

Válasz Dr. Herczeg Gábor bírálataira

Mindenek előtt köszönetet szeretnék mondani Dr. Herczeg Gábornak, amiért elvállalta dolgozatom bírálatát. Köszönöm az alapos munkát, amit befektetett a dolgozat aprólékos áttanulmányozásába. Külön köszönöm az építő kritikát, és a segítő szándékú megjegyzéseket. Nagyon örülök, hogy témaválasztásomat mind tudományos szempontból mind pedig általában értékesnek tartja. Jóleső érzéssel tölt el, hogy eddigi kutatási eredményeim alapján a Bíráló megalapozottnak tartja pályázatomat az MTA doktora címre. A továbbiakban pedig reagálni szeretnék a Bíráló megjegyzéseire, illetve válaszolok a feltett kérdésekre.

Megjegyzések, kisebb kérdések:

1. Egyetértek a Bírálóval abban, hogy egy cím (akár tanulmányé, akár disszertációé) akkor jó, ha informatív, ha rövid és figyelemfelkeltő. Sajnos nem erősségem a frappáns fogalmazás, ezért a címmel kapcsolatban az volt a törekvésem, hogy a lehetőségeken belül rövid és informatív legyen. Ha a címben pontosabban körülírtam volna a témát, akkor természetesen hosszabb lett volna, amit nem tartottam szerencsésnek.

2. A dolgozat szerkezetével kapcsolatban magam is sokat gondolkoztam. Az olvasmányosság szempontjából a Bíráló megjegyzése jogos. Ugyanakkor a javasolt szerkezetben nehezen lehetett volna elkerülni az ismétléseket a módszerek leírásakor, hiszen mind a laboratóriumi módszerek, mind pedig a genetikai adatok feldolgozása alapvetően hasonló volt a 10 esettanulmányban. Mindössze két olyan módszert, és a hozzájuk kapcsolódó statisztikai elemzést alkalmaztam, melyek csak 2-2 tanulmányban fordultak elő: (i) morфомetriai vizsgálatokat a *Maculinea nausithous* és az *Euphydryas aurinia*, míg mtDNS szekvencia elemzést a *Parnassius mnemosyne* és az *E. aurinia* esetében végeztünk.

3. A célkitűzések kapcsán a Bírálónak igaza van. Erősebb lett volna a megfogalmazás, ha pontokba szedem a részleteket.

4. A dolgozat irodalmi hivatkozásaira tett megjegyzéssel kapcsolatban a következőt tudom válaszolni. A dolgozatban szereplő genetikai vizsgálatokban (a korábban említett 2 esettanulmánytól eltekintve, ahol többek között mtDNS szekvencia elemzések is történtek) alapvetően enzim lokuszokat alkalmaztam markerként. A természetes populációk vizsgálata során alkalmazott molekuláris markerek viszonylag gyorsan változtak az utóbbi néhány évtizedben. Így amíg a 80-as években de még 90-es évek első felében is a legszélesebb körben elterjedt markerek az enzim lokuszok voltak, addig a 2000-es évek első évtizedében a mtDNSde főleg a mikroszatellittek teljesen átvették az uralkodó szerepet. Mivel, mint azt a dolgozat I.1.1. fejezetében is írtam, a Lepidoptera fajokban az enzim polimorfizmus mértéke viszonylag magas, ezért néhány, elsősorban európai kutatócsoportban (pl. Schmitt és munkatársai, vagy Habel és munkatársai) ezt a markert változatlanul alkalmazzák a különböző DNS technikák mellett. Így viszont napjainkban viszonylag kevés cikkben tanulmányozzák a nappali lepke fajok populációinak genetikai variabilitását enzim polimorfizmus segítségével. Minthogy a saját, enzimekre vonatkozó eredményeimet csak hasonló markerekkel nyert eredményekkel célszerű összevetni (pl. polimorfizmus szintje, differenciálódás mértéke, stb.), ezért meglehetősen szűk volt a merítési lehetőségem az irodalmi hivatkozások tekintetében.

Másrészt viszont az esettanulmányok nagy része 1, esetleg 2 fajra koncentrált. Ezért a dolgozatban, és az esettanulmányokból született cikkekben is, olyan munkákra hivatkoztam, amelyekben ugyanazt a fajt, vagy annak közeli rokonát elemezték akár genetikai (enzim polimorfizmust alkalmazva), akár ökológiai célból. Így tehát mind az alkalmazott marker, mind pedig a vizsgált fajok szűk köre miatt történhetett, hogy csak néhány esetben hivatkoztam például Hanskira és munkatársaira.

5. A Bíráló 5. megjegyzése a polimorfizmus különböző paramétereinek összehasonlításakor felmerülő hiányosságokra mutat rá. A Bírálónak igaza van, a polimorfizmus paramétereit tartalmazó táblázatokban az átlagok mellett szerepelnie kellene a szórás értékeinek is. Csak annyit tudok a mentségemre felhozni, hogy a legtöbb esettanulmányban ezekkel az adatokkal variancia analízist végeztem, és a következtetéseimet az ANOVA eredményei alapján vontam le a fajokra, vagy a fajon belül a földrajzi régiókra vonatkozóan.

A Bíráló ugyan együtt emlegeti, de én különválasztanám a polimorfizmus és a genetikai differenciálódás paramétereinek összehasonlítását. Miközben az F_{ST} értékek vonatkozásában is elfogadom a bíráló véleményét, vagyis a táblázatban szerepelnie kellett volna a szórás adatainak, azt ki kell emelnem, hogy a vizsgált fajokban a genetikai struktúra összehasonlítása kvalitatív jellegű volt. A legtöbb esetben a differenciálódás földrajzi mintázatát elemeztem, a kérdésem tehát egyszerűen az volt, hogy a hierarchia különböző szintjein kapott F_{ST} értékek alátámasztják-e a Bayes-féle klaszterezés eredményeit. Az esetek túlnyomó többségében, a hierarchikus genetikai struktúra megerősítéseként azt az eredményt kaptam, hogy a régiók közötti F_{ST} értékek szignifikánsak voltak, míg a régiókon belül, a populációk között nem.

6. A Bíráló 6. megjegyzése a különböző életmenetű és szaporodási stratégiájú fajok összehasonlítására vonatkozik. Köszönöm a kritikai megjegyzést. Valószínűleg nem fogalmaztam egyértelműen az eredmények megvitatása során. A kérdéses esettanulmányokban kapott eredmények általános voltát magam is kétségesnek tartom. Itt csak arra szerettem volna rámutatni, hogy a vizsgált fajtárok genetikai struktúrájára vonatkozó eredmények alátámasztották előzetes hipotézisemet. A gondolatmenetem az volt, hogy életmenetük alapján feltételeztem egy evolúciós erő – történetesen mindkét esettanulmányban (E.1.1.1. és E.1.1.2. fejezetek) a genetikai sodródás – eltérő intenzitását a populációkban, és ezek alapján felállítottam egy hipotézist a fajtárok genetikai struktúrájának a különbözőségére vonatkozóan. Bár az eredmények mindkét esetben alátámasztották a hipotézisemet, nem gondolom, hogy önmagában ez a két pozitív eredmény alkalmas lenne az általánosításra.

7. Nagyon valószínű, hogy az *Euphydryas aurinia* morfometriai adatainak főkomponens analízise során az első tengely maga a testméret volt, mivel a tengely meghatározásában mind az elülső mind pedig a hátulsó szárny 2-2 mérete bizonyult a legjelentősebbnek. Mivel azonban nem végeztünk olyan vizsgálatot, ahol megállapíthattuk volna a testméret és a szárnyméretek közötti korreláció szintjét, ezért nem tehattünk olyan megállapítást, ami a PCA eredményeit a testmérettel hozza összefüggésbe.

Fő kérdések:

1. A Bíráló azt kifogásolja, hogy a dolgozatban többször is előkerül a genetikai sodródás, mint a populációk közötti genetikai különbségeket előidéző folyamat, miközben háttérbe szorulni

látszik a lokális adaptáció jelentősége. A genetikai sodródás valóban többször merült fel a tapasztalt genetikai struktúra értelmezésére, mint a lokális adaptáció. Ezt részben magyarázhatja az a tény, hogy a két evolúciós hatásnak nem azonos a földrajzi léptéke. A drift hatásának genetikai következményei leginkább a populációk hierarchikus szerkezetében, lényegében a genetikai differenciálódás mintázatában tükröződnek. Ennek megállapítása azonban egy viszonylag nagyobb földrajzi léptékű elemzést igényel. A lokális adaptáció viszont ennél jóval kisebb földrajzi skálán mutatkozik. Az esettanulmányok nagy részében a minták a Kárpát-medence különböző régióiból származtak. A differenciálódás mintázatában jelentkező különbségeket ezért leginkább a genetikai sodródás alapján tudtuk értelmezni.

A Bíráló arra is felhívja a figyelmemet, hogy nem fogalmaztam egyértelműen arra nézve, hogy a drift jelentőségére tett megállapítás mennyire vonatkozik a fenotípusos jellegekre. Ebben a vonatkozásban a Bírálónak valószínűleg igaza van. Mivel minden esettanulmány központi témája a populációk genetikai szerkezetének enzimpolimorfizmus segítségével történő tanulmányozása volt, ezért a fenotípus kérdése háttérbe került a dolgozatban. A fenotípusra ható evolúciós folyamatok csak az *Euphydryas aurinia* morfometriai eredményeinek a megvitatása kapcsán merültek fel.

Arra a kérdésre pedig, hogy miért gondolom a genetikai sodródás szerepét jelentősnek a differenciálódás mintázatának a kialakításában, a következőt tudom válaszolni. A genetikai variabilitás molekuláris markerek segítségével megállapított struktúrájára ható evolúciós erők közül a szakirodalomban is a driftet szokták kiemelni, mivel a molekuláris markereket a legtöbb szerző neutrálisnak tekinti. Ebből a szempontból persze érdekes az enzim lokuszok megítélése. Mint azt a Dr. Pénzes Zsolt bírálatára adott válaszütemben is említettem, az enzim lokuszok neutrális voltát több szerző vitatja. Csak ismételni tudom az ott kifejtett nézetemet ezzel a kérdéssel kapcsolatban. Az enzimek bonyolult, több lépésből álló anyagcsere utak egyes részfolyamatait katalizálják. Tehát egyetlen csavart jelképeznek egy összetett gépezetben. Ezért a legtöbb esetben nincs is jelentős befolyásuk magának az anyagcsere útnak a sebességére, vagyis a fluxra. Mivel a fenotípust a teljes anyagcsere út, és nem annak részlépései befolyásolják, ezért az enzimek legnagyobb részének a katalitikus és egyéb biokémia jellemzői nem hatnak közvetlenül a fenotípusra. Ebből az is következik, hogy az ilyen enzim lokuszok neutrálisnak tekinthetők. De mint minden anyagcsere folyamat, így a flux is szabályozás alatt áll. Ebben a szabályozó folyamatban általában az anyagcsere út egyik enzime játszik kitüntetett szerepet. Ez az enzim lokusz tehát nem neutrális, hiszen befolyásolja a fluxot, és így közvetlenül hat a fenotípusra.

Így tehát teljesen egyetértek a Bíráló azon megállapításával, mely szerint a genom fenotípust befolyásoló lokuszain érvényesülhet a szelekció hatása, míg a többi neutrálisnak tekinthető lokuszon a drift lehet az elsődleges evolúciós erő. Bár ez utóbbi megállapítást módosíthatja az a tény, hogy az egyébként neutrális lokuszok közvetve lehetnek szelekciós hatásoknak kitéve, ha szoros kapcsoltságban állnak egy másik, szelekciósan célpontnak tekinthető lokusszal („hitchhiking effect”).

Mivel a molekuláris markerek néhány kivételtől eltekintve (lásd előbb) neutrálisak, vagyis alternatív változataiknak nincs eltérő adaptív értéke, ezért rájuk elsődlegesen a sztochasztikus folyamatok, tehát a drift hat. Hangsúlyozom azonban, hogy ez a megállapítás a neutrális molekuláris markerekre vonatkozik. Azokban a tanulmányokban, ahol a célkitűzés a neutrális genetikai és a feltehetően adaptív fenotípusos változatosság szerkezetének az összevetése a cél, az eredmények nagyrészt alátámasztják azt a feltételezést, hogy a genetikai és fenotípusos differenciálódás mintázata (F_{ST} versus Q_{ST}) eltérő (pl. Leinonen et al. 2007 és a benne szereplő referenciák). A legtöbb esetben a neutrális lokuszok alapján megállapított F_{ST}

értékek alacsonyabbak, mint a fenotípusos differenciálódást jelző Q_{ST} értékek, mivel a fenotípusos jellegeken a sztochasztikus folyamatokon túlmenően még szelekciós hatások is érvényesülnek. Amennyiben egyes marker lokuszok esetében az F_{ST} magasabb, mint a fenotípusos jellegek alapján megállapított Q_{ST} , akkor a kérdéses markerek neutralitása megkérdőjelezhető.

2. A Bíráló második kérdése, bár egyszerűnek tűnik, meglehetősen összetett. A populációgenetikai szakirodalomban a migrációra megállapított $N_m=1$ érték tekinthető egyfajta határértéknek. E fölött az érték fölött a populációk között >1 egyed vándorol generációnként, és így az ilyen populációk pánmiktikusaknak tekinthetők.

A kérdés második része bonyolultabb: Hogyan definiálom a populációt? Teoretikusan csakis a megfelelő szintű differenciálódással, tehát a génáramlás relatíve alacsony szintjével definiálhatjuk a populációk elkülönülését, bár erre nézve csak elvétve vannak irodalmi támpontok. A praktikum oldaláról tekintve pedig a habitatok távolsága és a kérdéses faj diszperziós képességének a viszonya, valamint az esetleges migrációs barrierek megléte megfelelő támpontot nyújt ahhoz, hogy mikor tekinthetünk két habitat folton élő népeséget önálló populációnak. A jelölés-visszafogás módszerét genetikai vizsgálatokkal párosítva jó eséllyel eldönthető a populációk kiterjedése. Az én vizsgálataim során ez a kérdés ritkán merült fel, mert a minták legnagyobb része olyan habitatokból származott, melyeknek a távolsága egyértelműen nagyobb volt, mint a kérdéses faj diszperziós képessége. Egy-két kivétel azonban az általam vizsgált esettanulmányokban is adódott. Ilyen volt például az *Euphydryas maturna* Fényi-erdőben élő két szubpopulációja, melyek között mindössze 3,5 km a távolság. Bár ez bőven túllép az egyedek átlagos diszperziós távolságán (≈ 500 m), az erdőben több tisztás és szélesebb út található, melyeken legalább időszakosan detektálhatók a lepkék. A két szubpopuláció között tehát, ha nem is közvetlenül, de áttételesen megfelelő intenzitású lehet a migráció.

3. A genetikai sodródás neutrális folyamat, eredményeként tehát úgy alakul ki a differenciálódás, hogy annak sem földrajzi, sem pedig ökológiai mintázata nem lesz. Ezzel szemben a divergens szelekció hatására létrejövő genetikai differenciálódás határozott mintázatot mutat, ami az esetek jelentős többségében ökológiai differenciálódást takar. Erre talán a legszerencsésebb példát éppen a dolgozat egyik esettanulmányának az eredménye szolgáltatja. Az E.2.1. fejezetben két hasonló habitatban élő *Maculinea* faj, a *M. alcon* lápi ökotípusa és a *M. teleius* populációinak genetikai struktúráját hasonlítottam össze. A két faj életmenete alapvetően hasonló, hiszen obligát mirmekofil fajok. Ennek eredményeként populációikban intenzívek a sztochasztikus hatások, tehát a drift következményeként a populációkon belül alacsony szintű variabilitásra, míg a populációk között jelentős mértékű differenciálódásra számítottunk. Az eredmények a várakozásnak megfelelően alakultak, bár volt némi különbség a két faj között. Nevezetesen a *M. alcon* populációk variabilitása szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott, mint a *M. teleius* populációké. Ezt a különbséget azzal magyaráztuk, hogy a *M. teleius* tápnövénye (*Sanguisorba officinalis*) viszonylag egyenletesen oszlik el a habitatban, amiből egyértelműen következik, hogy a tápnövényből kipotyogó hernyók eloszlása is egyenletesebb, mint a *M. alcon* hernyóké. Tekintettel arra, hogy a hangyagazda fészkek eloszlása random, a *M. alcon* hernyók egyenetlen eloszlása fokozza a sztochasztikus hatások érvényesülését. Tovább erősíti a sztochasztikus hatásokat az is, hogy a hangyagazda fészkeiben több kakukk-életmódú *M. alcon* hernyó él, mint predátor *M. teleius* hernyó. Az intenzívebb drift következménye pedig alacsonyabb szintű változatosság

lesz a populációkon belül. Viszont ha a random folyamatok intenzívebbek a *M. alcon* populációkban, akkor a közöttük kialakuló genetikai differenciálódásnak is sztochasztikus jellegűnek kell lennie, tehát nem számítottunk arra, hogy a differenciálódásnak mintázata lesz. Az eredményeink azonban ennek éppen az ellenkezőjét mutatták. A *M. alcon* populációk közötti differenciálódásnak határozott mintázatát tapasztaltuk a Bayes-féle klaszterezés eredményei alapján. A kibontakozó genetikai struktúráról az első pillanatban megállapítottuk, hogy ez a hierarchikus szerkezet nem a földrajzi régiók alapján alakult ki. A későbbiek során kiderült, hogy a differenciálódás mintázata egyértelműen ökológiai alapú, a hasonló hangyagazdát használó populációk jelentős genetikai hasonlóságot mutattak. Felvetődhet a kérdés, hogy a *M. teleius* esetében mennyire befolyásolták a populációk közötti differenciálódás mintázatát az eltérő hangyagazdák. A Bayes-féle klaszterezés eredményei alapján a *M. teleius* populációk differenciálódásának a mintázata sokkal kevésbé kifejezett, mint a *M. alcon* populációké. Meglepő lehet, hogy a hangyagazdák ilyen eltérő hatást gyakorolnak a két faj genetikai struktúrájára, miközben alapvetően mindkét faj obligát mirmekofil. A két faj hernyójának azonban eltérő a viselkedése a hangyafészkekben: a *M. alcon* hernyók kakukk-életmódúak, míg a *M. teleius* hernyók predátorok. A kakukk-viselkedés szoros kapcsolatot tételez fel a hernyók és az őket gondozó hangya dolgozók között, ami erősíti a lokális adaptációt a kérdéses hangyagazda faj fészkéhez.

4. A Bíráló által felvetett hipotézissel kapcsolatban van egy általános, és egy, a konkrét esettanulmányra vonatkozó véleményem. Teoretikus oldalról közelítve, a környezet változatossága többféle lehet. Eltérő környezeti viszonyok még egy habitaton belül is megjelenhetnek szisztematikusan, vagy eltérő habitat foltok, vagy időben rendszeresen visszatérő környezeti változások (pl. évszakok) formájában. Ha egy habitat különböző foltjaiban eltérőek bizonyos környezeti tényezők, akkor ezek kiválthatnak eltérő szelekciós hatásokat. Ennek a genetikai következményeit elemzik a niche-szelekció modelljei. Bár a különböző modellek részletei eltérőek, az általuk várt genetikai következmények hasonlóak, vagyis ilyen heterogén környezetben magas szintű populációkon belüli változatosság várható. Ha azonban a környezeti változatosság random a habitaton belül, akkor nem idézhet elő egyértelmű szelekciós választ. Éppen a Bíráló által felvetett szülői befektetés kapcsán született meg a random környezetben érvényesülő anyai hatás speciális esete a szülői esély növelés („bethedging”), amelynek értelmében a nőstény egy kiszámíthatatlan módon változó környezetben azzal tudja az utódok túlélési esélyét, és ezáltal a saját fitnessét növelni, ha fokozza az utódok változatosságát.

A Bíráló 4. kérdését azonban arra az esettanulmányra is lehet vonatkoztatni, amelyben felvetődött az r- és K-stratégia. Az E.1.1. fejezetben azt elemeztem, hogy a *Parnassius mnemosyne* populációkban magasabb szintű enzim polimorfizmust tapasztaltunk, mint az *Euphydryas maturna* populációkban. Ezt a szignifikáns különbséget a két faj eltérő szaporodási stratégiájából adódó eltérő intenzitású drift hatásával magyaráztuk. A két faj szaporodási stratégiája között azonban nemcsak az a különbség, hogy a *P. mnemosyne* kevesebb, de nagyobb petéket rak, mint az *E. maturna*, hanem a peték elhelyezése is alapvetően eltérő stratégiát mutat. Az *E. maturna* 1-2 csomóba rakja a petéit, míg a *P. mnemosyne* nagy területen szórja szét őket. Ezért a sztochasztikus mortalitás, amit a Bíráló is említ, az *E. maturna* nőstények utódait nem egyforma mértékben érintik (pl. egy predátor vagy egy parazitoid megtalálja a hernyófészket, vagy kedvezőtlen időjárási események történnek). Meg kell azonban jegyezni, hogy egy alapvető random jelenség a *P. mnemosyne* peték túlélését is meghatározza: nevezetesen a tápnövény hajtásai csak tavasszal jelennek

meg, miközben a nőstények peterakási időszaka a nyár eleje. A nőstény tehát random módon szórja el a petéit, és így azok vagy egy kikelő *Corydalis* hajtás közelében lesznek, vagy nem. Ennek a véletlen jelenségnek a hatását csökkenti azzal a nőstény, hogy nagy területen szórja szét a petéket, vagyis a tápnövény hajtásainak a véletlenszerű eloszlása, illetve az ebből adódó random mortalitás hasonló módon érinti a populáció nőstényeinek az utódait. Ugyanakkor az is növeli az utódok túlélését, hogy a peték nagyok, sok tartalék anyagot tartalmaznak. Mindkét faj esetében beszélhetünk tehát random mortalitásról, de ennek a mértéke és az eloszlása a nőstények utódai között eltérő a két faj esetében.

5. Természetesen szerencsés lett volna a morfológiai jellemzők vonatkozásában is megállapítani a fenotípusos differenciálódás mértékét (P_{ST} értékek), és összevetni azt a molekuláris markerek alapján kapott értékekkel. Bár egy ilyen analízis hasznos voltát megkérdőjelezi az a tény, hogy a morfometriai vizsgálatokban kisebb és kevesebb mintával dolgoztunk. Ezekben az analízisekben ugyanis csak azokat a hím egyedeket használtuk fel, amelyeknek a szárnyai jól mérhetőek maradtak a gyűjtés és a tárolás során.

6. A minta nagysága mind a vizsgált egyedek, mind pedig a marker lokuszok vonatkozásában attól függ, hogy milyen kérdésre kíván a kutató választ adni a vizsgálatok során. Amikor a populáción belüli finom struktúrára vonatkoznak a kérdések (családszerkezet, szaporodási rendszer, stb.) akkor sok markerre (akár több mint 30 variábilis lokusz) van szükség ahhoz, hogy az eredmények jól értelmezhetőek legyenek. Ha a populáció térbeli struktúráját („landscape genetics”) vizsgálja egy kutató, akkor inkább a mintaszám növelését ($N > 30$) kell szem előtt tartani. Ha azonban egy közepes méretű földrajzi régióban (mint pl. a Kárpát-medence) akarja feltárni a kutató egy faj genetikai struktúráját, akkor a 8-10 variábilis lokusz, és $N \approx 15-25$ egyed/minta elegendő populációnként. Viszont egy ilyen vizsgálatban sok mintára van szükség, optimális esetben minden régióból, ahol a faj a kérdéses területen előfordul, 3-5 populáció mintáját célszerű begyűjteni. Ugyanakkor a lokális adaptáció vizsgálata során általában csak néhány populáció (pl. különböző ökotípusok 2-3 populációja) mintáját elemzik, de ilyenkor több száz marker lokuszt (korábban AFLP, manapság SNP) alkalmaznak.

Remélem, hogy a Bíráló el tudja fogadni a kérdésekre és a megjegyzésekre adott válaszaimat. Még egyszer köszönöm a dolgozat értékelését és örülök, hogy a Bíráló számos eredményemet tartotta kiemelésre méltónak.

Debrecen, 2019. 01. 25.

Pecsenye Katalin