



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM. ÖKOLÓGIAI TANSZÉK.
KONZERVÁCIÓGENETIKAI KUTATÓCSOPORT AQUILABOR
Budapest 1077, Rottenbiller u 50. tel: 478-4213/8753 e-mail: aquilabor@gmail.com

Kutatási jelentés a Parlagi sas védelme Magyarországon (LIFE10 NAT/HU/000019) projekt részére - Túlélésbecslés eredménye MARK capture-recapture programmal a 2011-2016-os időszakra

Készítették:

Dr. Pásztory-Kovács Szilvia, Zsinka Bernadett, Dr. Kövér Szilvia
ÁTE Ökológiai Tanszék, Konzervációgenetikai Kutatócsoport



Budapest, 2017.04.12.

Módszerek: mintázás és DNS-kivonás

A 2011-2016-os terepi években a parlagi sas magyarországi költőterületeiről kb. 200 teritóriumból álltak rendelkezésünkre felnőtt madaraktól származó vedlett tollminták (összesen kb. 3000 db.), ezek közül kb. 1500-ból vontuk ki (GeneAid és NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) kit segítségével) a teljes genomi DNS-t.

Módszerek: Ivar-meghatározás és egyedi genotipizálás

A mintákon a CHD1 gén intronjaihoz kötődő primerekkel (F2250/R2787, i16F/i16R; Fridolfsson and Ellegren 1999, Suh et al., 2011) molekuláris ivar-meghatározást végeztünk. Amennyiben egy teritóriumból több tollunk is volt, igyekeztünk mindkét szülőtől származó tollat beazonosítani és genotipizálni.

Ha az adott évben sem a tojótól, sem a hímtől nem állt a rendelkezésünkre vedlett tollminta, akkor két különböző fiókájuk hónalj tollából származó DNS-mintát használtuk annak eldöntésére, hogy az adott évben lecserélődtek-e a szülők, vagy pedig nem.

A költő madarak egyedi azonosításához lehetőleg minél több variábilis lókuszon kell az genotipizálást elvégezni, hogy kellő felbontást adjon, és a közeli rokon (pl. szülő-utód, testvér) egyedek

is elkülöníthetők legyenek. Ezért igyekeztünk minél több, sokalléles markert bevonni a vizsgálatba, támaszkodva a korábbi évek tapasztalataira.

A 2011-es minták genotipizálása során 10 mikroszetellita lókuszt használtunk (IEAAAG04, IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG12, IEAAAG15, Aa02, Aa27, Aa36, Aa39 és Aa56) (Busch et al. 2005, Martínez-cruz et al. 2002). Ezeken a lókuszon összesen 50 allélt találtunk, de több lókuszt variabilitása is alacsony volt (csak 2-3 allélt tartalmaztak). Ezért a 2012-es mintáknál már 14 mikroszetellita markert vizsgáltuk (az előbb említettek mellett az IEAAAG13, IEAAAG14, Aa35 és Aa49 lókuszt is), összesen 69 lehetséges alléllal. A 2013-as minták esetében viszont újra csak 13 lókuszt használtunk, a csupán két alléles G14-et mellőztük. A három korábbi év adatait feldolgozva a 2014-es és 2015-ös, valamint a 2016-os évi mintákat első körben már csak kilenc lókuszon vizsgáltuk, kihagyva a genotipizálási hibákkal terhelt (aa27, G13, G15, aa56), vagy alig változékony (G04) lókuszt, viszont bevonva a rétisásra tervezett Hal04 és Hal10 markereket (Hailer et al. 2005). Ezzel a markerkészlettel összesen 57 lehetséges allélt azonosítottunk. Kérdéses esetekben a korábbi években használt többi markerrel is genotipizáltuk a 2014-2016-os mintákat, valamint a korábbi évek mintáit is igyekeztünk újra PCR-ezni az újabban bevont markerekkel, hogy minél biztosabb egyedi azonosítást kapjunk (a teljes markerkészletben összesen 80 allélt találtunk a populációban, lásd 1. táblázat)

		aa02	aa27	aa35	aa36	aa39	aa43	aa56	G04	G09	G11	G12	G13	G14	G15	Hal04	Hal10
összesen	80 allél	7	3	10	6	10	6	6	4	4	4	2	4	2	2	5	5
2014-2016	57 allél	7		10	6	10	6			4	4					5	5

1. táblázat: A molekuláris egyedi azonosításhoz használt mikroszetellita markerek és allélszámaik

Módszerek: Túlélésbecslés

A genotípusok alapján megszerkesztettük minden évre a jelenlét-hiány táblázatunkat, ami megmutatja, hogy az adott évben a madár genotípusa előfordult-e a költőpopulációban (1), vagy pedig nem (0). A modellekben szereplő hét év során felhasznált költő hímek és tojók jelenlét-adatait a 2. táblázat mutatja. A hímek vedlett tollait kisebb valószínűséggel találjuk meg a fészkek alatt, mint a tojókét, mivel a hím jóval kevesebb időt tölt a fészkek közelében, így kevesebb hímot sikerült egyedileg azonosítani a költőterritóriumokból az egyes években.

2. Táblázat: A fogás-visszafogás modellek túlélés-becsléshez felhasznált hímek és tojók száma éves bontásban.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
hím	6	39	38	39	31	40	31
tojó	26	90	71	80	94	106	105
összesen	32	129	109	119	125	146	136

A költő egyedek vedlett tollakból, genetikai alapon való azonosítását jelölés-visszafogásként értelmeztük és ennek megfelelően elemeztük, abból a célból, hogy éves túlélési valószínűségeket becsüljünk. Egy adott egyed vedlett tollból való azonosítását az első alkalommal jelölésnek, a további alkalmaknál visszafogási eseménynek tekintettük. Ha egy egyedet nem sikerült egy adott évben megmintázni, de a korábbi évekből ismertük az adott territóriumhoz tartozó rezidens genotípusát és a fiókák genotípusa alapján bizonyítani tudtuk, hogy az előző években megmintázott rezidens egyed a fészkekben meggyűrűzött fiókák szülője, akkor úgy tekintettük, mintha a korábbi évekből ismert rezidens egyedet visszafogtuk vagy visszaláttuk volna. Ezt a fiókákból következtetett jelenlétet „becsült jelenlétnek” neveztük, és a fogástörténetekben nem különböztettük meg a vedlett toll alapján megállapított jelenléttől. Az intenzíven mintázott 2011-2016 éveket megelőző 2010-es év adatait is belevettük a fogástörténetekbe, mert így néhány madárral megnövekedett a jelölt egyedek száma, amelyek visszafogási adatait felhasználva tudjuk megbecsülni a 2011-2016 években a parlagi sasok túlélési valószínűségeit.

A jelölés-visszafogás adatokból nyert fogástörténetekhez a nyitott populációkra alkalmas Cormack-Jolly-Seber modellt illesztettük (Amstrup et al. 2010) a MARK8.1 szoftver segítségével (White & Burnham 1999). A jelölés-visszafogásos elemzés általánosított lineáris modell paramétereiként képes becsülni az éves túlélési valószínűségeket külön-külön minden egyéves időintervallumra, és a modell további paramétereiként becsli az egyes évekre a fogási valószínűségeket is. Azonban az utolsó intervallum túlélési valószínűsége nem becsülhető az utolsó éves fogási valószínűségtől függetlenül, a módszer az utolsó évben visszafogott jelölt egyedek alapján csak a két valószínűség szorzatát tudja becsülni. Így az utolsó időszak hím és tojó túlélési valószínűségeit csak akkor tudjuk megbecsülni, ha a fogási valószínűséget egyéb információk, pl. a mintavétel intenzitása alapján megbecsüljük és a modellben fix paraméterként állítjuk be. A fix paraméteres modellek másik előnye, hogy csökken a modellben becsülendő paraméterek száma, a kevesebb paraméter pedig pontosabban becsülhető. Ezért a modellt két fő változatban készítettük el:

- (i) A fogási és túlélési valószínűségeket ivartól és időtől (évtől) függő paraméterként állítottuk be, illetve
- (ii) A fogási valószínűségeket fix paraméterként állítottuk be, (a modelltől függetlenül, a mintavétel intenzitásából becsülve), a túlélési valószínűségeket pedig ivartól és időtől (évtől) függő paraméterként állítottuk be.

A második modellben használt fix fogási valószínűségeket az adott évben megmintázott egyedek számának és a mintavételi területre eső territóriumok számának (lehetségesen megmintázható fészkek száma) hányadosaként számítottuk ki. A lehetséges megmintázható fészkek számát, a megmintázott egyedek számát és a fogási valószínűségeket a hímekre és a tojókra külön-

külön évenként a 3. táblázat mutatja. Mivel a hímek vedlett tollait kisebb valószínűséggel találjuk meg a fészkek alatt, így vannak olyan territóriumok, ahol a vizsgálati időszak alatt nem sikerült egyetlen egy hím tollat sem azonosítani. Ez okozza, hogy a megmintázható fészkek száma a hímeknél kisebb, mint a tojóknál.

A mintázható fészkek számának évenkénti újraszámolására azért volt szükség, mert a populáció folyamatosan növekedett az elmúlt hét évben, egyre több fészkek volt a mintaterületen, ezért a fogási valószínűségek is különböztek az egyes években. Az utolsó évben, bár a mintaelemszám nem csökkent jelentősen a korábbi évekhez képest, a költőpopuláció növekedése miatt a fogási valószínűség lecsökkent és ezt az (i) modell (teljesen időfüggő Cormack-Jolly-Seber modell) nem tudja figyelembe venni, mert az utolsó időszakra csak a fogási és túlélési valószínűségek szorzatát tudja megbecsülni. A fix fogási valószínűségek beállításával azonban az utolsó évben is pontos becslést kaptunk a túlélésre az (ii) modellben.

3. Táblázat: A lehetségesen megmintázható fészkek száma a hímekre és a tojókra, a megmintázott egyedek száma, illetve az ezek alapján számolt fogási valószínűségek.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
mintázott hím	6	39	38	39	31	40	31
mintázott tojó	26	90	71	80	94	106	105
összes mintázható hím	73	83	83	85	87	95	98
összes mintázható tojó	106	126	129	132	139	156	178
fogási valószínűség hím	0,082	0,458	0,458	0,447	0,356	0,421	0,316
fogási valószínűség tojó	0,245	0,714	0,55	0,606	0,676	0,679	0,59

Mivel (i) és (ii) egymásba ágyazott modellek, közöttük, illetve a kevesebb paramétert tartalmazó (időfüggetlen, ivarfüggetlen) változataik között AIC alapú modell-szelekciót végeztünk (Hurvich & Tsai 1995).

Eredmények:

A 2010-2011 időszakra nem kaptunk értékelhető túlélés-becslést a kis egyedszám miatt, ezért ezt az évet nem tüntettük fel az ábrákon, csak az intenzíven mintázott 2011-2016-os időszakot.

A modell-szelekció eredményeit a 4. táblázat mutatja, ennek alapján a többi modellnél szignifikánsan jobbnak bizonyult a fix fogási valószínűségeket tartalmazó (ii) modell változatai közül a **$\phi(g+t)p(\text{fix})$** (Delta AICc=5.829), mint az (i) fogási valószínűségeket becsülendő paraméterként tartalmazó modell bármelyik változata. Az (i) változatai közül a **$\phi(g+t)p(g)$** volt a legjobb és a **$\phi(g)p(g)$** a második legjobb, de támogatottságuk nem különbözött szignifikánsan (Delta AICc<2).

4. táblázat: Modell-szelekció eredménye: A három legtámogatottabb modell AICc és Delta AICc értéke.

Model	AICc	Delta AICc
{Phi(g+t) p(fix)}	1345.5975	0.0000
{Phi(g+t) p(g)}	1351.4265	5.8290
{Phi(g) p(g)}	1353.1052	7.5077

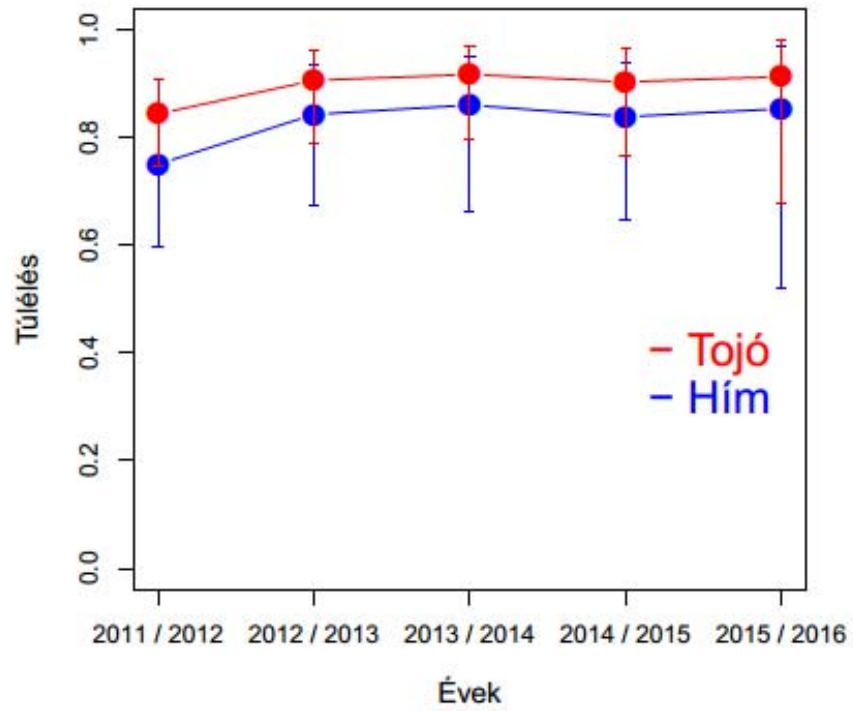
A **$\phi(g+t)p(fix)$** modellben a **ϕ** túlélési valószínűség évenként és ivaronként különbözik és a **p** fogási valószínűségeket fix paraméterként állítottuk be.

A **$\phi(g+t)p(g)$** modellben a **ϕ** túlélési valószínűség évenként és ivaronként különbözik és a **p** fogási valószínűség ivaronként eltér, de az időben állandó. A **$\phi(g)p(g)$** modellben a **ϕ** és a **p** is ivaronként eltér, de az időben állandó.

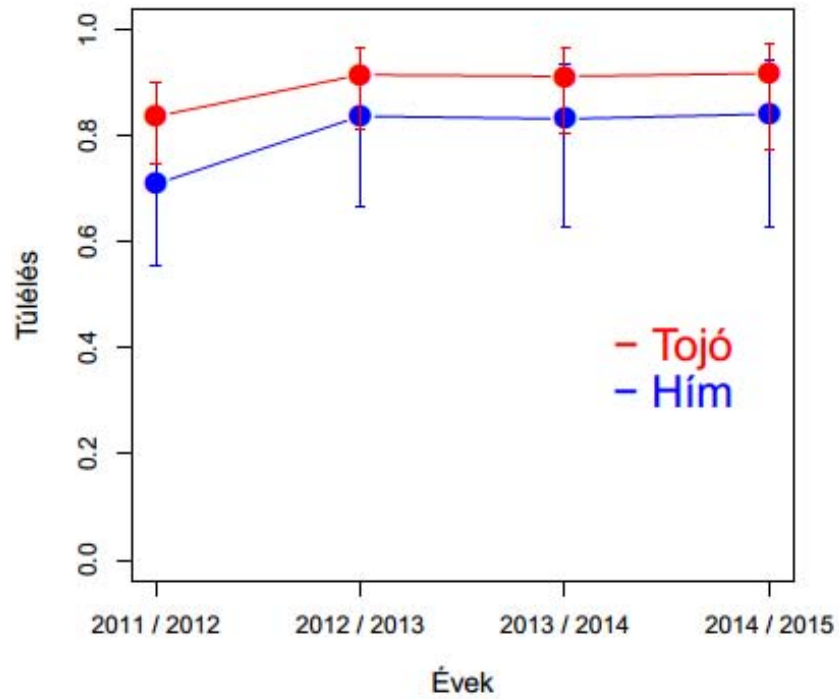
A modell-szelekcióban a fent részletezett három legjobb modell egyike sem tartalmazott interakciót az idő és az ivar között, vagyis a hímek és a tojók túlélésének évek közötti változása hasonló irányú volt. A hímek túlélésére vonatkozó becslések bizonytalanabbak, a nagyobb konfidencia-intervallumok oka, hogy még a becslt jelenlétekkkel együtt is jóval kevesebb hím fogástörténetet tudtunk készíteni, mint tojót. A **$\phi(g+t)p(g)$** modell az utolsó évre nem képes a túlélést megbízhatóan becsülni, ezért ebből a modellből csak 2015-ig kaptunk becsléseket (5. táblázat, 1-2. ábra).

5. táblázat: A két legjobb modell által becsült túlélés (**ϕ**) értékek és azok konfidencia-intervallumai (**CI**) tojókra és hímekre a különböző években.

Modell	Ivar	érték	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016
$\phi(g+t)p(fix)$	hím	ϕ	0,751	0,843	0,86	0,839	0,854
		CI	0,597- 0,86	0,673- 0,934	0,663- 0,951	0,647- 0,937	0,521- 0,969
	tojó	ϕ	0,844	0,906	0,917	0,904	0,913
		CI	0,746- 0,909	0,791- 0,961	0,795- 0,97	0,766- 0,964	0,679- 0,981
$\phi(g+t)p(g)$	hím	ϕ	0,709	0,837	0,831	0,841	nem becsülhető
		CI	0,555- 0,826	0,667- 0,929	0,63- 0,935	0,627- 0,944	nem becsülhető
	tojó	ϕ	0,837	0,915	0,912	0,917	nem becsülhető
		CI	0,746- 0,899	0,812- 0,964	0,803- 0,964	0,772- 0,973	nem becsülhető



1. ábra: $\phi(g+t)p(\text{fix})$ modell alapján becsült ϕ túlélési valószínűségek évenként és ivaronként



2. ábra: A $\phi(g+t)p(g)$ modell alapján becsült ϕ túlélési valószínűségek évenként és ivaronként

Összefoglalva, a jelölés-visszfogásos elemzésben legjobban illeszkedő modellek szerint az ivarok túlélése különbözik, minden modell szerint a tojóké magasabb, az átlagos különbséget a ***phi(g)p(g)*** modell mutatja, miszerint a tojóké 0.892 (konfidencia-intervallum, CI: 0.855-0.920), a hímeké pedig 0.810 (CI: 0.720-0.875), az időfüggő ***phi(g+t)p(fix)*** és ***phi(g+t)p(g)*** modellekben is hasonló különbség látszik az ivarok között (1-2. ábra).

Mindkét időfüggő modell a 2011-2012 időszakra 7-12%-kal alacsonyabb túlélést becsül, mint a későbbi évekre. Az ivarok közötti különbséget a túlélésben okozhatja, a hím és a tojó eltérő viselkedése a költési időszakban, például a hím többet mozog, nagyobb területet jár be, így jobban kitett az esetleges veszélyeknek. A 2011-2012-es év alacsonyabb túlélését pedig magyarázhatja, hogy ebben az időszakban nagy volt a mérgezéses esetek száma, amit a későbbi években sikerült visszaszorítani.

Hivatkozások:

- Amstrup, S C., McDonald, T.L. & Manly, B.F. Handbook of capture-recapture analysis. (Princeton University Press, 2010).
- Busch, J.D., Katzner, T.D., Bragin, E., Keim, P., 2005. Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 39–41.
- Fridolfsson, A.K., Ellegren, H., 1999b. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30, 116–121.
- Hailer, F., Gautschi, B. and 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, 938–940.
- Hurvich, C.M. & Tsai, C.-L. Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics* 1077–1084 (1995).
- Martínez-cruz, B., David, V. A., Godoy, J. A., Negro, J. J., O'Brien, S. J. and Johnson, 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes* 2, 323–326.
- Suh, A., Kriegs, J.O., Brosius, J., Schmitz, J., 2011. Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2993–2997.
- White, G.C. & Burnham, K.P. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46, S120–S139 (1999).