

Vidra (*Lutra lutra*) populációk genetikai analizésének hazai előzetes eredményei mikroszatellit polimorfizmus alapján

Szentes K.¹, Lanszki J.², Révay T.¹, Hidas A.¹

¹Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Gödöllő

²Kaposvári Egyetem, Ökológiai Munkacsoport, Kaposvár

Kivonat

Vidra szövetmintákon (n = 25) 9 primerpárt (Lut-435, 604, 615, 701, 715, 717, 733, 832, SRY) alkalmazva összesen 45 mikrosatellit allélt azonosítottunk. Viszonylag kevés lokusz információja alapján lehetséges az egyedi elkülönítés.

A terepen gyűjtött friss vidra hulladék mintákat (n = 282), DNS-extraktiót követően 9 mikrosatellit primer párral vizsgáltunk. A PCR-termékeket ALFexpressz szekvenátoron értékeltük. 166 mintánál sikerült kimutatni és izolálni detektálható mennyiségű DNS-t, melyekből 31 esetben volt amplifikált termék a PCR reakciót követően. Az alkalmazott primerekkel összesen 41 allélt tudtunk megkülönböztetni a hulladékokból. Az alkalmazott módszerrel, a modell halastavakon sikeresen nyomon követtük a vidraállomány változását.

Kulcsszavak: vidra, mikrosatellit polimorfizmus, hulladék DNS, PCR.

Bevezetés

Hazánknak jelentős szerepe van a fokozottan védett vidra (*Lutra lutra*) fennmaradásában, mert a kárpát-medencei populáció lehet egyike azon törzsalományoknak, melyek a degradált nyugat-európai populációk újbóli megtelepedésében és fejlődésében fontos szerepet játszhat. A hazai állomány jelentős és stabil (Gera 2001, Heltai 2002). Ezzel együtt a faj halgazdasági szempontból is fontos (Kranz 2000), mivel érzékeny károkat okozhat halastavakon. A vidra táplálkozási szokásai, táplálék-összetétele halastavakon, horgászvizeken és természetes élőhelyeken viszonylag jól ismert, ezzel kapcsolatban számos összefoglaló munka illetve tanulmány jelent meg (részletes áttekintés: Lanszki 2002), a valódi populációméretre vonatkozóan azonban kevés információ áll rendelkezésre.

Az adott területen élő vidralétszám meghatározása természetvédelmi és gazdasági szempontból egyaránt lényeges. A 2002-ben megkezdett kutatási témánkban, egyes területeken a vidraállomány dinamikájával, valamint országos viszonylatban, *post mortem* (részletes boncolásra alapozott) vizsgálati minták

alapján a genetikai variabilitás kérdéskörével foglalkozunk. A genetikai vizsgálat az Angliában, alig néhány éve kidolgozott módszer (*Dallas és Piertney 1998, Dallas et al. 1999, 2000, 2002, 2003*) első hazai adaptációja. Jelen tanulmányunkban előzetes eredményekről számolunk be.

Vizsgálatunk célja volt szövetmintákból, molekuláris genetikai módszerrel egyes lokuszok variabilitásának felmérése, valamint terepen gyűjtött friss vidra hullatékokból egyedi azonosítás és populációdinamikai vizsgálat végzése.

Anyag és módszer

A 2002-es évben, kutatási engedéllyel 25 vidra tetemet gyűjtöttünk össze a Nemzeti Park Igazgatóságoktól. A vizsgált 10 hím és 15 nőstény egyeden részletes *post mortem* vizsgálatot végeztünk, melynek során vese szövetet gyűjtöttünk molekuláris genetikai vizsgálatra. A fagyasztott mintákat a Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben vizsgáltuk. A vidra ürülékminták, illetve szövetminták DNS-extrakcióját követően 8 mikroszatellit (*I. táblázat*) + SRY hímivarra pozitív primer párral (*Dallas and Piertney 1998, Dallas et al. 2000*) végeztük vizsgálatainkat.

A vidra hulladék gyűjtésre kijelölt területek Somogy megyében találhatók, jellegüket tekintve eutróf halastavak. Az egyik terület a magántulajdonban levő Fonói halastó (összesen kb. 30 ha vizes élőhely), ahol az élőhely adottságai szerinti intenzív jellegű halgazdálkodás folyt. A másik terület a Boronka-melléki Tájvédelmi Körzet Dávodi tórendszer (összesen kb. 80 ha vizes élőhely). A természetvédelmi kezelésben levő területen extenzívebb jellegű halgazdálkodás folyt (részletesebben: *Lanszki et al. 1999, Lanszki 2002*). A hulladék gyűjtés 2002 májusa és 2003 decembere között, havonkénti gyakorisággal zajlott. Ennek során, a hajnali hűvös órákban, a mikroorganizmusok lebontó tevékenységének megakadályozására, alkohollal töltött csöbe gyűjtöttük a friss vidraürülékeket. Ezek, a prédamaradványok mellett, tartalmazhatják a genetikai vizsgálatra alkalmas vidra bélhámsejteket is. E mellett gyűjtöttük a territórium jelölésére szolgáló anális váladékot, melyben jobb hatásfokkal található ép vidra sejt (*Coxon et al. 1999*) és nincs prédamaradvány. A vizsgált mintaszám 282 volt.

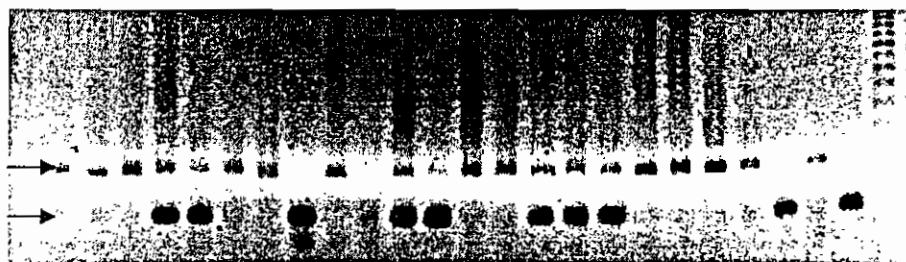
Vidratetekből származó szövetszövetminták genotipizálási eredménye

I. táblázat

Lokus	L-701		L-715		L-717		L-733		L-832		L-435		L-604		L-453		L-615	
minta	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2	alléll	alléi2
1	5	6	1		8	9	1	2	4		2		7		2		1	3
2	5	6	2		4	7	2	3	5		6		2		2		1	6
3	4	5	3		9		1		3	5		2	8	3	5		2	
4	1	6	2		4	7	2	3	5		1	7	5	3	3		4	
5	3	5	1	4	4	8	1	2	4		6		5	2	2		3	
6	1	4	2		7		1	2	4		1	7	4	2	2		1	3
7	4	5	2		4	9	1	2	4		1	7	3	5	1	2	2	6
8	4		1		8	9	1		5		1		2	5	1		7	
9	5		2		7	8	1	2	4		1	7	2	5	2		2	4
10	4	5	1	4	7	9	1		5		1	4	3	5	2		3	
11	1	5	2		8		2		4		2		5	2	2		2	3
12	4	6	2	3	8		1		3	4	1	3	2	1			4	
14	5	6	2	3	8		1		3	4	5		2	2				
15	5		1	4	8		1	2	4		2	5	5	2				
16	5	6	1	3	8		1	3	3	5	2		3	2				
17	2	4	1		4		2		3		2	7	3	3				
18	4	5	1		4	8	1		2	5	1	7	3	5	1			4
19	5		1	2	7	8	1		1	4	1	3	4	2				
20	4	6	1	4	4		1	3	3	5	1	7	3	5	2			
21	4		1	2	4	9	1		4	5	1	7	1	4	2			
22	4		2		4		1		4	5	1	9	1	5	2			4
23	4		3		8		1	2	3	4	6		1	3	1			7
24	3	4	1	3	7	8	2		3		6		1	2	3			
25					6	8			3	4	1		3		2			

A 25 vidra szövetmintából 9 primer párral összesen 45 allélt azonosítottunk. A többnyire autógázolásból származó vidratetek mintáit összehasonlítva viszonylag kevés lokusz információja alapján lehetséges volt az egyedi elkülönítés, ami azt jelenti, hogy nem volt két azonos genotípus a kiértékelt 25 minta között (*I. táblázat*). Ezek nem mutattak azonosságot az ürülékekből azonosított genotípusokkal sem.

Az ivar meghatározáshoz duplex PCR-t használtunk, amelyben az SRY (hímivarra pozitív) primer-pár mellé egy hatékonyan amplifikáló mikroszatellit primerpárt állítunk be pozitív kontrollként (*I. ábra*), ami az ürülékből származó, problémásan PCR-ezhető mintáknál különösen elengedhetetlen. Az *I. ábrán* a felső nyíllal jelölt DNS fragmentek a pozitív kontrollként szolgáló mikroszatellit tartalmú PCR-termékek, míg az alsó nyíllal jelöltek a hím egyedekből amplifikált Y kromoszóma specifikus szekvenciát jelölik.



1. ábra: SRY primer-párral végzett ivarhatározás vidrán (jelmagyarázat a szövegben)

A 282 darab ürülékminta feldolgozása után 166 db-nál sikerült kimutatni és izolálni agaróz-gélen detektálható mennyiségű DNS-t. Ezekből azonban csak 31 esetben találtunk amplifikált terméket a PCR reakció követően. Nyolc mikroszatellit primerpárt alkalmazva 31 használható ürülék mintát találtunk. Vagyis ennyi esetben értékeltünk egyértelműen vidrától származó és használható mennyiségű mintát. A 31 kiválasztott minta közül 30-nál legalább 5 lokuszra sikerült kiértékelhető PCR terméket nyerni. Az alkalmazott primerekkel összesen 41 allélt tudtunk megkülönböztetni az ürülékekből. A genotipizált ürülékmintákat összehasonlítva 2 megegyező genotípust találtuk 2 mintában ill. 2 másik genotípust 3-3 mintában. Az ismétlődések azonos területekről származtak (Boronka-melléki TK, 3. táblázat), ezért, tekintve a vizsgált lokuszok magas információtartalmát, valószínűsíthető, hogy azonos állatoktól származtak.

II. táblázat

A vidra ürülékminták genotipizálási eredménye a Fonói halastavon (X a sikeres genotipizálást jelöli)

Lokusz minta	2003																				
	2002	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
39						X															
43						X															
50							X														
54		X																			
96												X									
141												X									
192																					X
4													X								
23														X							
99															X						
101																X					
15																X					
17															X						
19															X						
Legkisebb ismert egyedszám	1			3	2	1	2			4											1

III. táblázat

A vidra ürülékminták genotipizálási eredménye a Boronka-melléki Tájvédelmi Körzetben
(X a sikeres genotipizálást, a szürke felfestés a feltételezhető jelenlétet jelöli)

Lokusz minta	2002											2003										
	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI			
211, 212											X											
239, 218, 247													X							X		
282, 197											X									X		
207																				X		
209										X												
215											X											
245																				X		
Legkisebb ismert egyedszám										1	3	2	2	3	2	2	2	1	2	1		

A vizsgálat gyakorlati jelentősége, hogy a mindössze 30 ha-os halastavon, másfél év alatt legkevesebb 14 vidra egyedet azonosítottunk (*II. táblázat*). Egyidejűleg legfeljebb négy egyed fordult elő, ugyanazt a példányt később nem találtuk meg. A vízpartra kihelyezett automata fényképezőgép viszont vidra anyát és kölykét együttesen fotózta le. Ez azt jelenti, hogy a területen kölyöknevelés is előfordult, így egyes példányok egy hónapnál hosszabb időtartamban jelen lehettek. A nagyszámú vidra előfordulása jelentős migrációt, továbbá a kis kiterjedésű vizes élőhelyek vándorlási útvonalként való intenzív használatát is jelzi. Ugyanakkor a lényegesen nagyobb, 80 ha-os, de extenzívebb működésű halastórendszeren rövidebb időszakban ugyan - egy év leforgása alatt - mindössze 7 egyed előfordulását bizonyítottuk (*III. táblázat*). Egyidejűleg legfeljebb három egyedet azonosítottunk, melyek közül többet, a következő hónapokban is sikerült megtalálnunk. Feltételezhető, hogy a köztes időszakban is jelen voltak az egyedek (*Coxon et al. 1999*). Ez azt jelzi, hogy a szerényebb halhozamú, kiegyenlítettebb vízborítású védett tavakon ugyan egy kisebb létszámú, de stabilabb vidraállomány élhet.

Következtetések

Metodikai fejlesztést célszerű végezni, mely magába foglalja a mintagyűjtés körülményeinek kontrollálását, a mintagyűjtési gyakoriság növelését, és a fagyasztva tárolt ürülék minták néhány héten belüli genetikai vizsgálatának szükségességét. A hosszú ideig tárolt mintákban lényegesen romlik a vidra DNS amplifikálásának lehetősége.

Az ürülékmintákból történő ivarmeghatározás kondícióit még optimalizálni kell, ugyanis a marginális amplifikációs esetekben, gyakran megfigyelhető, főlős primerekből képződő melléktermékek, abban a mérettartományban, ahol az Y kromoszóma-specifikus terméknek kellene jelentkeznie. Ez a melléktermék bizonytalan megjelenésű, csakúgy, mint az igen kevés vidra DNS-ből gyengén amplifikálódó specifikus fragment. Ennek ellenére az ürülékminták 2/3-ában biztosan megállapítható volt az ivar (agarózon látható mikroszatellit pozitív kontroll mellett egyértelmű jelenléte ill. hiánya az ivar specifikus fragmentnek).

A populációdinamikai vizsgálatok előzetes eredményei alátámasztják a kérdőíves felmérési és vidramonitorozási eredményeket (*Gera 2001, Heltai 2002, Lanszki 2002*), ami szerint a halastavak igen fontos szerepet töltenek be a hazai jelentős vidraállomány meglétében. A halgazdaságok területein nagyobb a vidrasűrűség, mint a kisebb táplálékbázissal rendelkező természetes, vagy természeteshez közeli élőhelyeken, ugyanakkor a gazdálkodás jellegével összefüggésben (pl. őszi lehalászások) nagyobb az állományingadozás is. Összességében, a vidraállomány természetvédelmi szempontból növeli a gazdálkodással hasznosított területek értékét, ugyanakkor számos, nem elodázható gyakorlati probléma megoldását sürgeti. Bár a jogszabályok lehetőséget adnak kompenzációra, ilyen alap eddig nem állt rendelkezésre. Lehetőséget jelenthet a Natura 2000 európai természetvédelmi hálózatról szóló szabályozása.

Az eredményekből az is látható, hogy egy-egy területen az esetleges vidra „kiemelés” akár legálisan, akár illegálisan, helyileg semmit nem oldana meg. Az egész évben zajló vidra migráció miatt újabb és újabb egyedek érkeznek, melyek a vidra territoriális magatartásából adódóan rövid időn belül továbbállni kényszerülnek. Az egyedek kiemelése elsősorban regionális szinten járma súlyos következménnyel, állomány hanyatlással. A közös érdekeken alapuló vidra megőrzés helyileg kevésbé (kivéve telető tavakon), inkább nagyobb területi egységekben lehet hatékonyabb. Nagyon fontosnak tartjuk a természetvédelmi és a földművelésügyi (fő)hatóságok, a halászati és a horgászati érdekképviseleti szervezetek, valamint a vidrakutatással foglalkozó intézmények jelenleginél sokkal szorosabb együttműködését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a Nemzeti Park Igazgatóságoknak a vidra tetemek átadását. A kutatást az OTKA (F 037557), a Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium (HP-02-048) és az MTA Bolyai Ösztöndíj Alap támogatta.

Irodalom

- Coxon, K., Chanin, P., Dallas, J. and Sykes, T., 1999. The use of DNA fingerprinting to study the population dynamics of otters (*Lutra lutra*) in southern Britain: A feasibility study. R&D Technical Report TR W202. University of Exeter and University of Aberdeen.
- Dallas, J.F. and Pieltney, S.B., 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Molec. Ecol.*, 7(9): 1248-1251.
- Dallas, J.F., Bacon, P.J., Carss, D.N., Conroy, J.W.H., Green, R., Jefferies, D.J., Kruuk, H., Marshall, F., Pieltney, S.B. and Racey, P.A., 1999. Genetic diversity in the Eurasian Otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1-2): 73-86.
- Dallas, J.F., Carss, D.N., Marshall, F., Koepfli, K.P., Kruuk, H., Pieltney, S.B. and Bacon, P.J., 2000. Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. *Conservation Genetic*, 1: 181-185.
- Dallas, J.F., Marshall, F., Pieltney, S.B., Bacon, P.J. and Racey, P.A., 2002. Spatially restricted gene flow and reduced microsatellite polymorphism in the Eurasian otter *Lutra lutra* in Britain. *Conservation Genetics*, 3: 15-28.
- Dallas, J.F., Coxon, K.E., Sykes, T., Chanin, P.R.F., Marshall, F., Carss, D.N., Bacon, P.J., Pieltney, S.B. and Racey, P.A., 2003. Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Molecular Ecology*, 12: 275-282.
- Gera P., 2001. Az európai vidra (*Lutra lutra* Linneaus, 1758) állományfelméréseinek összefoglaló jelentése 1995-2001. Alapítvány A Vidrákért. Budapest.

- Heltai M., 2002.** Emlős ragadozók magyarországi helyzete és elterjedése. Szent István Egyetem, Vadbiológiai és Vadgazdálkodási Tanszék, Doktori disszertáció.
- Kranz, A., 2000.** Otters (*Lutra lutra*) increasing in Central Europe: from the threat of extinction to locally perceived overpopulation? *Mammalia*, 64: 357-368.
- Lanszki J., Körmendi S. és Hancz Cs., 1999.** Élőhelyi változások hatása vidrák táplálkozási szokásaira, élőhely használatára és állományalakulására - egy halastavon. *Halászatfejlesztés*, 21: 58-67.
- Lanszki J., 2002.** Magyarországon élő ragadozó emlősök táplálkozás-ökológiája. *Natura Somogyiensis*, 4: 1-177.

Preliminary results of the genetic analysis of otter (*Lutra lutra*) populations using microsatellite polymorphism in Hungary

Abstract

45 microsatellite alleles were determined in 9 microsatellite loci (Lut 435, 604, 615, 701, 715, 717, 733, 832, SRY) in otter (*Lutra lutra*) tissues (n = 25). In contrast with the relatively low number of loci, the test allowed individual identification.

Fresh spraints (faeces) collected on field (n=282) were analysed after DNA extraction using the same 9 microsatellite primers. The fluorescence labelled PCR products were analysed on ALFexpressII automatic DNA sequencer. Detectable quantities of DNA were extracted from 166 samples from which the PCR amplification was successful in 31 cases. From faeces 41 alleles were identified.

With the method used, the dynamics of otter populations were followed successfully on fish ponds.

Keywords: otter, microsatellite polymorphism, faecal DNA, PCR