársaságban (*Honnent et al. 2010*) találták meg korábban, ezen kívül a svéd lappföldön és a Kola-félszigeten volt jelen (*Hailer et al. 2007*). Az A1 és a B1 haplotípusokat minden vizsgált közép-európai országban, és még számos területen megtalálták (*Honnent et al. 2010; Hailer et al. 2007*).

Adatainkból kiderül, hogy a Kárpát-medencében jelen vannak mind a Pleisztocén kor feltételezhető nyugati refúgiumában (Nyugat-Európa) kialakult (A), mind a keleti refúgiumhoz (Közép-Eurázsia) köthető (B) haplocsoportba tartozó egyedek. E két haplocsoport más európai országokban is nagy fokú keveredést mutat (*Hailer et al. 2007; Honnen et al. 2010*), ami a populációk gyors expanzióját követő keveredéssel hozható összefüggésbe (*Hailer et al. 2007*). A faj egyedei napjainkban is nagy migrációs potenciállal rendelkeznek, hiszen nagy távolságokat tehetnek meg a fiatalok kóborláskor, illetve a telelőterületek eléréséhez is (pl. *Helander 1985b; Dudás 2007; Literák et al. 2007*). A 20. században bekövetkezett populációhanyatlás egész Európát érintette, ami szintén módosíthatja a jelenlegi populációk genetikai vizsgálatának az eredményét.

A vizsgált kilenc mikroszatellita marker analízise alapján a Kárpát-medence délnyugati és Tisza menti területeinek rétisasállománya nagy fokú hasonlóságot mutat. Mind a mitokondriális kontroll DNS-régióban azonosított haplotípusok (nem találtunk olyat, amely csak az egyik állományban lenne jelen), mind a mikroszatellita markerek (a közös allélek nagy aránya, az allélgyakoriságok és a heterozigócia hasonló értékei) alapján valószínűsíthető, hogy a Kárpát-medence rétisasállománya egy nagy területet lefedő, pánmiktikus populációt alkot, és a földrajzilag elkülönülő délnyugati és Tisza menti költőterületek genetikailag nem különíthetők el. Hasonló eredményre jutottak *Literák és munkatársai*, a Cseh Köztársaság eltűnt, majd újra-kolonizált rétisasállományának vizsgálatakor, bár bizonyos mértékig el tudták különíteni az ország északi/délnyugati és a délkeleti állományát. Ez alapján feltételezik, hogy az ország északi és nyugati területeire első

sorban a szomszédos Lengyelországból, a délkeleti területekre pedig a Duna irányából (pl. Szlovákia, Magyarország) érkeztek a mai költőállomány egyedei. (*Literák et al. 2007*)

Érdekes, hogy mintáinkon a Hal14 lókuszmorfot monomorfának bizonyult, mert korábban Svédországban 8 allélt írtak le rajta (*Hailer et al. 2005*). Ez is az észak-európai és a Kárpát-medencei állomány elkülönültségére utal.

5.2. A Tisza hazai területeinek rétisasállománya

A Tiszántúlról feltehetően az 1970-es években eltűnt a rétisas fészkelő állománya, és csak az ország délnyugati területein volt ismert (*Horváth 2009*). A Hortobágyra azonban továbbra is évről évre jelentős számban érkeztek a telelő példányok (15-30 egyed) (*Fintha 1976*). Az első sikeres költést az Alföldön 1987-ben észlelték, és az 1990-es évek elejétől egyre több területen jegyezték fel (Csongrád megye, Hortobágy, Békés megye) (*Horváth 2009*).

A Kárpát-medence délnyugati területeivel mutatott nagy hasonlóság alapján, a Tisza menti területek rétisasállománya nagy valószínűséggel nem származtatható az északabbi költőterületekről (pl. Észtország, Lengyelország, Litvánia, Oroszország: *Dudás 2007*) érkező telelő egyedektől (bár számuk igen jelentős, pl. 1997-ben a Hortobágyon kb. 50-60, Békés megyében kb. 40 telelő egyedet számláltak: *Haraszthy et al. 2003*).

Irodalmi adatok alapján a rétisasok gyakran a kikelésük helyéhez viszonylag közel kezdenek költésbe (pl. *Helander és Stjernberg 2003*; *Hailer et al. 2006*; *Helander 2003a, 2003b*). A Magyarországgal határos országok közül Szlovákiából és Ausztriából nem származhat a populáció, mivel ezekben az országokban nem volt ismert költés a mai tiszai állomány kialakulásakor (*Literák et al. 2007*; *Zuna-Kratký et al. 2000*; *Probst 2002*). Nem zárható ki Horvátország, Szerbia, Ukrajna és Románia rétisasállományainak forrás-populációként való részvétele.

A genetikai vizsgálatunk eredményei alapján valószínűnek tartjuk, hogy a rétisasok a Kárpát-medence déli, illetve délnyugati területein megmaradt állományokból kiindulva, a költőterület expanziója során a Duna, majd a Tisza mentén haladva foglalhatták el újra Magyarország Tiszához kötődő költőterületeit. Eszerint a Dráva, Száva, Dél-Duna mentén élő költőpárok, vagy azok utódai alkotják a mai Tisza menti állományt. A folyók mentén történő terjedést valószínűsíti a vízhez kötött életmódjuk is, és irodalmi adatok alapján a 20. századi hanyatlást követően a Duna-menti országok újra-kolonizációja többé-kevésbé egyszerre zajlott (*Probst és Gaborik 2011*). Az sem zárható ki, hogy a mai Tisza menti költőállomány részben Szerbia, illetve Románia Dél-Dunához, illetve Dél-Tiszához kötődő rétisasállományából származik, melyek a Tisza, illetve esetleg szintén a Duna-mentén észak felé haladva, jutottak el a Tisza északabbi vidékére. Románia rétisasállományának ma közel 90%-

a a Dunához közel költ, de az 1980-as évek elején az országban mindössze 7 fészket ismertek (*Probst és Gaborik 2011*). E területek forráspopulációként való szerepének vizsgálatához további mintagyűjtések és genetikai analízisek szükségesek.

Meg kell jegyeznünk, hogy a Kárpát-medence délnyugati területén (Duna-völgy), és a Tiszántúlon egyaránt jellemző a telelő rétisas egyedek nagyszámú megjelenése (pl. *Bank et al. 2004; Horváth 2009; Haraszthy et al. 2003*). Ezért a Kárpát-medence két részén költő állomány genetikai hasonlósága akkor is fennállhat, ha az északabbi területekről érkező madarak közül mindkét régióban megtelepszik néhány egyed.

Ahhoz, hogy teljes bizonyosságot nyerjünk a Tisza menti területek rétisasállományának eredetét illetően, további vizsgálatokat kell elvégezni, melyek során összehasonlítjuk a Kárpát-medencei minták genotípusait mind a környező, közép-európai populációkkal, mind azon északibb állományokkal, ahonnan származó telelő egyedeket leírtak már a területen.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

A rétisas (*Haliaeetus albicilla*, Linnaeus 1758) ártéri erdőkhöz kötődő, fokozottan védett ragadozó madár, melynek legdélebbi állományai a Kárpát medencében találhatók. Az európai populáció a 20. század elején mutatkozó drasztikus állománycsökkenést követően az 1970-es évektől ismét gyarapodásnak indult. Magyarországon az 1970-es években a teljes költőállományt 2-12 párra becsülték, és feltehetően a Tiszántúl területén egyáltalán nem költött, csupán az Alsó-Duna-völgy területén fészkelte. Napjainkban a hazai állomány meghaladja a 220 költőpárt, és a költőterület is gyors növekedést mutat.

A faj egész elterjedési területén végzett filogeoráfiai vizsgálat a mitokondriális kontroll DNS-régió alapján két nagy haplocsoportot különített el, melyek a faj utolsó nagy eljegesedéskor létezett közép- illetve nyugat-eurázsiai két fő refúgiumára utalnak. Később a Kárpát-medencétől északra költő közép-európai populációkban számos új haplotípust találtak a két haplocsoporton belül, tovább finomítva filogeográfiai ismereteinket. Mindeztidáig viszont a Kárpát-medencei állomány filogeográfiai és populáció-genetikai viszonyait nem vizsgálták.

Kutatásunk során két fő kérdés vizsgálatát tűztük ki célul. Egyrészt feltérképeztük a mitokondriális kontroll DNS-régió egy 500 bázispár hosszúságú szakaszának vizsgálata révén a hazai rétisas-állomány filogeográfiai viszonyait, összehasonlítva Európa más, korábban vizsgált populációival. Ezt a DNS-szakaszt 16 Kárpát-medencei fiókan vizsgáltuk meg.

Másik kérdésünk a Tisza menti költőállomány eredetére vonatkozott. Két fő hipotézisünk szerint ez az állomány származhat (1) Európa északi populációiból ide tömegesen telelni érkező madaraktól, melyek közül néhányan megtelepedhettek a területen, illetve (2) a Kárpát-medence délnyugati fészkelőterületeiről származó madarak juthattak el ide a költőterület expanziója során. E kérdés megválaszolásához 61, a Kárpát-medence különböző területein kikelt fióka egyeden kilenc mikroszatellita lókusz segítségével vizsgáltuk a délnyugati és a Tisza menti költőállomány genetikai szerkezetét. A DNS-mintákat a faj gyűrűs jelölési programja keretében végzett gyűrűzéskor tépett fiókatollak szolgáltatták.

Eredményeink azt mutatják, hogy a Kárpát-medencében megtalálható mindkét nagy haplocsoport a vizsgált mtDNS-régióból. A délnyugati és Tisza menti állományok nem mutatnak genetikai strukturáltságot, így a Kárpát-medence rétisas-állománya egy összefüggő populációnak tekinthető. Mindezek arra utalnak, hogy a hazai Tisza menti területek költőállománya alapvetően a Kárpát-medence délnyugati területeiről származhat.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Szabó Krisztiánnak mind a témáért, mind a munka közben kapott számos segítségért, hasznos tanácsért.

Köszönöm továbbá Horváth Zoltánnak, a Duna-Dráva Nemzeti Park munkatársának, valamint Tihanyi Gábornak, a Hortobágyi Nemzeti Park munkatársának hogy a vizsgálathoz elengedhetetlen mintákat és információkat biztosították a kutatáshoz. A tollminták gyűjtéséért köszönettel tartozom az illetékes nemzeti parkok többi, gyűrűzést végző munkatársainak is.

Köszönöm, hogy kutatómunkámhoz a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Biológiai Intézete laboratóriumot biztosított, és köszönöm a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriuma munkatársainak, Krizsik Virágnak és Tuschek Máriának a szekvenálási munkákban nyújtott segítséget. A molekuláris munkák pénzügyi háttérét a Duna-Dráva Nemzeti Park biztosította.

IRODALOMJEGYZÉK

- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. (1999)** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: pp.37-48
- Bank L, Deme T, Horváth Z, Kalocsa B, Tamás E. (2004)** Population changes of the White-tailed Eagle *Haliaeetus albicilla* in Hungary, with special attention to the lower Hungarian Danube-valley, 1987-2003. *Raptors Worldwide* (eds.: Chancellor RD and Meyberg B-U; proceedings of the VI world conference on Birds of Prey and Owls): pp. 529-536.
- Beretz P. (1955)** Újabb adatok a szegedi Fehértó madárvilágához 1949-1953. *Aquila* 59/62: pp. 217-227.
- Birdlife International. (2004)** Birds in Europe: Population Estimates, Trends and Conservation Status. BirdLife International (BirdLife Conservation Series No. 12) Cambridge, UK: 374 pp.
- Böröczky K. (1957)** Ragadozómadarak, feketególya és feketeharkály fészkelése a gemenci vadvédelmi területen. *Aquila* 63/64: pp. 270, 334.
- Breuer Gy. (1955)** A rétisas fészkelése Varáslón. *Aquila* 59/62: pp. 379, 437.
- Busch JD, Katzner TE, Bragin E, Keim P. (2005)** Tetranucleotide microsatellites for *aquila* and *haliaeetus* eagles. *Molecular Ecology Notes* 5: pp. 39-41.
- Chernel I. (1899)** Rétisas. Magyarország madarai különös tekintettel gazdasági jelentőségökre (ed.: Chernel I; Második könyv, Budapest): pp. 399-402.
- Corander J, Waldmann P, Sillampää. (2003)** Bayesian Analysis of Genetic Differentiation Between Populations. *Genetics* 163,1: pp. 367-374.
- Cramp S. (1982)** (ed.) The Birds of Western Palearctic. Vol. II. Oxford University Press, 695 p.
- Deme T, Mikusa T, Mórocz A. (2009)** Adatok a rétisas táplálkozásához a Duna mentén, Gemenctől a Kopácsi rétig. Élet a Duna-ártéren, Konferencia (BITE) pp. 50-55.
- Dementavičius D, Treinys R. (2009)** Nest-site attendance of the resident white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) outside the breeding season. *Acta Zoologica Lituanica* 19, 1: pp. 10-17.
- Dementavičius D. (2004)** Common buzzard (*Buteo buteo*) and white-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*): breeding parasitism or atypical feeding behaviour? *Acta Zoologica Lituanica* 14, 1: pp. 76-79.
- Dementavičius D. (2007)** White-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Lithuania: population numbers and trends 1900-2007. *Acta Zoologica Lituanica* 17, 4: pp. 281-285.
- Dudás DM. (2007)** A rétisas (*Haliaeetus albicilla*) védelme a Hortobágyi Nemzeti Park

- működési területén. Debreceni Egyetem, szakdolgozat (Debrecen, 2007).
- Dyer RJ. (2009)** GeneticStudio: A suite of programs for the spatial analysis of genetic marker data. *Molecular Ecology Resources* 9: pp. 110-113.
- Elliott KH, Cesh LS, Dooley JA, Letcher RJ, Elliott JE. (2009)** PCBs and DDE, but not PDBEs, increase with trophic level and marine input in nestling bald eagles. *Science of the Total Environment* 407: pp. 3867-3875.
- Eulaers I, Covaci A, Herzke D, Eens M, Sonne C, Moum T, Schnug L, Hanssen SA, Johnsen TV, Bustnes JO, Jaspers VL. (2011)** A first evaluation of the usefulness of feathers of nestling predatory birds for non-destructive biomonitoring of persistent organic pollutants. *Environmental International* 37: pp. 622-630.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2005)** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: pp. 47-50.
- Fintha I. (1976)** The White-tailed Eagle (*Haliaeetus albicilla* L.) in Hortobágy – A rétság a Hortobágyon. *Aquila* 83: pp. 243–259.
- Fleischer RC, Storrs LO, James HF, Cooper AC. (2000)** Identification of the Extinct Hawaiian Eagle (*Haliaeetus*) by mtDNA Sequence Analysis. *The Auk* 117, 4: pp. 1051-1056.
- Fridolfsson AK, Ellegren H. (1999)** A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: pp.116-121.
- Ganusevich S. (1996)** The White-tailed Sea Eagle *Haliaeetus albicilla* in Kola Peninsula. *Eagle Studies* (eds.:Meyburg B-U, Chancellor RD; 1996): pp. 47-50.
- Gemmell N, Akiyama S. (1998)** An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. *Trends in Genetics* 12: pp. 338-339.
- Griffiths R, Korn RA. (1997)** CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197, 1-2: pp. 225-229.
- Griffiths R, Tiwari B. (1995)** Sex of the last wild SpixOs macaw. *Nature* 375: pp. 454.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A. (2005)** Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: pp. 712-715.
- Hailer F, Gautschi B, Helander B. (2005)** Development and multiplex PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves: Falconiformes, Accipitridae). *Molecular Ecology Notes* 5, 4: pp. 938-940
- Hailer F, Helander B, Folkestad AO, Ganusevich SA, Garstad S, Hauff P, Koren C, Masterov VB, Nygård T, Rudnick JA, Shiraki S, Skarphedinsson K, Volke V, Wille F, Vilà C. (2007)** Phylogeography of the white-tailed eagle, a generalist with large dispersal capacity. *J. Biogeogr.* 34: pp. 1193-1206.

- Hailer** F, Helander B, Folkestad AO, Ganusevich SA, Garstad S, Hauff P, Koren C, Nygård T, Volke V, Vilà C, Ellegren H. **(2006)** Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline. *Biology Letters* 2: pp. 316-319.
- Ham** I, Mikuska J, Schneider M, Gec D. **(1990)** Recoveries and sightings of banded and wingtagged White-tailed Eagles in Yugoslavia during 1985-1988. *Larus* 41-42: pp. 69-86.
- Haraszthy** L, **Bagyura** J. **(1993)** Ragadozómadár-védelem az elmúlt 100 évben Magyarországon. *Aquila* 100: pp.105–121.
- Haraszthy** L, Horváth Z, Kalocsa B. **(2003)** Rétisas. Veszélyeztetett madarak fajvédelmi tervei (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME), Budapest) pp. 47-56.
- Harrison** CJO. **(1988)** Bird Bones from Soldier's Hole Cheddar, Somerset. *UBSS Proceedings* 18, 2: pp. 258-264.
- Helander** B, **Stjernberg** T. **(2003)** (eds.) Action plan for the conservation of white-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*). (Recommendation 92/2002 adopted by the Standing Committee of the Bern Convention in December 2002.) BirdLife International
- Helander** B, Hailer F, Vilà C. **(2007)** Morphological and genetic sex identification of white-tailed eagle *Haliaeetus albicilla* nestlings. *J Ornithol* 148: pp. 435-442.
- Helander** B, Olsson A, Bignert A, Asplund L, Litzén K. **(2002)** The Role of DDE, PCB, Coplanar PCB and Eggshell Parameters for Reproduction in the White-tailed Sea Eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Sweden. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 31, 5: pp.386-403.
- Helander** B. **(1985) a** Reproduction of the white-tailed sea eagle *Haliaeetus albicilla* in Sweden. *Holarctic Ecology* 8, 3: pp. 211-227.
- Helander** B. **(1985) b** Colour-ringing of White-tailed Sea Eagles in northern Europe. *Conservation Studies On Raptors* (eds.: Newton I, and Chancellor RD; International Council for Bird Preservation, Cambridge, UK): pp. 401-407.
- Helander** B. **(2003) a** The White-tailed Sea Eagle in Sweden – reproduction numbers and trends. *Sea Eagle 2000* (eds.: Helander B, Marquiss M, BOWERMAN W; Proceedings from an international conference at Björko, Sweden, 13-17 September 2000. Swedish Society for Nature Conservation/SNF & Atta.45 Tryckeri AB. Stockholm): pp. 57-66.
- Helander** B. **(2003) b** The international colour-ringing programme - adult survival, homing, and the expansion of the White-tailed Sea Eagle in Sweden. *Sea Eagle 2000* (eds.: Helander B, Marquiss M, BOWERMAN W; Proceedings from an international conference at Björko, Sweden, 13-17 September 2000. Swedish Society for Nature Conservation/SNF & Atta.45 Tryckeri AB. Stockholm): pp. 145-167.

- Honnen A-C, Hailer F, Kenntner N, Literák I, Dubská L, Zachos FE. (2010)** Mitochondrial DNA and nuclear microsatellites reveal high diversity and genetic structure in an avian top predator, the white-tailed eagle, in central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: pp. 727-737.
- Horváth L. (1952)** Ornithológiai megfigyelések a bellyei Réten. *Aquila* 59/62: pp. 205-215.
- Horváth Z, Pintér T. (2005)** A hazai rétisas (*Haliaeetus albicilla*)-állomány fészkelőhely-választása a 2000. év felmérései alapján. *Aquila* 112: pp. 23–32.
- Horváth Z. (2006)** Further observations on Common Buzzard (*Buteo buteo*) chick found in a White-tailed Eagle (*Haliaeetus albicilla*) nest.
- Horváth Z. (2009)** White-tailed Eagle (*Haliaeetus albicilla*) populations in Hungary between 1987-2007. *Denisia* 27: pp. 85-95.
- Huson DH, Bryant D. (2006)** Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23,2: pp. 254-267.
- Ihaka R, Gentleman R. (1996)** R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: pp. 299-314.
- Kjellén N, Roos G. (2000)** Population trends in Swedish raptors demonstrated by migration counts at Falsterbo, Sweden 1942-97. *Bird Study* 47: pp. 195-211.
- Koeman JH, Hadderingh RH, Bijleveld MFIJ. (1972)** Persistent pollutants in the white-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*) in the Federal Republic of Germany. *Biological Conservation* 4,5: pp. 373-377.
- Kolisnyk J, Gorban I. (1996)** The white-tailed eagle *Haliaeetus albicilla* in Ukraine. *Eagle Studies* (eds.:Meyburg B-U, Chancellor RD; 1996): pp.165-168
- Kovács G. (1984)** A hortobágyi halastavak madárvilága 10 év megfigyelései alapján. *Aquila* 91: pp. 21-46.
- Lambrecht K. (1914)** Fossilis szakállas saskeselyű -Gypaetus barbatus L.- és rétisas -Haliaeetus albicilla L.- a borsodi Bükkben. *Aquila* 21: pp. 85-88.
- Lerner HRL, Mindell DP. (2005)** Phylogeny of eagles, Old World vultures, and other Accipitridae based on nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: pp. 327-346.
- Literák I, Mraz J. (2011)** Adoptions of Young Common Buzzards in White-tailed Sea Eagle Nests. *The Wilson Journal of Ornithology* 123,1: pp. 174-176.
- Literák I, Mrlík V, Hovorková A, Mikulíček P, Lengyel J, Št'astný K, Cepák J, Dubská L. (2007)** Origin and genetic structure of white-tailed sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) in the Czech Republic: an analysis of breeding distribution, ringing data and DNA microsatellites. *European Journal of Wildlife Research* 53: pp. 195-203.

- Lydekker R. (1891)** (ed.) Catalogue of the fossil birds in the British Museum. British Museum, London. pp. 23-24.
- Mannermaa K. (2003)** Birds in Finnish prehistory. *Fennoscandia archaeologica* XX, pp. 3-39.
- Markis M. (2010)** Feather tip monitoring of Marek's disease virus in experimental and commercial settings. Faculty of the University of Delaware: Master thesis.
- Martínez-Cruz B, David VA, Godoy JA, Negro JJ, O'Brien SJ, Jhonson WE. (2002)** Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes* 3: pp. 323-326.
- Mikuska J. (1978)** Seeadler (*Haliaeetus albicilla*) im Naturschutzgebiet Kopácsi-rét und in der Umgebung – A rétisasok (*Haliaeetus albicilla* L., 1758) a Kopácsi-rét természetvédelmi rezervátum területén és környékén. *Aquila* 85: pp. 45-47.
- Mikuska T. (2009)**: A review of recent knowledge on White-tailed Eagles in Croatia. *Denisia* 27: pp. 115- 126.
- Morin PA, Messier J, Woodruff DS. (1994)** DNA extraction, amplification, and direct sequencing from hornbill feathers. *J.Sci. Soc. Thailand* 20: pp. 31-41.
- Nagy J. (1924)** A Hortobágy madárvilága. *Aquila* 30/31: pp. 272-279, 279-288.
- Nygård T, Skaare JU. (1998)** Organochlorines and Mercury in Eggs of White-tailed Sea Eagles *Haliaeetus albicilla* in Norway 1974-1994. *Holarctic Birds of Prey ADENEX-WWGBP* (eds.: Chancellor RD, Meyburg B-U & Ferrero JJ, 1998) pp. 501-524
- Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. (2004)** Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4,3: pp. 535-538.
- Palkó S. (1997)** Rétság (*Haliaeetus albicilla*) által nevelt egerészölyv (*Buteo buteo*) fiókák *Common Buzzard nestlings reared by White-tailed Eagle*. *Túzok* 2,3: pp. 109-111.
- Pocora V. (2010)** Diurnal birds of prey (Aves) from Letea Forest (The Danube Delta Biosphere Reservation, Romania). *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle „Grigore Antipa”* 53: pp. 303-318
- Pritchard JK, Wen W. (2003)** Documentation for Structure software: version 2.
- Probst R (2002)** Bestandsentwicklung und Schutz des Seeadlers (*Haliaeetus albicilla*) in Österreich. *Corax* 19, Sonderheft 1: pp. 92– 95.
- Probst R, Gaborik A. (2011)** Action Plan for the Conservation of the White-tailed Sea Eagle (*Haliaeetus albicilla*) along the Danube. c/o Donau-Auen National Park Schloss Orth, Austria.

- Radović A, Mikuska T. (2009)** Population size, distribution and habitat selection of the white-tailed eagle *Haliaeetus albicilla* in the alluvial wetlands of Croatia. *Biologia* 64,1 pp.156-164.
- Raymond M, Rousset F. (1995)** Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity* 86, 3: pp. 248-249.
- Sándor I, Ecsedi Z. (2004)** Rétság (*Haliaeetus albicilla*). A Hortobágy madárvilága. (ed.: Ecsedi Z; Hortobágy Természetvédelmi Egyesület, Winter Fair Kiadó): pp. 198-200.
- Schenk J. (1929):** Réti sas. Madarak III. kötet, Brehm: Az állatok világa. Gutenberg Könyvkiadóvállalat, Budapest. Újabb kiadás (10): 1995, Kassák Kiadó, Budapest: pp. 181-183.
- Schreiber A, Weitzel T. (1995)** Biochemical Systematics of Sea Eagles (Genus *Haliaeetus* Savigny 1809), with a Note on Allozyme Differentiation Between Black and Red Kites (Genus *Milvus* L. 1758). *Biochemical Systematics and Ecology* 23,3: pp. 235-244.
- Shiraki S. (2002)** Post-fledging Movements and Foraging Habitats of Immature White-tailed Sea Eagles in th Nemuro Region, Hokkaido, Japan. *J Raptor Res* 36,3: pp. 220-224.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK. (2000)** The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol* 132: pp. 115–130.
- Sterbetz I. (1993)** A rétság (*Haliaeetus albicilla* L., 1758) állományának pusztulása a Tisza Csongrád megyei szakaszán. *Állattani közlemények* 79: pp. 105–112.
- Sulawa J, Robert A, Köppen U, Hauff P, Krone O. (2010)** Recovery dynamics and viability of the white-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Germany. *Biodivers Conserv* 19: pp. 97-112.
- Tevely R. (1996)** The Status of the White-tailed Sea Eagle *Haliaeetus albicilla* in Hungary. *Eagle Studies* (eds.:Meyburg B-U, Chancellor RD; 1996): pp. 147-148
- Thompson, JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2002)** UNIT 2.3 multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*: 2.3.1–2.3.22.
- Wiemeyer SN, Lamont TG, Bunck CM, Sindelar CR, Gramlich FJ, Fraser JD, Byrd MA. (1984)** Organochlorine Pesticide, Polychlorobiphenyl, and Mercury Residues in Bald Eagle Eggs – 1969-79 – and Their Relationships to Shell Thinning and Reproduction. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13: pp. 529-549.
- Wildburg A. (1897)** Adatok a réti-sas természetrajzához. *A Természet* 8: pp. 1-2.
- Wille F, Kampp K. (1983)** Food of the white-tailed eagle *Haliaeetus albicilla* in Greenland. *Holarctic Ecology* 6, 1: pp. 81-88.
- Zuna-Kratký T, Kalivodová E, Kurthy A, Horal D, Horák P. (2000)** Die Vögel der March-Thaya-Auen im österreichisch-slowakisch-tschechischen Grenzraum. Distelverein.

Deutsch Wagram.

ON-LINE FORRÁS:

IUCN: BirdLife International 2012. *Haliaeetus albicilla*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1.: www.iucnredlist.org, Letöltés időpontja: 2012.10.10.

FÜGGELÉK

F.1. táblázat: Mikroszatellita allélgyakoriságok a Kárpát-medencében.

Lókuszek	Allélek (bp)	DNY- Kárpát-medence	Tisza menti területek
Hal01	132	1	1
	134	40	32
	136	1	6
	138	16	19
	142	0	2
Hal04	154	3	2
	156	6	4
	158	0	5
	160	44	38
	162	7	11
Hal09	127	0	4
	133	18	11
	137	3	0
	139	2	1
	141	17	25
	143	7	8
	145	13	5
Hal10	232	13	7
	234	2	1
	236	7	4
	238	38	48
Hal13	149	1	1
	151	6	4
	155	1	0
	157	34	41
	159	0	2
	161	16	12
	165	2	0
	202	2	5
IEAAAG04	206	42	32
	210	16	21
	214	0	1
	133	4	0
IEAAAG05	137	1	0
	141	9	3
	145	31	43
	149	2	0
	153	4	4
	157	0	1
	161	5	1
	169	4	5
	180	0	3
	174	17	30
IEAAAG14	178	19	19
	182	17	8
	186	2	1
	190	3	0
	239	12	7
Aa35	241	42	47
	245	6	6