

Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása madárfajok esetében (irodalmi áttekintés)

Bagi Zoltán–Kusza Szilvia

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen
bagiz@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A molekuláris genetikai módszerek alkalmazása kibővítette az ornitológiai kutatások eszköztárát. Dolgozatunkban a leggyakoribb felhasználási területeket vesszük számba. Alapvető célunk egy átfogó képet adni a madártani vizsgálatok során jelenleg leggyakrabban alkalmazott módszerek köréről, és az általuk elérhető eredményekről. Így tárgyaljuk a vizsgálatokhoz elengedhetetlen mintagyűjtési módszerek alkalmazhatóságát, valamint az egyedi azonosítás, ivar-meghatározás, DNS vonalkódolás módszertanát, továbbá a molekuláris módszerek szerepét a veszélyeztetett fajok védelme során. Kitérünk az egyes módszerek előnyeire és hátrányaira, és az aktuális trendekre is.

Kulcsszavak: mitokondriális DNS, genetikai diverzitás, DNS alapú fajazonosítás, hullatott tollak

SUMMARY

Ornithology studies have been extended by molecular genetic techniques. In this paper we are dealing with the most common use of areas. Our basic aim is to give a comprehensive view of the most commonly used methods in ornithological studies, including the available results by their use. We also deal with the following areas: an essential step during examination namely the applicability of sample collecting methods, and the unique identification, also the sex determination, methodology of DNA barcoding, as well as the role of molecular methods to protect endangered species. We discussed the advantages and disadvantages of the methods, such as the current trend for each method.

Keywords: mitochondrial DNA, genomic diversity, DNA barcoding, moulted feathers

BEVEZETÉS

A molekuláris genetikai módszerek használata az ornitológiai kutatásokban viszonylag nagy múltra tekint vissza, azonban a módszerek fejlődésével és költségeik csökkenésével alkalmazási körük jelentős bővülésére lehet számítani. Ezért célszerűnek tartjuk a különböző felhasználási célok és a leggyakrabban alkalmazott módszerek áttekintését. Ezen módszereknek a talán leggyakoribb felhasználási területe a madárfajok populáció szintű vizsgálata. Eddig elsősorban természetvédelmi kutatások élveztek előnyt a madarak esetében is, mivel a szűkös erőforrásokat a leginkább veszélyeztetett fajokra kell összpontosítani. Az ilyen vizsgálatok elsősorban a jelenkori genetikai struktúrákra összpontosítanak a fajok hosszú távú túlélésével kapcsolatban (Wan et al. 2004). A módszerek szélesebb körű elterjedésével nem csak a vizsgált fajok köre bővíülhet (pl. gazdasági, vadgazdálkodási, ökológiai szempontból jelentős fajok), hanem számos olyan tanulmányba is bevonhatóak az eredmények, melyeknek eredeti célja nem az egyedek vagy populációk genetikai jellemzőinek feltárása, de remekül kiegészítik a más metodika alapján gyűjtött adatokat, sokszor új megvilágításba helyezve az eredményeket, ezáltal feltárva korábban nem ismert összefüggéseket.

MINTAGYŰJTÉSI MÓDSZEREK

A genetikai vizsgálatok alkalmazásának egyik első és legfontosabb kérdése a megfelelő mintavételi módszer kiválasztása. A vizsgálat célja, a vizsgált állatfaj, a rendelkezésre álló források, és eszközök közösen határozzák meg a végül alkalmazható eljárást. A minta-

gyűjtési módszerek három fő csoportját Vili et al. (2007) ismerteti. A destruktív mintavételt gerinctelen szervezetek vizsgálatánál alkalmazzák, ennek során a teljes egyed felhasználják. Kevésbé drasztikus megoldást jelentenek a nem-destruktív mintavételi módszerek, mint például a vérvétel, biopszia, nyálkahártya vagy az ujjpercek lecsípése. Az ilyen eljárások során a vizsgálni kívánt állatok nagy valószínűséggel túlélnek, de jelentős stresszt kell elviselniük, ami tudományetikai és gyakorlati okokból is kifogásolható. Mivel a molekuláris genetikai módszereket leggyakrabban természetvédelmi és populációgenetikai vizsgálatokban alkalmazzák, nem fogadható el az egyedek ilyen mértékű zavarása, esetleges elhullása. Az ilyen kutatások esetében a megoldást a nem-invazív mintagyűjtési módszerek jelentik (Taberlet et al. 1999, Waits és Paetkau 2005), melyek során az állatok távollétében lehet a mintákhoz jutni, olyan, általuk hátrahagyott nyomokból, mint a szőr, pikkely, vedlett toll, nyál, ürülék, vedlett bőr vagy tojásbéj. A módszer előnyei közé tartozik, hogy viszonylag kis mennyiségű minta is elegendő genomiális DNS-t tartalmazhat, ami a vizsgálatok alapfeltétele. A kis mennyiség miatt a minták gyűjtése, tárolása, szállítása is könnyebb és olcsóbb. Azonban a módszer hátrányai is elsősorban a kis mintamennyiségből fakadnak, ugyanis olyan esetek is gyakran előfordulnak, hogy nem megfelelő a DNS minősége és/vagy mennyisége, így a minták nagy része nem ad használható eredményt, emiatt jelentősen megnöhetnek a laborköltségek. Továbbá fennáll a minták szennyeződésének a veszélye is (Taberlet et al. 1999, McDonald és Griffith 2011).

A madarak esetében a legelterjedtebb nem-invazív mintavételi módszer a hullatott tollakon alapul. A madár-

tollból történő DNS-izolálás lehetősége viszonylag régóta adott (Pearce et al. 1997, Taberlet et al. 1999, Eguchi 2000, Bello et al. 2001, Malagó et al. 2002). A tollak gyűjtése legtöbbször pihenő-, fészkelő-, etető- és itatóhelyek közelében végezhető sikerrel. A módszer kezdeti alkalmazásakor a tollszár pulpáját, illetve bazális hegyét használták forrásként a DNS-kivonáshoz, de ennél az eljárásnál a megbízható eredményhez egy egyedtől több, lehetőleg friss tollra van szükség (Taberlet és Bouvet 1991), mivel a legfőbb problémát a tollakban található DNS szabad környezetben történő gyors degradációja (mikrobiális tevékenység, UV sugárzás miatt) jelenti (McDonald és Griffith 2011). A DNS-izolálás hatásfokának jelentős javulása Horváth et al. (2005) módszere által volt elérhető. Ez a tollszárban található magvas vörösvérsejteket tartalmazó vérrögöt használja fel, így a kivont DNS elegendő a mikroszatellitakon alapuló DNS-ujjlenyomat meghatározásához, illetve mitokondriális DNS-szakaszok szekvenálásához (Vili et al. 2007). Szintén a hullatott tollakon alapuló módszer hátrányai között kell megemlíteni, hogy gyakorlati tapasztalataink alapján bizonyos esetekben a tollakat hátrahagyó faj azonosítása is bizonytalan lehet (Bagi és Kusza 2015). Mindent összevetve, a hullatott tollak alkalmazása valódi alternatívát jelent a hagyományos (vér, szövet) mintavételi módszerekkel szemben, mely egyúttal jelentősen kibővítette a molekuláris genetikai módszerekkel végzett természetvédelmi és populációgenetikai vizsgálatokba bevonható fajok körét (ritka, érzékeny, nehezen csapdázható és/vagy védett fajok).

EGYEDI AZONOSÍTÁS

A madártani kutatások egyik alapvető eszköze az egyedi jelölés, mely lehetővé teszi a későbbi vizsgálatokat, adatfelvételeket. Ezeket a jelöléseket általában különböző eszközök (gyűrűk, krotáliák, chipek) segítségével oldják meg. Az egyedek jelölése szükségessé teszi a madarak befogását, ami jelentős stresszel jár az állat számára. Ezen túl a felhelyezett eszközök zavarhatják az állatot, például hátrányt is jelenthet számukra menekülés vagy párválasztás során. További problémát jelent a jelölések elvesztése, vagy kopása. A molekuláris genetikai módszerek részben ki tudják küszöbölni ezeket a problémákat, mivel az egyedek eleve jelöltek, így a jelölés nem jelent további terhet, azaz nem befolyásolja az egyed túlélését, és az nem veszik el. Természetesen a téves azonosításokat ezzel a módszerrel sem lehet teljesen kizárni (Vili 2013). A molekuláris technikák fejlődésével a genetikai módszerek alkalmassá váltak az egyedek azonosítására (Morin et al. 1994) is. A fejlődés folyamatos, így egyre bővül a rendelkezésre álló eszközök köre (Vili et al. 2007). Kezdetben az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) és RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), módszereket részesítették előnyben, de manapság egyre inkább kiváltja őket a direkt-szekvenálás, illetve a DNS-ujjlenyomat készítése mini- és mikroszatellit vizsgálat alapján (Sunnucks 2000). A mini- és mikroszatellit a nukleáris DNS nem kódoló régióiban található 2–6 bázispáros nukleotid ismétlődések. Az ismétlődő szakasz hossza alapján lehetnek di-, tri-, tetra-, penta- és hexanukleotidok. Nagy számuk, hosszbeli polimor-

fizmusuk és jellemzően jó amplifikálhatóságuk miatt ezeket a lókuszokat régóta felhasználják egyedi szintű azonosításra (Jeffreys et al. 1985). A módszer azon alapul, hogy az egyes mikroszatellita szakaszok hossza egyedenként változó lehet, így több ilyen szakaszt vizsgálva, a bázispárokból megadott hosszuk egyedre jellemző mintázatot jelent (Vili 2013). Mivel a DNS-profil egyedi jelölésnek tekinthető, és az adott populációból évről évre standard módon lehet mintákat venni, ezért a módszer alkalmas a jelölés-visszafogásos vizsgálatokhoz hasonlóan akár az egyedek hosszú távú nyomon követésére is (Lukacs 2005, Lukacs és Burnham 2005, Peakall és Smouse 2006). Így populáció olyan, más módon nehezen becsülhető paraméterei is vizsgálhatóvá válnak, mint például az egyedszám, a mortalitás, vagy a migráció (Vili et al. 2007). A fentiekből következik, hogy a módszer elsősorban a fajvédelmi programok esetében jelent hasznos eszközt. Az így nyert adatok segítik a hatékony programok kidolgozását, de a már futó projektek monitorozására is felhasználhatóak, ezáltal még időben végrehajthatóak az esetlegesen szükségessé váló módosítások.

IVAR-MEGHATÁROZÁS

A legtöbb madárfaj esetében könnyű feladat a nemek felismerése, azonban sok olyan faj van, ahol az ivari dimorfizmus nagyon kicsi, vagy nem is figyelhető meg. Esetleg olyan fiatal egyedek képezik a vizsgálat tárgyát, ahol ezek a nemi jellegek még nem fejlődtek ki. Ezekben az esetekben segítségül hívhatjuk a molekuláris módszereket. Ivar-meghatározásra több molekuláris módszer alkalmazható, például a karyotipizálás, RAPD, RFLP, AFLP, hibridizálás, de a mini- és mikroszatellit lókuszok vizsgálata is. Madaraknál a tojó a heterogametikus (WZ ivari kromoszómákkal rendelkező), míg a hím a homogametikus ivar (ZZ kromoszómák). Így a W kromoszóma vagy a W kromoszómára specifikus szekvenciák kimutatása alkalmas az ivar-meghatározásra (Vili et al. 2007). Griffiths és Tiwari (1995) írta le az első W kromoszómához kötődő gén madarakban, mely a *CHDIW* jelölést kapta. Ez a gén felel a kromo-helikáz DNS-kötő fehérje kódolásáért, és a legtöbb fajban előfordul. Míg a *CHDIW* gén csak tojóban fordul elő, a Z kromoszómán található *CHDIZ* jelű változata mindkét ivarban megtalálható. Ezek a gének az ivari kromoszómák rekombinálandó pszeudoautoszomális régióin kívül helyezkednek el, ezért elég konzervatívak ahhoz, hogy alkalmasak legyenek az ivarok azonosítására. Ellegren és Sheldon (1997), valamint Cerit és Avalus (2007) is összehasonlította a különböző módszereket. Mindkét szerzőpáros arra a megállapításra jutott, hogy az ivari kromoszómákon található *CHDIW* és *CHDIZ* gének vizsgálata jelenti a legmegbízhatóbb és leggyorsabb módszert.

DNS-ALAPÚ FAJAZONOSÍTÁS

A fajok azonosításának egy viszonylag egyszerű módja a DNS-barcoding (nevezik még az élet vonalkódjának is). Alapelve egyszerű: egy olyan DNS-szakaszt kell választani, amely jelentősen eltér a fajok között, de meglehetősen kis variabilitással rendelkezik egy fajon belül. Ennek a szakasznak a vizsgálatával el-

végezhető a vizsgált egyedek faji hovatartozásának megállapítása. A madarak (és általában a gerinces fajok esetében) a mitokondriális DNS citokró-m-oxidáz I-es (COI) régiójának 650 bázispár-hosszúságú szakaszát használják erre a célra. A módszer sok esetben nagyon leegyszerűsítette a taxonómiai munkát, de ennek is vannak korlátai, így a hagyományos fajmeghatározási módszereket nem lehet teljesen kiváltani vele. Kritika éri a módszert, mert csupán egyetlen régió vizsgálata alapján von le következtetéseket. Ez például új fajok esetén nem feltétlenül elegendő, de akár a véletlen folytán is lehetnek egyezések két faj között a vizsgált szakaszon. Ugyanígy problémákat vet fel az introgresszió és a hibridizáció kérdése is. Hebert és Gregory (2005) észak-amerikai madárfajok vizsgálata során kimutatta, hogy az esetek 96%-ában azonosítható volt az egyed faji hovatartozása DNS-vonalkódolással. Ugyanakkor az is igaz, hogy ezek nagy része hagyományos módszerekkel is elkülöníthető lenne. A fennmaradó 4% esetében azonban a faj kizárólag a DNS-szekvencián alapuló azonosítása sokak szerint elfogadhatatlanul magas hibaarányhoz vezethet. Meg kell azonban említeni, hogy az ismert és kutatott rendszertani csoportok esetében a tévedés lehetősége sokkal kisebb. A határozási bizonytalanságok elsősorban kevésbé kutatott, esetleg még nem leírt fajok/rejtett fajok esetében jelentősek. Az adatbázisok fejlesztésével a bizonytalanság mértéke is csökkenthető (Meyer és Paulay 2005). Baker et al. (2009) megállapításai szerint is az olyan, rendszerintalag kiforrott csoportokban, mint az emlősök vagy a madarak, a fajok többsége jól elkülöníthető ezzel a módszerrel.

Madarakat érintő barcoding vizsgálatokat leggyakrabban azzal a céllal folytatnak, hogy egy meghatározott terület (ország, régió, város) madárközösségét leírják, esetleg múzeumi gyűjteményeket vizsgálják általa (Schindel et al. 2011, Lijtmaer et al. 2012, Aliabadian et al. 2013), de a már említett taxonómiai munkában is hasznos eszköznek bizonyul a leszármazási viszonyok tisztázásában és a korábbi besorolások felülvizsgálatakor (Hebert et al. 2004, Khan és Arif 2013, Rudnick et al. 2007, Ferri et al. 2009). Nagy lehetőségeket rejt magában a módszer a természetvédelmi károk azonosításában (mérgezés vagy orvvadászat esetében a bizonyításkor), vagy például lehetővé teszi a repülőgéppel ütköző madárcsapatok faji szintű azonosítását is, így lehetővé téve a hatékony ellenintézkedések kidolgozását (Dove et al. 2008).

VESZÉLYEZTETETT FAJOK VÉDELME

A korábbi fejezetekben már utaltunk rá, hogy a molekuláris genetikai módszerek egyik legfontosabb felhasználási területe az ornitológián belül a védett fajokat érintő kutatások és védelmi programok. Ha kis populációk egymástól távol helyezkednek el, és nem jön létre közöttük migráció, akkor genetikailag izolálódnak, és felbomlik a dinamikus metapopulációs szerkezet, ami természetvédelmi szempontból rendkívül hátrányos (Standovár és 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 révén)

alapvetően meghatározza a fajok túlélési esélyeit, és így befolyásolhatja az alkalmazandó védelmi stratégiát is (Vili et al. 2007). A molekuláris genetikai módszerek megkerülhetetlen eszközei lettek a veszélyeztetett fajok védelmének is, mivel ezek segítségével gyorsan és pontosan megállapítható a különböző populációk genetikai polimorfizmusa és a populációk közötti génáramlás mértéke, felderíthető az adott populáció populációgenetikai története, melyek alapján tervezhetővé válik a génmegőrzési munka. A napjainkban leggyakrabban alkalmazott módszer a kizárólag anyai ágon öröklődő mitokondriális DNS kontroll régiójának vizsgálata, amit számos gerinces fajnál használtak már fajon belüli populációs összehasonlításokra (Rawlings és Donellan 2002, Li et al. 2004, Martínez-Cruz et al. 2004). Szintén ezt a módszert használják a fajok utolsó eljegesedés alatti refúgium területeinek azonosítására, az onnan történt kiáramlások irányának és időbeliségének rekonstrukciójára. Egy másik gyakran alkalmazott módszer a mikroszatellit markerek használata. A mikrosatellit vizsgálat az adott lokuszon jelenlévő ismétlődő elemek variációját használja fel. Ismert még SSR (simple sequence repeats) néven is (Ouborg et al. 2010). Számos tanulmányban alkalmazták ezeket a markereket természetvédelmi-genetikai összefüggésben a genetikai variáció, a népesség szerkezete, a génáramlás mértékének becslésére, valamint a demográfiai történet és a hibridizációs események feltárására (Verardi et al. 2006, Aspi et al. 2009, Wheeldon és White 2009).

Egyre gyakrabban alkalmazott módszer az SNP-k (single nucleotide polymorphism) vizsgálata. Az SNP-k gyakorlatilag pontmutációk. Egy DNS szekvencia-variációt jelent, mely akkor jön létre, ha egy nukleotid a genomban megváltozik. Az SNP-k segítségével a hagyományosan használt mikrosatelliteknél és AFLP-nél jóval reprezentatívabb képet kaphatunk az egyedek, a populációk, vagy akár a metapopulációk genetikai változatosságáról is. Ez lehetővé teszi, hogy részletesebb képet alkossunk a vizsgált populáció demográfiájáról, a génáramlásról, a beltenyésztettségéről és a populáció történetéről, továbbá a populációk közötti genetikai távolságokról (Ouborg et al. 2010).

Bár a most bemutatott módszerek eredményes alkalmazására számos példa szolgált már, állandó vita tárgyát képezi, hogy csupán egy, esetleg néhány marker felhasználásával hiteles képet kaphatunk-e a vizsgált faj vagy populáció változatosságáról. Logikus következtetés, hogy törekedni kell a lehető legtöbb marker alkalmazására, de a források végeessége nem teszi ezt lehetővé. Ezért folyamatosan keresik a leginkább megbízható módszereket. Összehasonlító tanulmányokat végeztek például mikrosatellitek és SNP-k felhasználásával, az eredmények pedig ellentmondásosak. Míg az atlanti lazac (*Salmo salar*) esetében (Ryynänen et al. 2007) erős korreláció mutatkozott a két marker között, ugyanez nem volt kimutatható a farkasok (*Canis lupus*) és az észak-amerikai prérifarkasok (*Canis latrans*) esetében az egyedek szintjén (Váli et al. 2008). Ugyanakkor az utóbbi vizsgálatban már kimutatható volt a korreláció, ha a populációk szintjén történt az összehasonlítás. Látható tehát, hogy nem létezik univerzális marker. Az aktuálisan alkalmazandó marker kiválasztásakor figyelemmel kell lenni az adott taxonómiai csoportra és vizsgálni kívánt szerveződési szintre is.

IRODALOM

- Aliabadian, M.–Beentjes, K. K.–Roselaar, H. V. B.–Nijman, V.–Vonk, R. (2013): DNA barcoding of Dutch birds. *ZooKeys*. 365: 25.
- Aspi, J.–Roininen, E.–Kiiskilä, J.–Ruokonen, M.–Kojola, I.–Bljudnik, L.–Pulliainen, E. (2009): Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conservation Genetics*. 10. 4: 815–826.
- Bagi Z.–Kusza Sz. (2015): Tollból történő DNS izolálás a Debreceni Egyetem Állatgenetikai Laboratóriumában. [In: Bodnár K. B.–Erdős Zs. Nemzetközi összefogás a jövő agrárkutatásáért.] 88.
- Baker, A. J.–Tavares, E. S.–Elbourne, R. F. (2009): Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. *Molecular Ecology Resources*. 9. s1: 257–268.
- Bello, N.–Francino, O.–Sánchez, A. (2001): Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13. 2: 162–164.
- Cerit, H.–Avalus, K. (2007): Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World's Poultry Science Journal*. 63. 1: 91–99.
- Dove, C. J.–Rotzel, N. C.–Heacker, M.–Weigt, L. A. (2008): Using DNA barcodes to identify bird species involved in birdstrikes. *The Journal of Wildlife Management*. 72. 5: 1231–1236.
- Eguchi, T.–Eguchi, Y. (2000): High yield DNA extraction from the snake cast-off skin or bird feathers using collagenase. *Biotechnology Letters*. 22. 13: 1097–1100.
- Ellegren, H.–Sheldon, B. C. (1997): New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends in Ecology & Evolution*. 12. 7: 255–259.
- Ferri, G.–Alu, M.–Corradini, B.–Licata, M.–Beduschi, G. (2009): Species identification through DNA “barcodes”. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 13. 3: 421–426.
- Griffiths, R.–Tiwari, B. (1995): Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*. 375: 454.
- Hebert, P. D.–Gregory, T. R. (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*. 54. 5: 852–859.
- Hebert, P. D.–Stoeckle, M. Y.–Zemlak, T. S.–Francis, C. M. (2004): Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. 2. 10: e312.
- Horváth, M. B.–Martínez-Cruz, B.–Negro, J. J.–Kalmár, L.–Godoy, J. A. (2005): An overlooked DNA source for noninvasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*. 36. 1: 84–88.
- Jeffreys, A. J.–Wilson, V.–Thein, S. L. (1985): Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature*. 316: 76–79.
- Khan, H. A.–Arif, I. A. (2013): COI barcodes and phylogeny of doves (Columbidae family). *Mitochondrial DNA*. 24. 6: 689–696.
- Li, M.–Wei, F.–Goossens, B.–Feng, Z.–Tamate, H. B.–Bruford, M. W.–Funk, S. M. (2004): Mitochondrial phylogeography and sub-specific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36. 1: 78–89.
- Lijtmaer, D. A.–Kerr, K. C.–Stoeckle, M. Y.–Tubaro, P. L. (2012): DNA Barcoding Birds: From Field Collection to Data Analysis. [In: Kress, W. J.–Erickson, D. L. (eds.) DNA Barcodes: Methods and Protocols – Methods in Molecular Biology.] Humana Press. 858: 127–152.
- Lukacs, P. M. (2005): Statistical aspects of using genetic markers for individual identification in capture-recapture studies. Doktori (PhD) értekezés. Colorado State University. Colorado. USA.
- Lukacs, P. M.–Burnham, K. P. (2005): Review of capture-recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology*. 14. 13: 3909–3919.
- Malagó, W.–Franco, H. M.–Matheucci, E.–Medaglia, A.–Henrique-Silva, F. (2002): Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnology*. 2. 1: 19.
- Martínez-Cruz, B.–Godoy, J. A.–Negro, J. J. (2004): Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology*. 13. 8: 2243–2255.
- McDonald, P. G.–Griffith, S. C. (2011): To pluck or not to pluck: the hidden ethical and scientific costs of relying on feathers as a primary source of DNA. *Journal of Avian Biology*. 42. 3: 197–203.
- Meyer, C. P.–Paulay, G. (2005): DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*. 3. 12: 2229.
- 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. 5176: 1193–1201.
- Ouborg, N. J.–Pertoldi, C.–Loeschcke, V.–Bijlsma, R. K.–Hedrick, P. W. (2010): Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics*. 26. 4: 177–187.
- Peakall, R.–Smouse, P. E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6. 1: 288–295.
- Pearce, J. M.–Fields, R. L.–Scribner, K. T. (1997): Nest Materials as a Source of Genetic Data for Avian Ecological Studies (Material del Nido Como Fuente para Obtener Datos Genéticos en Estudios Ecológicos). *Journal of Field Ornithology*. 471–481.
- Rawlings, L. H.–Donellan, S. C. (2002): Phylogeographic analysis of the green python, *Morelia viridis*, reveals cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27. 1: 36–44.
- Rudnick, J. A.–Katzner, T. E.–Bragin, E. A.–DeWoody, J. A. (2007): Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. *Molecular Ecology Notes*. 7. 5: 757–762.
- Ryynänen, H. J.–Tonteri, A.–Vasemägi, A.–Primmer, C. R. (2007): A comparison of biallelic markers and microsatellites for the estimation of population and conservation genetic parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Heredity*. 98. 7: 692–704.
- Schindel, D. E.–Stoeckle, M. Y.–Milensky, C.–Trizna, M.–Schmidt, B.–Gebhard, C.–Graves, G. (2011): Project description: DNA barcodes of bird species in the National Museum of Natural History. Smithsonian Institution. USA. *ZooKeys*. 152: 87.
- Standovář T.–Primack R. B. (2001): A természetvédelmi biológia alapjai. Nemzeti Tankönyvkiadó. Budapest. 542.
- Sunnucks, P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 15. 5: 199–203.
- Taberlet, P.–Bouvet, J. (1991): A Single Plucked Feather as a Source of DNA for Bird Genetic Studies. *The Auk*. 108. 4: 959–960.
- Taberlet, P.–Waits, L. P.–Luikart, G. (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*. 14. 8: 323–327.
- Váli, Ü.–Einarsson, A.–Waits, L.–Ellegren, H. (2008): To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*. 17. 17: 3808–3817.
- Verardi, A.–Lucchini, V.–Randi, E. (2006): Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*. 15. 10: 2845–2855.
- Vili N.–Kalmár L.–Kovács Sz.–Horváth M. (2007): A parlagi sas genetikai változatossága. [In: Forró L. (szerk.) A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása.] Magyar Természettudományi Múzeum. Budapest. 303–310.

- Vili, N. (2013): Applicability of degraded biological remains in conservation genetic studies of birds. Case study of the Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population of the Carpathian Basin. Doktori (PhD) értekezés. Szent István Egyetem. Gödöllő.
- Waits, L. P.–Paetkau, D. (2005): Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*. 69. 4: 1419–1433.
- Wan, Q. H.–Wu, H.–Fujihara, T.–Fang, S. G. (2004): Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*. 25. 14: 2165–2176.
- Wheeldon, T.–White, B. N. (2009): Genetic analysis of historic western Great Lakes region wolf samples reveals early *Canis lupus/lycaon* hybridization. *Biology Letters*. 5. 1: 101–104.

