

**Doktori Értekezés
az MTA doktora cím elnyerésére**

**Védett lepkék populációinak
genetikai diverzitása**

Pecsenye Katalin

Debrecen

2017

Tartalomjegyzék

Munkám előzményei (Irodalmi áttekintés)	5
I.1. A genetikai variabilitás	5
I.1.1. A természetes populációk variabilitásának mértéke (enzimpolimorfizmus)	7
I.1.2. A populációk genetikai variabilitásának vizsgálata az enzimpolimorfizmus segítségével	9
I.1.3. A genetikai változatosság vizsgálatának jelentősége a természetvédelmi munkában	10
I.2. A populációk variabilitását befolyásoló tényezők	12
I.2.1. A történeti múlt hatása a genetikai variabilitásra	13
I.2.2. A közeli múltban és a jelenben érvényesülő hatások	14
I.2.2.1. A genetikai sodródás (drift)	14
I.2.2.2. A beltenyészet	15
I.2.2.3. A genetikai variabilitás struktúrája	16
I.2.2.4. Lokális adaptáció	17
Célkitűzések	18
Anyagok és módszerek	19
M.1. A vizsgált fajok	19
M.1.1. Kis apollólepke, <i>Parnassius mnemosyne</i> (LINNAEUS, 1758)	19
M.1.2. <i>Euphydryas</i> genusz (SCUDDER, 1872)	20
M.1.2.1. Díszes tarkalepke, <i>Euphydryas (Hypodryas) maturna</i> (LINNAEUS, 1758)	20
M.1.2.2. Lápi tarkalepke, <i>Euphydryas (Eurodryas) aurinia</i> (ROTTEMBURG, 1775)	21
M.1.3. Hegyi szerecsenboglárka, <i>Aricia artaxerxes</i> (FABRICIUS, 1793)	22
M.1.4. <i>Maculinea</i> (<i>Phengaris</i>) genusz (VAN EECKE, 1915)	22
M.1.4.1. Szürkés hangyaboglárka, <i>Maculinea alcon</i> ([DENIS & SCHIFFERMÜLLER], 1775)	23
M.1.4.2. Sötét hangyaboglárka, <i>Maculinea nausithous</i> (BERGSTRÄSSER, 1779)	24
M.1.4.3. Vérfű hangyaboglárka, <i>Maculinea teleius</i> (BERGSTRÄSSER, 1779)	24

M.2. Mintavétel	24
M.3. Az enzimpolimorfizmus vizsgálata	25
M.4. DNS szekvencia vizsgálatok	25
M.5. Szárny morfolometriai vizsgálatok	26
M.5.1. <i>Euphydryas aurinia</i>	26
M.5.2. <i>Maculinea nausithous</i>	26
M.6. A genetikai adatok elemzése során alkalmazott statisztikai módszerek	28
M.6.1. <i>A genetikai variabilitás mérőszámai</i>	28
M.6.2. <i>A genetikai differenciálódás mérőszámai</i>	28
M.6.2.1. Cavalli-Sforza és Edwards féle hűrtávolságok. Dendrogram szerkesztés a távolságmatrix alapján	28
M.6.2.2. Wright-féle F-statisztika	29
M.6.2.3. A migránsok effektív száma	29
M.6.3. <i>A populációk közötti genetikai differenciálódás mintázatának vizsgálata</i>	29
M.6.3.1. Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA)	29
M.6.3.2. Bayes-féle klaszterezési módszer	30
M.6.3.3. Főkomponens analízis	30
M.6.3.4. Mantel-teszt	30
M.6.4. <i>A különböző evolúciós folyamatok genetikai következményei</i>	31
M.6.4.1. A palacknyak hatás kimutatásának lehetősége	31
M.6.4.2. A diverzifikáló szelekció kimutatásának lehetséges módja	31
M.6.4.3. A populáción belüli rokonsági viszonyok vizsgálata	31
M.7. A DNS szekvencia adatok elemzése során alkalmazott statisztikai módszerek	32
M.8. A morfolometriai vizsgálatokban alkalmazott statisztikai módszerek	32
M.8.1. <i>A morfológiai változatosság mértéke – Levene-féle változó</i>	32
M.8.2. <i>A morfológiai változatosság szerkezete</i>	33
M.8.2.1. Hierarchikus varianciaanalízis	33
M.8.2.2. Diszkriminancia analízis	33
M.8.3. <i>Korrelációs vizsgálatok</i>	34
M.8.4. <i>A fluktuáló aszimmetria vizsgálata</i>	34

Esettanulmányok

E.1. A kis populációkban érvényesülő evolúciós hatások tanulmányozása	34
E.1.1. Genetikai sodródás	34
E.1.1.1. A szaporodási stratégia hatása a populációk genetikai szerkezetére: az <i>Euphydryas maturna</i> és a <i>Parnassius mnemosyne</i> populációk enzimpolimorfizmusának összehasonlítása	34
E.1.1.2. A fakultatív és az obligát mirmekofília genetikai következményei: az <i>Aricia artaxerxes</i> és a <i>Maculinea alcon</i> (cruciata ökotípus) genetikai változatosságának összevetése	42
E.1.1.3. A palacknyak hatás genetikai lenyomatának vizsgálata az <i>Aricia artaxerxes issekutzi</i> bükk-fennsíki és gömör-tornai-karszti populációiban	47
E.1.2. Beltenyészet	54
E.1.2.1. A finom genetikai struktúra tanulmányozása az <i>Euphydryas maturna</i> egyik nyírségi populációjában	54
E.2. A variabilitás mértékére és szerkezetére ható ökológiai faktorok	62
E.2.1. A lokális adaptáció vizsgálata a <i>Maculinea alcon</i> és <i>M. teleius</i> populációkban	63
E.3. A populációk genetikai struktúráját alakító erők eltérő idősíkjai	70
E.3.1. A <i>Parnassius mnemosyne</i> populációk genetikai struktúrája	71
E.3.2. Az <i>Euphydryas aurinia</i> populációk genetikai struktúrája	78
E.4. Konzervációgenetikai egységek	87
E.4.1. Evolúciósan szignifikáns egység (ESU)	88
E.4.1.1. <i>Maculinea</i> fajok	88
E.4.2. Funkcionális konzervációs egység (FCU)	93
E.4.2.1. A <i>Maculinea nausithous</i> kelet-közép-európai populációi: ESU, vagy FCU?	93
E.4.2.2. Az <i>Euphydryas maturna</i> Kárpát-medencei populációi	100
Következtetések	108
Köszönetnyilvánítás	112
Irodalomjegyzék	113
Függelék	135

Munkám előzményei (Irodalmi áttekintés)

I.1. A genetikai variabilitás

Evolúciós szempontból a természetes populációk legfontosabb jellemzője a genetikai változatosság (Hedrick, 1985; Stearns & Hoekstra, 2000; Ridley, 2003; Futuyma, 2005). Ez a változatosság biztosítja egyrészt az aktuális környezethez való alkalmazkodást; másrészt pedig ezen alapul a populációk hosszú távú fennmaradása is (Soulé, 1987). A környezet ugyanis folyamatosan és nehezen megjósolható módon változik, amihez egy populáció csakis úgy képes alkalmazkodni, ha variábilis, vagyis számos genetikai lokuszon vannak benne alternatív allélok. Ezért nem túlzás azt állítani, hogy a populációk változatossága meghatározza evolúciós potenciáljukat. A genetikai organizáció hierarchikus szerveződésének megfelelően, a variabilitásnak több szintje van.

(1) A fenotípusos változatosság megnyilvánulhat a morfológiai, fiziológiai, vagy éppen a viselkedési jellegek kapcsán. Ezeknek a jellegeknek közös jellemzője, hogy genetikai és környezeti tényezők egyaránt részt vesznek a kialakításukban (pl. Falconer, 1989; Lynch & Walsh, 1998 és a bennük lévő számtalan hivatkozások). A genetikai faktorok alapján mennyiségi, vagy sokgénés jellegeknek tekintjük őket, hiszen több gén vesz részt a kialakításukban. A sok génen számos genotípus kombináció jelenhet meg, ezért ezeknek a jellegeknek nagy a genetikai varianciája. Ugyanakkor még az azonos genotípusok fenotípusa is eltérő lehet különböző környezetben, vagyis ezek a jellegek plasztikusak (fenotípusos plaszticitás), és így nagy jelentőségük van az adaptációban (pl. DeWitt & Scheiner, 2004; Whitman & Ananthakrishnan, 2009).

(2) A kromoszómális polimorfizmus a kromoszómák alakjának, vagy számának a változatosságában nyilvánul meg (pl. White, 1973; Blackman, 1980; Powell, 1997; Ridley, 2003 stb.). Populációs szinten viszonylag ritkábban jelenik meg, bár közismert például a *Drosophila* fajok inverziós polimorfizmusa (pl. Powell, 1997 és a benne lévő hivatkozások), vagy a B kromoszómák számbeli változatossága néhány faj esetében (pl. Camacho, Sharbel, & Beukeboom, 2000; Jones & Houben, 2003 stb.). A kromoszóma változatokra heterozigóta egyedek ugyanis az esetek túlnyomó többségében alacsony fertilitásúak (Ridley, 2003). Ezért az inverzió és a transzlokáció, de különösen a poliploidia megjelenése és elterjedése egy populációban divergens fejlődést indít meg, és gyakran vezet fajkeletkezéshez (pl. Nevo, 2001; Rieseberg, 2001; Navarro & Barton, 2003).

(3) Az 1900-as évek második felétől kezdve, a molekuláris technikák elterjedésével lehetőség nyílt a fehérje/enzim, majd később a DNS szintű változatosság tanulmányozására is (pl. Lewontin & Hubby, 1966; Hillis & Moritz, 1990; Avise, 1994 stb.). A fehérjék alternatív változatainak a kimutatása révén már az enzimpolimorfizmus vizsgálatának eredményei is rávilágítottak arra, hogy a természetes populációk jóval variábilisabbak, mint azt korábban feltételezték (Dobzhansky, 1955). A DNS szintű variabilitás vizsgálata, az RFLP, RAPD, AFLP, vagy a mikroszatellitek alkalmazása, pedig még az enzimeknél is magasabb szintű változatosságot tárt fel a populációkban (pl. Avise, 1994; Smith & Wayne, 1996 stb.). A DNS technikák közül elsősorban a mikroszatellitek kell kiemelni, melyek rendkívüli változatosságuk miatt hamar elterjedtek a természetes populációk vizsgálatában (pl. Bruford & Wayne, 1993;

Schlötterer, 1998; Lowe, Harris, & Ashton, 2009 és a bennük lévő hivatkozások stb.). A mikroszatellitek ugyanis alkalmasak azoknak a fajoknak a tanulmányozására is, melyeknél az enzimpolimorfizmus jellemzően alacsony szintűnek mutatkozott, ugyanakkor pedig kiválóan megfelelnek arra a célra is, hogy a populációk finom szerkezetét elemezzük a segítségükkel (pl. Jarne & Lagoda, 1996; Beaumont *et al.*, 2001). A mikroszatellitek további előnye, hogy neutrális markerek, hiszen egyszerű repetitív szekvenciák. Így korábban azt tételezték fel róluk, hogy nincs funkciójuk. Az újabb kutatási eredmények azonban azt látszanak alátámasztani, hogy szerepük lehet a kromatin organizációban, vagy a gének aktiválási folyamataiban (Li *et al.*, 2004 és a benne szereplő hivatkozások).

A DNS szintű variabilitás tanulmányozásának a legközvetlenebb formája azonban a szekvencia, vagyis a bázissorrend megállapítása. A DNS szekvencia adatok felhasználási lehetősége rendkívül széleskörű, melyek közül most két területet emelnék ki: (a) a mitokondriális, illetve a növényeknél a kloroplaszt DNS szekvenciák analízise; (b) a genom szintű nukleotid polimorfizmus (SNP) vizsgálata.

(a) A mtDNS szekvenciák elemzésének a jelentősége részben abból adódik, hogy magas bennük a mutációk gyakorisága, ezért relatíve nagy a nukleotid diverzitásuk (Brown, 1981). Másrészt viszont a mtDNS-re jellemző az anyai öröklődés, ami azt jelenti, hogy a zigótába lényegében csak a petesejtből kerülnek be a mitokondriumok (Giles *et al.*, 1980; Avise, 1994 stb.) Ennek az a következménye, hogy a mtDNS variabilitása szinte kizárólag a mutációk felhalmozódására vezethető vissza, és az anyai, valamint az apai DNS rekombinációja csak nagyon estlegesen járul ehhez hozzá. Így a mtDNS szekvencia változatok (haplotípusok) közvetlenül levezethetők egymásból, vagyis az őket hordozó egyedek/taxonok leszármazási kapcsolatai is egyértelműek (Taberlet, 1996). Ha pedig a haplotípusok leszármazási kapcsolatait párhuzamba állítjuk az őket hordozó egyedek földrajzi elhelyezkedésével, akkor megállapíthatjuk a populációk közötti leszármazási kapcsolatokat is. Ez a kutatási terület, a filogeográfia, aminek a kialakulása az 1990-es évek elejére tehető, és Avise, amerikai kutató nevéhez kötődik (Avise, 1994, 2000, 2009; Hickerson *et al.*, 2010). A filogeográfia jelentősége elsősorban az, hogy feltárja az área változásának genetikai következményeit, egyértelmű bizonyítékát nyújtva annak, hogy a fajok elterjedési területe dinamikusan változik. Segítségével kimutatható az áréak beszűkülése, vagy éppen expanziója a nagy klimatikus változások hatására (pl. eljegesedés, felmelegedés), illetve klímamodellezési eljárásokkal kombinálva rekonstruálható a fajok populációdinamikája is (pl. Magri *et al.*, 2006). A kutatások eredményei mutattak rá számos mérsékelt övi faj área expanziójának a dinamikájára a legutolsó eljegesedés óta (pl. Taberlet *et al.*, 1998; Avise, 2000; Hewitt, 2001, 2004 valamint a bennük lévő hivatkozások). Mivel ezeket a változásokat elsősorban a klíma megváltozása indukálta, tanulmányozásuk segíthet abban, hogy a napjainkban zajló klímaváltozás várható hatásait előrejelezhessük (pl. Gómez Cano *et al.*, 2013).

Meg kell azonban jegyezni, hogy a mtDNS szekvenciák kizárólagos alkalmazása a filogeográfiai kutatásokban problémákat is rejt magában, amelyek alapvetően a magi és a mitokondriális DNS eltérő biológiai jellemzőire vezethetők vissza (Ballard & Whitlock, 2004; Hurst & Jiggins, 2005). Ezeknek a problémáknak a megoldására az utóbbi időben a mtDNS szekvenciák mellett standard magi szekvenciákat is alkalmaznak a filogeográfiai vizsgálatokban (Ballard & Whitlock, 2004; Toews & Brelsford, 2012).

(b) A DNS szekvenciák analízise, az újgenerációs DNS technikák elterjedésével, egyre gyakrabban szerepel a konzervációgenetikai kutatások eszköztárában (Morin, Luikart, &

Wayne, 2004; Kohn *et al.*, 2006; Allendorf, Hohenlohe, & Luikart, 2010). Az egyedek szekvencia adatai alapján az SNP („Single nukleotid polymorphism”), vagyis a nukleotid változatosság a genom egy, vagy több régiójában megállapítható (pl. Vignal *et al.*, 2002; Sobrino, Brión, & Carracedo, 2005; Kim & Misra, 2007 stb.). Az SNP tanulmányozása az egész genom szintjén azonban még elsősorban a humán populációkban (McVean *et al.*, 2004; Hinds *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009; The 1000 Genomes Project Consortium, 2012 stb.), valamint a mezőgazdasági szempontból fontos növény- és állatfajokban jellemző (a termesztett növényekben: Ganai, Altmann, & Röder, 2009; a rizsben: McNally *et al.*, 2009; a juhban: Kijas *et al.*, 2009; a szarvasmarhában: The Bovine HapMap Consortium, 2009 stb.). Az egész genomra, vagy annak jelentős hányadára kiterjedő szekvenálás azonban kezd terjedni a természetes populációk vizsgálatában is (például a barna medve és a jegesmedve esetében Cronin *et al.*, 2014; vagy az észak-amerikai farkas populációkban Cronin *et al.*, 2015 stb.).

1.1.1. A természetes populációk variabilitásának mértéke (enzimpolimorfizmus)

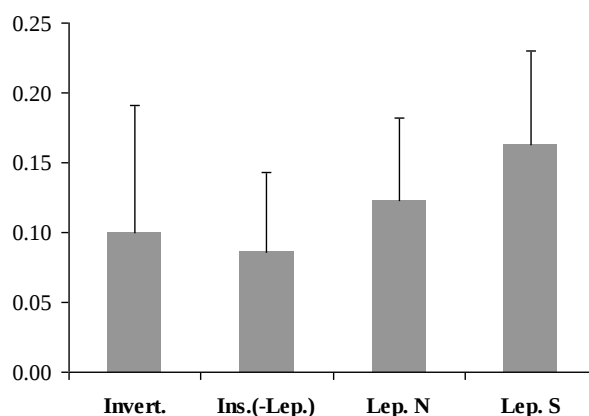
Az evolúció tudomány történetében egy viszonylag hosszú ideig vitatott kérdés volt a természetes populációk variabilitásának a mértéke (Lewontin, 1974; Mayr & Provine, 1981; Provine, 2001). Két ellentétes elmélet alakult ki, melyeket Dobzhansky (1955) nevezett el klasszikus és „balansz” hipotézisnek. A klasszikus hipotézis azt feltételezte, hogy a populációk variabilitása alacsony szintű, vagyis kevés lokuszon található bennük alternatív allél, és ebből adódóan átlagos heterozigótaságuk is alacsony. Ezzel ellentétben a „balansz” hipotézis szerint a populációk változatosak, sok lokuszon van jelen több allél, és így az átlagos heterozigóta gyakoriság is magas (Lewontin, 1974; Spiess, 1977). A variabilitás valós mértékének a megállapítása azonban csak akkor vált lehetővé, amikor a molekuláris technikák alkalmazása révén sikerült számos lokuszon (vagyis egy, a genomból vett véletlen mintán) kimutatni az alternatív allélok jelenlétét/hiányát (Lewontin, 1974; Spiess, 1977).

A molekuláris szintű változatosság tanulmányozása az enzimpolimorfizmus vizsgálatával kezdődött az 1960-as évek végén (Lewontin & Hubby, 1966). Az egyes lokuszokon megjelenő alternatív allélok által kódolt enzim változatokat (alloenzimek) elektroforézis segítségével lehet elválasztani (Murphy *et al.*, 1990; May, 1992; Manchenko, 2002; Richardson, Baverstock, & Adams, 2012). Az elektroforézis a töltéssel rendelkező molekuláknak elektromos erőterben való elmozdulásán alapuló elválasztás technika. Az eljárás során a különböző méretű és töltésű fehérjék vándorlási sebességük alapján különülnek el (Murphy *et al.*, 1990; Avise, 1994; Leberg, 1996). A gélelektroforézist követően az enzimek specifikus hisztokémiai eljárások révén megfesthetők, így az allélikus változatok direkt módon vizsgálhatók (Shaw & Prasad, 1970; Murphy *et al.*, 1990; Thorpe & Solé-Cava, 1994). Mivel az alloenzimek kodomináns öröklődést mutatnak, az egyedek genotípusa a gélkép alapján közvetlenül meghatározható.

Az enzimpolimorfizmus vizsgálatának már az első eredményei is azt mutatták, hogy a lokuszok jelentős hányadán (~30%) vannak jelen alternatív allélok, és magas a populációk átlagos heterozigóta gyakorisága (~10%) (Lewontin, 1974; Nevo, Beiles, & Ben-Shlomo, 1984). Ugyanakkor az is hamar kiderült, hogy az élővilág rendkívül sokszínű a polimorfizmus mértékét illetően. Érdekes módon azonban, a fajok közötti nagy eltérések ellenére is, sikerült szignifikáns különbséget kimutatni az állatvilág két nagy csoportja (gerincesek és gerinctelenek) között a változatosság mértékében. Nevezetesen, a gerinctelenek enzimpolimorfizmusa magasabb szintűnek mutatkozott, mint a gerinceseké (pl. Selander & Whittam, 1983; Nevo *et al.*, 1984 stb.). Sőt a gerinces osztályok között is

jelentős különbségeket tapasztaltak a kutatók a heterozigótaság mértékében, a kételtűeket (12 vizsgált faj) szignifikánsan magasabb heterozigóta gyakoriság jellemezte, mint a többi gerinces osztályok fajait (Nevo, 1978).

Bár az utóbbi 10-15 évben a DNS technikák széleskörű elterjedése háttérbe szorította az enzimek alkalmazását a természetes populációk variabilitásának a vizsgálatában, a Lepidoptera fajok esetében még mindig széles körben használják ezt a markert (pl. Vandewoestijne *et al.*, 2004; Bereczki *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 2006; Pecsénye *et al.*, 2007; Schmitt & Müller, 2007; Neve *et al.*, 2008a; Habel *et al.*, 2011; Habel & Schmitt, 2012a; Louy *et al.*, 2013a; Junker *et al.*, 2015 stb.). Ennek sok más mellett az is oka lehet, hogy a rovarok között a lepkénél figyelhető meg az egyik legmagasabb szintű variabilitás az enzim lokuszokon. Az irodalmi adatok összesítése során (74 faj adatait elemző 104 tanulmány) megállapítottam, hogy a Lepidoptera fajokban a lokuszokon tapasztalt átlagos allélszám $n_A=2,06$; a heterozigóták átlagosan várt gyakorisága $H_e=0,166$ és a polimorf lokuszok aránya $P_{95}=0,453$. Ezek az értékek magasabbak, mint a Nevo *et al.*, (1984) által publikált adatokból a rovar fajokra számított átlagok: $H_e=0,095$ és $P_{95}=0,378$ (I.1. ábra). De ha a Nevo *et al.*, (1984) által használt Lepidoptera adatokat átlagoljuk ($H_e=0,123$; $P_{95}=0,411$), akkor azok az értékek is magasabbak, mint az összes addig vizsgált rovarfajra megállapított átlagos mutatók. Úgy tűnik tehát, hogy a Lepidoptera fajokra valóban magasabb szintű enzimpolimorfizmus jellemző, mint általában a rovarokra.



I.1. ábra: A várható heterozigótaság (H_e) mértéke a különböző gerinctelen taxonokban. Invert.: valamennyi gerinctelen fajban (Nevo és mtsai. 1984); Ins.(-Lep.): a rovarokban a Lepidoptera fajok nélkül (Nevo és mtsai. 1984); Lep. N: a Lepidoptera fajokban (Nevo és mtsai. 1984); Lep. S: a Lepidoptera fajokban a saját elemzésem alapján.

Napjainkban azonban az enzimeket egyre inkább háttérbe szorítják a mikroszatellitek a természetes populációk variabilitásának a vizsgálatában. Ennek elsősorban az a magyarázata, hogy a mikroszatellitek variabilitása jelentősen magasabb, mint az enzim lokuszoké. Ugyanakkor nehéz a két marker variabilitását korrekt módon összehasonlítani, mert a mikroszatellitek vizsgálata során csak a kellően változatos lokuszokat használják a kutatók, amelyeken számos alternatív allél jelenik meg. Az enzimpolimorfizmus összesített adatai között viszont a monomorf lokuszok is szerepelnek, melyek a lepkék esetében a lokuszok mintegy 55%-át teszik ki. Ha ezt az arányt figyelembe véve extrapolálunk a lepke fajok polimorf enzim lokuszaira, akkor a variabilitás mutatói a következőképpen módosulnak: átlagos allélszám $n_A \sim 4,6$ a várható heterozigótaság pedig $H_e \sim 0,306$.

1.1.2. A populációk genetikai variabilitásának vizsgálata az enzimpolimorfizmus segítségével

Az enzimpolimorfizmus vizsgálatának előnyei és hátrányai is vannak. A módszer egyik fontos előnye, hogy az enzimpolimorfizmusra vonatkozóan nagy mennyiségű adat áll a rendelkezésünkre. Csak a nappali lepke fajok tekintetében is számos vizsgálatot végeztek, például a *Polyommatus coridon* európai populációiban (Schmitt & Seitz, 2001, 2002; Krauss *et al.*, 2004); az *Aricia* fajokra vonatkozóan (Aagaard *et al.*, 2002; Pecsénye *et al.*, 2007a); a *Melanargia galathea* esetében (Habel, Schmitt, & Müller, 2005; Schmitt *et al.*, 2006); a *Boloria aquilonaris* populációkban (Vandewoestijne *et al.*, 2004b); a *Maculinea alcon* Kárpát-medencei populációiban (Bereczki *et al.*, 2005; Bereczki, Pecsénye, & Varga, 2006); az *Erebia medusa* európai populációiban (Schmitt & Müller, 2007); a *Thymelicus* fajokban (Louy *et al.*, 2007); a *Coenonympha pamphilus* populációkban (Besold *et al.*, 2008); az *Erebia euryale* esetében (Schmitt & Haubrich, 2008) tanulmányozták az enzimpolimorfizmust. További előny, hogy komoly statisztikai módszer együttes van a birtokunkban, és így részletesen tanulmányozható a populációk genetikai struktúrája. Egy másik fontos előny a módszer olcsósága, amely lehetővé teszi sok enzim lokusz és számos minta párhuzamos vizsgálatát. Ebből adódóan az enzim lokuszok nagy földrajzi léptékben is alkalmazhatók a differenciálódás mintázatának a vizsgálatára (Habel *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 2006; Schmitt & Haubrich, 2008; Schmitt & Zimmermann, 2012; Junker *et al.*, 2015).

Az enzimpolimorfizmus tanulmányozásának a hátrányai három pontban foglalhatók össze (Lowe *et al.*, 2009 és a benne lévő hivatkozások).

(a) A vizsgálatokhoz viszonylag nagy mennyiségű szövetmintára van szükség, amiből az következik, hogy a mintavételezés destruktív (Avisé, 1994; Leberg, 1996; Parker *et al.*, 1998; Lowe *et al.*, 2009). Ez különösen a kis testű élőlények (pl. rovarok) esetében jelent komoly problémát, a veszélyeztetett fajoknál pedig rendkívül nagy körültekintést igényel. A rovarpopulációkban azonban, nagy szaporaságuknak köszönhetően, a mintavétel rendszerint megvalósítható a populációk veszélyeztetése nélkül is. Ráadásul a mérsékelt övben élő rovarok jelentős hányada nem átfedő generációkkal rendelkezik, ami lehetővé teszi, hogy a mintavételezést az adott faj peterakási időszaka után tervezzük (Meglécz *et al.*, 1997; Bereczki *et al.*, 2005, 2006). A mintákkal kapcsolatban további nehézséget jelent az, hogy az eredményes vizsgálatokhoz az enzimeknek a minta gyűjtésétől a feldolgozásig működőképesnek kell maradniuk. Ebből következik, hogy már a gyűjtés során, majd azt követően is gondoskodni kell a minták megfelelő hűtéséről.

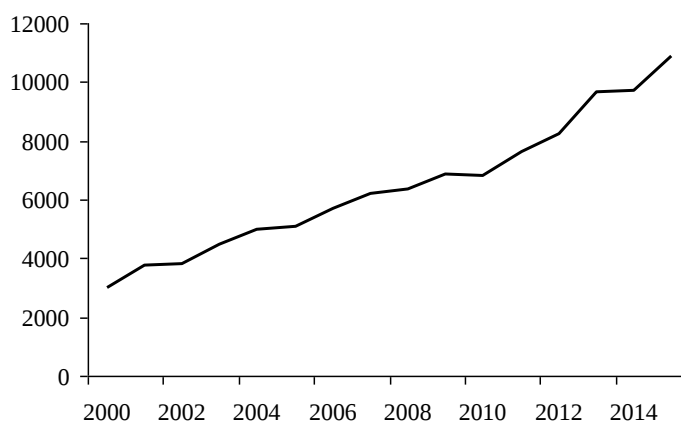
(b) Az enzimpolimorfizmus vizsgálatának egy további korlátja a lokuszok viszonylag alacsony szintű variabilitása. Ennek az áll a hátterében, hogy a DNS szintjén meglévő teljes diverzitásnak mindössze 22%-a mutatható ki az enzimek elektroforetikus vizsgálatával. Egyrészt a pontmutációk 32%-a szinonim kodont eredményez, másrészt az aminosav cserék csak akkor mutathatók ki gélelektroforézis segítségével, ha azok a fehérje töltésváltozásával járnak együtt (Nei, 1978; Lowe *et al.*, 2009). Az enzim lokuszok variabilitása tehát a DNS-szintű változatossághoz képest korlátozott mértékű, és az alacsony variabilitás kevés információt hordoz. Az emlősök körében az enzimpolimorfizmus szintje gyakran igen alacsony, ami különösen igaz a nagytestű fajokra (Nevo *et al.*, 1984; Hoelzel *et al.*, 2002). Ugyanakkor a rovarok, de különösen a lepkék esetében meglehetősen magas szintű variabilitást tapasztaltak az enzimpolimorfizmus vizsgálata során (lásd az 1.1. fejezetet).

(c) Az enzim lokuszok neutrális voltát sok kutató megkérdőjelezi (Mitton, 1997; Parker *et al.*, 1998; Lowe *et al.*, 2009 és a bennük szereplő hivatkozások). Több vizsgálat sorozatban valóban sikerült kimutatni a szelekció hatását bizonyos fajokban, konkrét enzim lokuszokon. Így szelekciót detektáltak az alkohol dehidrogenáz enzim lokuszán (*Adh*) a *Drosophila melanogaster*-ben (van Delden, 1982; Geer, Heinstra, & McKechnie, 1993), a leucin aminopeptidáz enzim lokuszán (*Lap*) a *Mytilus edulis*-ban (Koehn & Mitton, 1972; Koehn, Milkman, & Mitton, 1976), vagy a foszfoglukóz izomeráz lokuszán (*Pgi*) a *Colias* lepkékben (Watt, 1977, 1983) és a *Melitaea cinxia* populációkban (Haag *et al.*, 2005; Orsini *et al.*, 2009). Ezek a vizsgálatok azonban csak néhány konkrét enzim esetében igazolták a szelekció hatását, amiből hiba lenne olyan általános következtetést levonni, hogy az enzimek (tanulmányonként hozzávetőlegesen 15-20 lokusz), nem neutrális markerek. Hartl, Dykhuizen, & Dean (1985) például az enzim lokuszok neutrális voltát a flux elmélet alapján közelítette meg. Megállapították, hogy az egyes enzim reakciók csak kis mértékben befolyásolják az anyagcsere folyamatok sebességét (flux). Ebből adódóan az enzimváltozatok között meglévő biokémiai különbségek alig okoznak változást a fluxban és így a fitnessre gyakorolt hatásuk is elhanyagolható (Dykhuizen, Dean, & Hartl, 1987; Eanes, 1999). Ez alól az általános összefüggés alól azok az enzimek tekinthetők kivételnek, amelyek magát a fluxot szabályozzák. A szabályozó enzim eltérő katalitikus hatással rendelkező alternatív változatai ugyanis az egész anyagcsere folyamat sebességét befolyásolják, és így közvetlen hatással lehetnek az egyed fitnessére.

1.1.3. A genetikai változatosság vizsgálatának jelentősége a természetvédelmi munkában

A genetikai variabilitást az evolúció nyersanyagának is tekinthetjük, melyet a különböző evolúciós folyamatok szüntelenül alakítanak, formálnak (Stearns & Hoekstra, 2000; Ridley, 2003; Futuyma, 2006). Tulajdonképpen ezekkel a hatásokkal, és azok következményeivel foglalkozik a populációgenetika (Spiess, 1977; Ridley, 2003; Hedrick, 2011). Ugyanakkor a populációgenetikai kutatások napjainkban egyre inkább elmozdulnak a természetvédelmi szempontú kérdésfelvetés irányába. A konzervációgenetika egy új tudományterület, ami a természetvédelmi szempontból jelentős folyamatok genetikai hátterét és következményeit elemzi (Frankham, Briscoe, & Ballou, 2002; Allendorf & Luikart, 2009). Ez a kutatási terület viszonylag fiatal, és voltaképpen a populációgenetikából nőtt ki. Frankham (2010) úgy fogalmazott, hogy a konzervációgenetika egy alkalmazott tudomány, ami ötvözi az evolúcióbiológiát és a molekuláris genetikát, hogy tudományosan megalapozza a biodiverzitás megőrzését. A konzervációgenetika elkülönülése a populációgenetikától akkor vált lehetővé, amikor a molekuláris technikák egyre szélesebb körben elterjedtek a populációs szinten zajló folyamatok kutatásában (Avisé, 1994; Allendorf & Luikart, 2009; Frankham, 2010a; Ouborg *et al.*, 2010). Egyúttal ez a folyamat tette lehetővé azt is, hogy ez a kezdetekben elméleti tudományterület egyre inkább empirikussá váljon (Ouborg *et al.*, 2010).

A konzervációgenetika napjainkban nagyon intenzíven fejlődő tudományterület. Az ilyen tárgyú tudományos cikkek száma több mint a háromszorosára nőtt 2000 és 2015 között, ha a konzervációgenetika, genetikai variabilitás, ESU, FCU és MU kulcsszavakra keresünk rá



I.2. ábra: A konzervációgenetikai tárgyú publikációk alakulása 2000 és 2015 között a Science Direct adatai alapján. A keresés kulcsszavai a konzervációgenetika, genetikai variabilitás, ESU, FCU és MU voltak.

a Science Direct-ben (I.2. ábra). A publikációs lehetőségek is egyre bővültek az olyan folyóiratok feltűnésével, mint a *Journal of Insect Conservation* (1997-), a *Conservation Genetics* (2000-), az *Insect Conservation and Diversity* (2008-), vagy az *Organisms Diversity and Evolution* (2010-). A konzervációgenetika expanziójának az okát DeSalle & Amato, (2004) abban látta, hogy ez a tudomány terület egy „krízis diszciplína”. A biodiverzitás csökkenése (Singh, 2002; Jones *et al.*, 2004; Henle *et al.*, 2008), a fajok kipusztulása (Turner, 1996; Andreone *et al.*, 2005; Courchamp *et al.*, 2006), a természetes habitatok degradációja és fragmentálódása (Andrén, 1994; Bearzi, Holcer, & Notarbartolo di Sciara, 2004; Cushman, 2006) egyértelmű krízis helyzetet idézett elő a biológiai sokféleség fennmaradása szempontjából. Ebben a krízisben vált rendkívül fontossá, hogy megértsük azokat a genetikai folyamatokat, amik egyrészt a változások háttérében állnak, másrészt számolni tudjunk ezeknek a folyamatoknak a genetikai következményeivel. A krízis diszciplínák jellemzője az is, hogy a hozzájuk kapcsolódó metodikák intenzíven fejlődnek, felgyorsítva ezáltal magának a krízis területnek a fejlődését is (DeSalle & Amato, 2004). Így a konzervációgenetika fellendülését is nagyban elősegítette a molekuláris technikák gyors diverzifikációja és elterjedése, ami megkönnyíti az adatgyűjtést; valamint a statisztikai eszköztár rohamos bővülése, ami viszont az adatok feldolgozásának lehetőségeit tágítja.

A konzervációgenetika rendkívül szerteágazó diszciplína, ami számos kutatási területet foglal magába a taxonómiai bizonytalanságok megoldásától kezdve, a kis populációkban zajló evolúciós változások detektálásán keresztül, a populációstruktúra elemzéséig; valamint a hibridizáció kimutatásától kezdve a természetvédelmi bűnügyek feltárásáig (Frankham *et al.*, 2002; DeSalle & Amato, 2004). Éppen szerteágazó volta miatt képes releváns háttér információt szolgáltatni a természetvédelmi problémák feltárásához, miközben a kutatások eredményei hozzásegítenek ezek megoldásához is (pl a fajok veszélyeztetettségi fokának a megállapítása, és ezzel párhuzamosan a kritikus fajok megőrzési programjának kidolgozása). Frankham (2010) 8, míg DeSalle & Amato (2004) 12 pontban foglalta össze a konzervációgenetika szerepét a természetvédelmi gyakorlatban. A disszertáció keretei nem teszik lehetővé, hogy részleteiben áttekintsem ezeket a kutatási területeket. Egy pont bemutatását azonban, a disszertáció témáját tekintve is fontosnak tartok: azoknak az egységeknek (populációk, vagy taxonok: ökotípusok, alfajok, fajok) a kijelölését, amiknek a

védelse és megőrzése kardinális kérdés a gyakorlati természetvédelmi munkában. A konzervációgenetikában ezeknek az egységeknek két alaptípusát definiálták: az evolúciósan szignifikáns egységet (ESU) és a funkcionális konzervációs egységet (FCU) vagy természetvédelmi egységet (MU).

Az evolúciósan szignifikáns egység fogalmát (Evolutionary Significant Unit, ESU) Ryder (1986) vezette be, aki az ESU-t genetikailag és adaptívan differenciálódott populációnak tekintette. Az elmúlt évtizedekben az ESU fogalma sokat változott (Crandall *et al.*, 2000). Waples (1991) a reprodukív izoláció révén különvált populációcsoportokat tekintette ESU-nak. Ezt követően Moritz (1994) reciprok monofiletikus egységként értelmezte a fogalmat, azaz a különböző ESU-k eltérő mtDNS haplotípusokat tartalmaznak és a nukleáris markerek tekintetében is jelentősen különböző frekvencia eloszlást mutatnak. Manapság a Crandall *et al.* (2000) által definiált fogalom a leginkább elfogadott, akik a genetikai mellett az ökológiai differenciálódás fontosságát hangsúlyozták a különböző ESU-k között. Ez a definíció ugyanakkor rávilágít az ESU alkalmazásának a problémájára is, ami abból az ellentmondásból adódik, hogy a genetikai és az ökológiai differenciálódás folytonos, míg az ESU dichotómikus kategória (egy adott populáció csoport ESU vagy nem). Bár az ESU értelmezése nagyon változatos a konzervációgenetikai szakirodalomban, a legtöbb tanulmányban taxonómiai szempontból is jól elkülöníthető populációcsoportokként jelennek meg, melyeknek gyakran önálló elterjedési területük van, mint a fajok, az alfajok esetleg ökotípusok, vagy földrajzi rasszok.

A másik fontos konzervációbiológiai egység a funkcionális konzervációs egység („Functional Conservation Unit”, FCU) vagy természetvédelmi egység („Management Unit”, MU) amit demográfiai és ökológiai szempontból elkülönült populációk alkotnak (Maes *et al.*, 2004; Allendorf & Luikart, 2009). Palsbøll, Bérubé, & Allendorf (2007) azonban azt javasolták, hogy az FCU/MU kijelölésének az alapja a genetikai differenciálódás mértéke legyen, míg Funk *et al.* (2012) az FCU/MU-k közötti adaptív különbségek jelentőségét hangsúlyozták. Az FCU használata sem egyértelmű tehát a konzervációgenetikai szakirodalomban. Ugyanakkor a gyakorlati természetvédelmi munkában a fajmegőrzési programoknak fontos részét kell hogy képezze azoknak a populációknak / populáció csoportoknak a kijelölése és megőrzése amik jelentősen differenciálódtak a többitől, és így számottevően hozzájárulnak a faj genetikai diverzitásához (Funk *et al.*, 2012). Mind az ESU, mind pedig az FCU fogalma akkor válik világossá, ha a közöttük lévő hierarchikus kapcsolat alapján közelítjük meg őket, vagyis azt vesszük alapul, hogy egy ESU-n belül akár több FCU-t is elkülöníthetünk. Az FCU-k ugyanis olyan populációkat reprezentálnak, amelyek fontosak az ESU-k hosszú távú megőrzése szempontjából (Vila *et al.*, 2006; Funk *et al.*, 2012).

1.2. A populációk variabilitását befolyásoló tényezők

A populációk jelenlegi struktúrájának a kialakításában számos hatás játszik szerepet. Az egyik jelentős befolyás a faj történeti múltjából eredeztethető, mert a kérdéses populációk közös, vagy éppen eltérő származása még a jelenben is meghatározó a közöttük lévő differenciálódás mértékét és mintázatát tekintve (Avisé, 2000, 2009 és a bennük szereplő hivatkozások). Ugyanakkor a közelmúltban és a jelenben játszó folyamatok szintén befolyásolják a genetikai variabilitás szerkezetét. A habitatok egyre növekvő fragmentációja és beszűkülése a populációméret csökkenését, és így a drift felerősödését eredményezi. A kis, izolált populációkban pedig egyre fokozódik a beltenyészet is (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf & Luikart, 2009). Ugyanakkor a lokális populációk túlélése szempontjából igen

jelentős lehet a szelekció hatása különösen akkor, ha a populáció szuboptimális habitatban él. Ezek az evolúciós erők mind hozzájárulnak ahhoz a mintázathoz, amit az egyes fajok genetikai differenciálódásában napjainkban tapasztalunk.

1.2.1. A történeti múlt hatása a genetikai variabilitásra

A populációk jelenkori genetikai állományát nagymértékben meghatározza, hogy milyen a történeti múltjuk. A fajok elterjedési területe, és így populációik helyzete is folyamatosan változott a földtörténeti korok során. A filogeográfiai kutatások eredményei alapján nyomon követhetjük a fajok jelenlegi áréájának a kialakulását, különös tekintettel a legutolsó eljegesedés óta eltelt időszakra. Kimutathatók a mérsékelt övi fajok refúgiumai, amikbe visszahúzódtak a jégtagaró kiterjedésekor, illetve azok a kolonizációs útvonalak, melyeken keresztül benépesítették jelenlegi elterjedési területüket a jégtagaró visszahúzóódása után (Taberlet, 1996; Taberlet *et al.*, 1998; Avise, 2000; Hewitt, 2001, 2004, 2011; Schmitt, 2007 stb.). Ugyanakkor a populációk recens genetikai struktúráját is jelentősen befolyásolja az, hogy hány különböző refúgiumból, vagy eltérő kolonizációs útvonalról származnak az egyedek, amelyek egy adott területen élnek. Ezeket a folyamatokat világosan tükrözi a mtDNS haplotípus csoportok száma és földrajzi eloszlása (lásd 3.1 és 3.2 fejezetek).

A filogeográfia gyorsan népszerű tudományággá nőtt ki magát, hiszen segítségével sok olyan problémát lehetett megoldani, amelyeket a klasszikus módszerekkel nem, vagy csak részben sikerült: például a farkas jelenlegi elterjedési területének kialakulása Észak-Amerikában (Vilà *et al.*, 1999); a fekete patkánysikló alfajai (Burbrink, Lawson, & Slowinski, 2000); a gímszarvas alfajai és eredete (Ludt *et al.*, 2004); a barnamedve európai refúgiumai (Taberlet & Bouvet, 1994; Valdiosera *et al.*, 2007); a keresztes vipera refúgiumai (Ursenbacher *et al.*, 2006) stb. A filogeográfiai tanulmányok a különböző rovarok, így a Lepidoptera fajok esetében is egyre nagyobb számban jelennek meg: például az *Euphydryas aurinia* angol populációiról (Joyce & Pullin, 2001), vagy áréájának nyugat-európai területeiről (Junker *et al.*, 2015); az *Aglaia urticae* palearktikus elterjedési területéről (Vandewoestijne *et al.*, 2004a); a Palearktikus Parnassiinae fajokról (Nazari & Sperling, 2007); a *Melitaea cinxia* európai és ázsiai populációiról (Wahlberg & Saccheri, 2007); a *Parnassius mnemosyne* európai populációiról (Gratton, Konopiński, & Sbordoni, 2008); a *Maculinea nausithous* és *M. teleius* palearktikus elterjedési területéről (Ritter *et al.*, 2013) stb.

A rovarok esetében azonban problémák merültek fel a mtDNA szekvencián alapuló filogeográfiai tanulmányokkal kapcsolatban (Kodandaramaiah *et al.*, 2013). A probléma okozói azok az endoparazita mikrobák (közülük a *Wolbachia* a legismertebb), amik csak anyai ágon juthatnak be a következő generációba, és ezért fokozzák a nőstény utódok túlélését a hímekkel szemben (Werren, Windsor, & Guo, 1995; Hurst & Jiggins, 2005). Hatásmechanizmusuk rendkívül változatos a feminizációtól kezdve a citoplazmatikus inkompatibilitáson keresztül a hímgyilkosságig (Werren, Baldo, & Clark, 2008). A *Wolbachia* fertőzés következtében a mtDNS szekvencia analízisek több szempontból is problémássá váltak. A probléma egyik forrása a mtDNS és a *Wolbachia* „kapcsolt” anyai öröklődése, ami a mtDNS változatok vonatkozásában azt eredményezi, hogy a *Wolbachia* fertőzés elterjedése során a mitokondriális haplotípusok diverzitása erősen lecsökkenhet (szelektív seprű) (DeWayne Shoemaker, Keller, & Ross, 2003; Gompert *et al.*, 2008). Így a mtDNS variabilitása sokkal inkább tükrözi a *Wolbachia* fertőzés történetét, mint a gazdafajét (Jiggins, 2003). A *Wolbachia* fertőzés másik problémája a citoplazmatikus inkompatibilitás következménye. Az inkompatibilitás ugyanis nemcsak a fertőzött és nem

fertőzött egyedek között jelentkezik hanem a különböző törzsekkel fertőzött egyedek között is kialakul. Így a mitokondriális és a nukleáris gének szekvenciái alapján szerkesztett törzsfák ellentmondásba kerülhetnek egymással (mitonukleáris diszkordancia) (Narita *et al.*, 2006; Gompert *et al.*, 2008; Toews & Brelsford, 2012).

1.2.2. A közeli múltban és a jelenben érvényesülő hatások

A közeli múltban és a jelenben érvényesülő hatások azok az evolúciós folyamatok, amelyek gyorsan és hatékonyan képesek a populációk genetikai állományát átalakítani. Ezek közül a folyamatok közül a dolgozatban azokat emelném ki, melyeknek természetvédelmi szempontból különösen nagy jelentősége van. A konzervációgenetika területén azok az evolúciós változások a lényegesek, amelyek a kis populációkban zajlanak. Az emberi tevékenység következtében ugyanis egyre intenzívebbé válik a mezőgazdasági területek térhódítása a természetes élőhelyek rovására, vagy a tradicionális földhasználat (erdőművelés, kaszálás stb.) megváltozása. Az egyre fokozódó antropogén hatásoknak pedig az a következménye, hogy a habitatok feldarabolódnak és beszűkülnek, vagyis a populációk mérete fokozatosan csökken, miközben izolációjuk fokozódik. Ezek a hatások az európai nappali lepke fajok populációit is súlyosan érintették, amit számos faj visszaszorulása, populációik hanyatlása és kipusztulása jelez (New, 1997; van Swaay & Warren, 1999; van Swaay *et al.*, 2010a). Ennek következtében egyre bővül a veszélyeztetett fajok listája mind európai (IUCN „Red list”), mind pedig hazai szinten (Vörös könyv).

1.2.2.1. A genetikai sodródás (drift)

A genetikai sodródás tulajdonképpen a generációról generációra zajló “genetikai mintavételi hiba” következménye, aminek az eredménye az allélfrekvencia állandó, véletlenszerű változása (Maynard Smith, 1989; Futuyma, 2006 stb.). Ez a folyamat mindaddig zajlik, míg allélfixálódás vagy allélkiesés révén irreverzibilissé nem válik. A drift következményeként tehát a populáció hosszú távon allélokat veszít, és így csökken a variabilitása. A genetikai sodródás mértéke függ a populáció méretétől (Hartl, 1988; Ridley, 2003; Hedrick, 2011 stb.). Egy kis populációban, az allélgyakoriság nagymértékű ingadozása mellett, hamarabb következik be az allélfixálódás illetve az allélkiesés. Vagyis egy kicsi populáció sokkal jobban ki van téve a “véletlenek játékanak”, mint egy nagy populáció. Mivel a genetikai sodródás véletlenszerű, nem jár együtt a populáció fokozott mértékű alkalmazkodásával. Sőt, a genetikai variabilitás csökkenése azt eredményezi, hogy a populáció evolúciós flexibilitása csökken. A környezet állandó változásához ugyanis csak egy variábilis populáció képes alkalmazkodni.

A genetikai sodródás egyik nevezetes este a “bottleneck”, vagyis a palacknyak-effektus. Palacknyak-effektusnak azt az eseményt nevezzük, amikor a populáció egyedszáma a környezetváltozás hatására viszonylag gyorsan csökken le. Ez a jelenség is tekinthető egy speciális „mintavételi folyamatnak” amikor az egyedszám-csökkenés hatására egy nagy populációból véletlenszerűen marad életben néhány egyed. Ezekben a véletlen túlélő egyedekben nem minden allél található meg, ami eredetileg jelen volt a populációban, tehát palacknyak hatására is csökken a variabilitás. Valószínűségi alapon azt is megállapíthatjuk, hogy a ritka allélok elvesztésének van a legnagyobb esélye (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf & Luikart, 2009). Egy mutáció-drift egyensúlyban lévő populációban a legtöbb allél ritka ($q < 0,1$), míg az egyre növekvő gyakorisági osztályba tartozó allélok száma exponenciálisan csökken. Ezt az egyensúlyi eloszlást figyelembe véve, az allélok száma alapján becsülni lehet a várható heterozigóta gyakoriságot. Palacknyak hatására azonban az

allélok gyakorisági eloszlása megváltozik. Lecsökken a ritka allélok száma, és ezzel párhuzamosan relatíve több allél tartozik a közepes gyakorisági osztályokba (Cornuet & Luikart, 1996a; Luikart *et al.*, 1998). Mivel a heterozigóták gyakoriságát elsősorban ezek, a közepes gyakoriságú allélok határozzák meg, ezért palacknyak után a populáció tényleges heterozigóta gyakorisága magasabb lesz, mint az allélszámok alapján becsült várható heterozigóta gyakoriság (ami feltételezi az allélok egyensúlyi eloszlását). Ez az átmeneti heterozigóta többlet az alapja a palacknyak hatás statisztikai kimutatásának a természetes populációkban (Luikart & Cornuet, 1998).

Egy populációrendszer tagjaiban párhuzamosan, zajlik a genetikai sodródás. Az egymástól függetlenül zajló “random walk” eredményeként genetikai különbségek alakulnak ki a populációk allélfrekvenciájában, vagyis genetikai differenciálódás történik. Minél kisebbek a populációk, annál nagyobb lesz bennük az allélfrekvencia ingadozása, és ennek következtében annál nagyobb különbségek alakulhatnak ki közöttük. A genetikai differenciálódás tehát alapvetően a populációkban zajló sztochasztikus folyamatok következménye. Bár fontos megjegyezni, hogy az eltérő habitatokban zajló diverzifikáló szelekció szintén növeli a genetikai különbségek megjelenésének esélyét.

I.2.2.2. A beltenyészet

A beltenyészet során kialakulnak és egyre nagyobb arányban jelennek meg rokon egyedek a populációban. A folyamat lényegében arra vezethető vissza, hogy az allélok véletlenszerűen kerülnek bele a következő generációba. Így minden generációváltáskor előfordulhat, hogy nem ugyanaz lesz az utódgeneráció allélkészlete, mint a szülői generációé volt (genetikai mintavételi hiba). Ilyenkor az esetlegesen “kimaradó” allél helyét a populáció gaméta készletének egy másik allélja foglalja el. A beltenyészet esetében ennek a jelenségnek azt az oldalát vizsgáljuk, hogy ez az „új allél” leszármazási kapcsolatban áll-e az egyedek allél készletében már jelen lévő allélok valamelyikével (Maynard Smith, 1989; Hedrick, 2011 stb.). Azok az egyedek ugyanis, akik származásilag közös allélokat hordoznak rokonok. Mivel a közös származású allélok megjelenése egy kis és izolált populációban gyakori, ezért a beltenyészet genetikai következményei elsősorban ilyen populációkban jelentkeznek. A genetikai következmények között a populáció heterozigóta gyakoriságának a csökkenését, és ezzel párhuzamosan a homozigótaság fokozódását kell kiemelni. Mivel a variabilitás egyik fontos mérőszáma a heterozigóták gyakorisága, lényegében a beltenyészet során is csökken a variabilitás mértéke. Minthogy a variabilitás mértéke és a populációk evolúciós potenciálja között szoros összefüggés van, ezért a beltenyészet genetikai következményeinek elemzése vezetett a minimális evolúcióképes populáció fogalmának a definiálásához (Lande & Barrowclough, 1987). Ebben a populációban az effektív populációméret minimum $N_e=500$, mert elméletileg ekkora egyedszám mellett képes a mutáció kiegyensúlyozni a beltenyészet hatását, azaz a populáció hosszú távon képes megőrizni a variabilitását.

A beltenyészet genetikai hatásai mellett számolni kell annak további következményével, a beltenyésztéses leromlással is. Minél nagyobb mértékű egy populációban a beltenyészet, vagyis minél erősebb a heterozigóta hiány mértéke, annál jobban csökken a populáció átlagos rátermettsége (Hartl, 1988; Futuyma, 2006 stb.). Tulajdonképpen ez az összefüggés vezetett el a minimális életképes populáció fogalmának a megalkotásához, ami azt a minimális populáció méretet definiálja ($N_e=50$), ami alatt már a közvetlen kihalás veszélye fenyeget (Lande & Barrowclough, 1987). Egy populáció kihalásának összetett folyamatát a kihalási örvény mutatja be. Ennek során a kis populációméret eredményezi a sztochasztikus

folyamatok (genetikai sodródás és beltenyészet) felerősödését, aminek eredményeként csökken a populáció fitnesze, és ez a populációméret további csökkenésére vezet, végül a populáció kipusztul (pl. Gilpin & Soulé, 1986; Frankham, 1995; Palomares *et al.*, 2012).

Mind a genetikai sodródás, mind pedig a beltenyészet a genetikai mintavételi hibán alapuló folyamat, ezért több párhuzam is vonható közöttük. A genetikai mintavételi hiba mértéke a populáció méretének a függvénye. Ebből adódik, hogy mindkét evolúciós folyamat a kis populációkban lép fel intenzívebben, ráadásul minél kisebb a populáció, annál erőteljesebb benne a hatásuk. A drift és a beltenyészet további közös vonása, hogy eltérő módon ugyan, de mindkettő csökkenti a genetikai variabilitást. A genetikai sodródás során az allélkiesés révén csökken az allélok száma (lásd 3.2.1. fejezet), míg a beltenyészet nem az allélok számát változtatja meg, hanem a genotípus gyakoriságokat tolja el a homozigótáság fokozódásának irányába.

1.2.2.3. A genetikai variabilitás struktúrája

Egy populációrendszer tagjai között genetikai különbségek jelennek meg a generációk során. Ezeknek a különbségeknek a hátterében elsősorban a genetikai sodródás áll (3.1.1. fejezet), bár a diverzifikáló szelekció hatását is számításba kell venni. A genetikai differenciálódás intenzitása egyenes arányban áll a drift hatásának erősségével (Hartl, 1988; Futuyma, 2006; Hedrick, 2011 stb.). Ez a jelenség azonban csak részben magyarázza egy populációrendszer genetikai szerkezetét. A populációk közötti migráció következtében fellépő génáramlás ugyanis szintén hat a differenciálódás mértékére, nevezetesen csökkenti azt. A migráció intenzitása szoros kapcsolatban áll a fajok diszperziójával, egy alacsony diszperziós képességű faj esetében a migráció csak kis mértékben ellensúlyozza a drift, vagy a szelekció diverzifikáló hatását (Hartl, 1988). A génáramlás és a drift (szelekció), mint ellentétes hatású folyamatok egyensúlyra vezethetnek, és kialakul a populációk között tapasztalható differenciálódás mértéke. Mivel a migráció intenzitása függ a populációk közötti földrajzi távolságtól, ezért az egyensúlyi differenciálódás is távolság-függő lesz. Egy drift-migráció egyensúlyban lévő populációrendszerben tehát a földrajzi távolság növekedésével fokozódik a genetikai differenciálódás mértéke; ez a távolsággal arányos izoláció modellje (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf & Luikart, 2009 stb.).

Egy populációrendszerben a genetikai variancia hierarchikus szerkezetű, a totális varianciának két komponense van: a populációkon belüli és a populációk közötti variancia komponensek. Wright (1978) ezeket a komponenseket indexekkel jellemezte, az F_{IT} jellemzi a totális varianciát, az F_{IS} a populációkon belüli, míg az F_{ST} a populációk közötti komponens. Mivel ezek az indexek a megfelelő variancia komponensnek csak a relatív nagyságát fejezik ki, ezért nem összegződnek, közöttük az alábbi összefüggés áll fenn:

$$(1-F_{IT}) = (1-F_{IS}) * (1-F_{ST})$$

Az F_{ST} , a populációk közötti variancia komponens jellemző index, egyúttal a genetikai differenciálódás leggyakrabban alkalmazott mérőszáma, a fixációs index. A faj elterjedési területén azonban a populációrendszerek megjelenése nem folytonos, hanem a tájszerkezet változatossága miatt populáció csoportok alakulnak ki. Ezek a populációcsoportok gyakran különböző földrajzi egységekhez (pl. régiókhoz) köthetők. A távolsággal arányos izoláció modelljéből következik, hogy a populációcsoportokon (pl. földrajzi régiókon) belül, az intenzívebb migráció következtében, alacsonyabb lesz a differenciálódás mértéke, mint a különböző csoportok (pl. földrajzi régiók) populációi között. Kialakul tehát a genetikai

differentiálódás hierarchikus szerkezete, ami tükrözheti például a populációk földrajzi régiók szerinti tagolódását is (Wright, 1978).

Előfordulhat azonban, hogy a génáramlás és a genetikai sodródás között nem alakul ki egyensúly. Ilyenkor a genetikai differentiálódás a távolságtól függetlenül alakul, és akár távoli populációk genetikai állománya is válhat hasonlónvá, vagy esetleg közelié mutathat jelentős különbségeket. Ilyen helyzet kétféle módon is kialakulhat:

(a) Migrációs barrierek vannak a populációk között, amik gátolják a génáramlást, és teret adnak az egyre fokozódó differentiálódásnak. Mivel a differentiálódás hátterében elsősorban sztochasztikus hatások állnak, ezért kiszámíthatatlan lesz annak mértéke. Ilyenkor a differentiálódás átlagos szintje és annak varianciája is magas lesz (pl.: a galléros leguán (*Crotaphytus collaris*) ozarki populációiban (Hutchison & Templeton, 1999)). Hasonló eredményre vezet, ha a migráció rátájához képest nagyon jelentős a genetikai sodródás intenzitása. Ilyenkor az alacsony szintű génáramlás nem tudja a drift hatását ellensúlyozni, és így a populációk közötti aktuális differentiálódás szintje véletlenszerűen alakul, nem függ a földrajzi távolságtól.

(b) Intenzív migráció esetén viszont épp az ellenkező jelenséget tapasztaljuk. Ilyenkor a populációk között olyan erős a génáramlás, hogy genetikai állományuk homogenizálódik. Egyrészt alacsony lesz a differentiálódás átlagos szintje, másrészt az egyes populáció párok közötti különbségek varianciája is kismértékű lesz. Az esetek többségében azonban ez a jelenség nem jelenti a távolsággal arányos izoláció teljes hiányát, csak azt eredményezi, hogy a regressziós egyenes meredeksége nagyon alacsony (pl. az atlanti lazac (*Salmo salar*) amerikai populációiban (King *et al.*, 2001)). A távolsággal arányos izoláció hiányát akkor is tapasztalhatjuk, ha a populációrendszer még fiatal, és nem volt még elegendő idő a differentiálódás kialakulására (pl. a galléros leguán (*Crotaphytus collaris*) kansasi populációiban (Hutchison & Templeton, 1999)).

I.2.2.4. Lokális adaptáció

A populációk közötti genetikai differentiálódás hátterében legnagyobb részt a genetikai sodródás áll (lásd I.3.2.1. fejezet). Ugyanakkor heterogén környezetben, az eltérő habitatban élő populációkban változatos szelekciós hatások érvényesülhetnek. Az ilyen diverzifikáló szelekciós hatások szintén elősegítik a genetikai differentiálódást, aminek eredményeként lokális adaptáció alakulhat ki az egyes habitatokban. A lokális adaptáció során megváltozott fenotípusos jelleg viszont csak az adott habitatban biztosít maximális rátermettséget. Így a különböző habitatokban kialakult adaptív jellegek egy másik habitatban nem feltétlenül bizonyulnak majd optimálisnak (Kawecki & Ebert, 2004). Ezt a feltételezést számos kísérleti eredmény igazolta, ahol az egyes habitatokból kölcsönösen áttelepítették az egyedeket, és összehasonlították a fitness különböző komponenseinek alakulását az eredeti és az új habitatban (Hereford, 2009 és a benne lévő hivatkozások). Következésképpen a lokális adaptáció hatékonyságát csökkentheti a génáramlás. A génáramlás ugyanis a genetikai különbségek homogenizálását idézi elő a populációk között, és így éppen ellentétes hatású, mint a diverzifikáló szelekció. Így a génáramlás eredményeként az egyes populációkban kialakulhat egy, az adaptáció szempontjából szuboptimális genetikai összetétel (migrációs teher). Egy heterogén környezetben tehát a lokális adaptációnak ára van; a túlzott specializáció költséges lehet egy viszonylag jó diszperziós képességű faj esetében (Lenormand, 2002). Ha a migráció szintje alacsony, akkor a populációk közötti genetikai differentiálódás fennmarad, és így a faj genetikai változatosságának a szintje

magas marad. Ha azonban a génáramlás intenzív, akkor a populációk genetikai állománya homogenizálódik és nő a migrációs teher. Ilyen esetben az is bekövetkezhet, hogy minden populációban fixálódik egy olyan allél, amelynek a különböző habitatok átlagában a legmagasabb a fitnesze, vagyis a kérdéses populációk variabilitása jelentős mértékben csökken („gene swamping”) (Lenormand, 2002).

A lokális adaptáció befolyásolja a populációk genetikai struktúráját. Ha ugyanis a populációk genetikai differenciálódását a genetikai sodródás határozza meg, akkor az esetek többségében kialakul a migráció és a drift egyensúlya. Ennek pedig az lesz a következménye, hogy a populációrendszer a távolsággal arányos izoláció modelljével jellemezhető (lásd előző fejezet). Ha azonban a lokális adaptáció jelentős mértékű, akkor a diverzifikáló szelekció hatása felülmúlhatja a genetikai sodródását, és ilyenkor a populációrendszer genetikai struktúráját nem a földrajzi távolságok, hanem az ökológiai különbségek határozzák meg. A lokális adaptáció vizsgálatának kezdeti szakaszában elsősorban kvantitatív jelleget tanulmányoztak a kutatók. Vagyis, a fenotípus szintjén megjelenő adaptív differenciálódást elemezték az eltérő habitatban élő populációk között: pl. a *Timema cristinae* csikolt és csík nélküli alakja (Nosil, 2007), a háromtűskés pikó bentikus és limnetikus ökotípusa (McPhail, 1984; Reusch, Wegner, & Kalbe, 2001; Deagle *et al.*, 2011), a mexikói lapátlábú béka mindenevő és ragadozó ökotípusai (Martin & Pfennig, 2009), vagy a cianogenezis klinje a fehér herénél (Kooyers & Olsen, 2012) stb. A molekuláris módszerek széleskörű elterjedése azonban egyrészt lehetővé tette a kvantitatív jellegek genetikai hátterének feltárását (pl. a háromtűskés pikó *Eda* lokusza (Colosimo *et al.*, 2005); másrészt más, az adaptációban feltehetően fontos szerepet játszó genetikai lokuszok felderítését: pl. a vaskos parti csiga (*Litorina saxatilis*) (Wilding, Butlin, & Grahame, 2001), vagy a bibircses levélbogár (*Neochlamisus bebbianae*) (Funk, 2010) ökotípusainak genetikai differenciálódása.

Célkitűzések

Munkásságom második felében, a 90-es évek közepétől kezdve, a természetvédelmi szempontból jelentős Lepidoptera fajok genetikai variabilitását kezdtem tanulmányozni. Ezek a kutatások eleinte leíró jellegűek voltak, hiszen az általam vizsgált fajok Kárpát-medencei populációiról még nem állt rendelkezésre genetikai információ. Már a korai eredmények világossá tették, hogy a genetikai variabilitás szerkezetének kialakulása összetett folyamat, és a konzervációgenetikai irodalomban gyakran hivatkozott habitat fragmentáció és a természetes habitatok beszűkülése csak részben járul ehhez hozzá.

Az egyik első felismerésünk az volt, hogy a genetikai változatosság mintázatára erősen hat a fajok életmenete és szaporodási stratégiája. Ezeket a faktorokat én „*intrinsic*” faktoroknak nevezem, melyek gyakran azon keresztül alakítják a populációk genetikai állományát, hogy érzékennyé teszik azokat a sztochasztikus folyamatok hatásaival szemben, és így teret engednek a drift intenzív hatásának. Ezért a jelen disszertációban az egyik célkitűzésem az volt, hogy néhány olyan esettanulmányt mutassak be, melyeknek eredményei egyértelműen alátámasztják azt a hipotézist, hogy a genetikai variabilitás mintázatának alakulásában jelentős szerepet játszanak a fajok biológiai jellemzői (életmenet, szaporodási stratégia stb.).

A fajok speciális szaporodási stratégiája előidézheti a beltenyészet fokozódását is a populációkban. A dolgozat egyik esettanulmányának éppen az volt a célkitűzése, hogy bemutassa az ok-okozati összefüggést a szaporodási stratégia, a sztochasztikus hatások

felelősödése, és az egyedek magas rokonsági foka között egy *Euphydryas maturna* populáció genetikai variabilitásának elemzése révén.

A fajok genetikai struktúrájának kialakításában további jelentős szerepet játszanak ökológiai igényeik. A *Maculinea* fajok esetében például ilyen a lárvális tápnövény és a hangyagazda. A disszertációban szereplő esettanulmányban azt mutatom be, hogy a *Maculinea alcon* (pneumonanthe ökotípus) Kárpát-medencei populációiban tapasztalt differenciálódási mintázatot a hangyagazdához kötődő speciális adaptáció feltételezésével lehetett a legjobban értelmezni.

Mint azt a I.3.1. fejezetben láttuk, a fajok genetikai változatosságának a szerkezetét jelentős mértékig határozzák meg a történeti múlt eseményei, mindenekelőtt a nagy klimatikus változások által befolyásolt área dinamikai folyamatok. Ezeknek az eseményeknek az idősíkjában azonban eltér a jelenben és a közeli múltban ható evolúciós folyamatoktól. Ezért két tanulmányban is, a *Parnassius mnemosyne* és az *Euphydryas aurinia* Kárpát-medencei populációinak tanulmányozása során, azt tűztük ki célul, hogy összehasonlítsuk a két idősíkon zajló folyamat genetikai struktúrára gyakorolt hatásait. Ezt az összehasonlítást az teszi lehetővé, hogy a mtDNS szekvencia vizsgálatának eredményei mindenekelőtt a történeti múlt hatását tükrözik, míg az enzimpolimorfizmus elemzésének eredményeiben ötvöződnék a történeti múlt és a közeli múlt evolúciós folyamatai.

A konzervációgenetikai kutatások eredményeinek egyik közvetlen hasznosulása a gyakorlati természetvédelmi munkában az, hogy alapul szolgálnak a természetvédelmi egységek (ESU és FCU/MU) kijelölésére a veszélyeztetett fajoknál. Számos Lepidoptera faj genetikai variabilitásának a tanulmányozása során születtek olyan eredményeink, amelyek megfelelő alapot nyújtottak ilyen egységek kijelöléséhez. A *Maculinea* fajok esetében ESU-kat, míg az *M. nausithous* populációkban ESU-kat és FCU/MU-kat egyaránt detektáltunk a genetikai variabilitás vizsgálatának eredményei alapján. Egy Európa-szerte veszélyeztetett faj (*E. maturna*) esetében azonban a vizsgálatok közvetlen célja az volt, hogy a populációk genetikai differenciálódásának a mintázata alapján meghatározzuk a faj konzervációs egységeit a Kárpát-medencében.

Anyagok és módszerek

M.1. A vizsgált fajok

M.1.1. Kis apollólepke, *Parnassius mnemosyne* (LINNAEUS, 1758)

A *P. mnemosyne* policentrikus áréájú európai – nyugat-szibériai faj. Európai populációi két fő csoportra tagolódnak (Gratton & Sbordoni, 2005). A nyugati, erősen differenciálódott, adriatomediterrán góci csoport az Appennini-félszigettől a nyugati- és déli-Alpokig és a központi Pireneusokig terjedt el, míg a több alcsoportra tagolódó keleti ág Kis-Ázsiáig és a Tien-Sanig hatol. A *P. mnemosyne* két fő ágának szétválása a korai pleisztocénre tehető, és az Alpok első jelentősebb eljegesedésével hozható kapcsolatba. Ugyanakkor az is valószínű, hogy a legfiatalabb eljegesedéseket mindkét fő ág több másodlagos refúgiumban (szekunder centrumban) vészelte át, mindenekelőtt a dél-európai hegyvidékeken. Ezért kézenfekvő az a feltételezés, hogy a Kárpát-medence is több gócterületből népesülhetett be.

A *P. mnemosyne* a több alnemre tagolódó *Parnassius* genusz (LATREILLE, 1804) azon fajai közé tartozik, amelyek *Corydalis* (Papaveraceae, Fumaroideae) tápnövényeken fejlődnek. Tápnövényeik között egyaránt lehetnek szikla- és görgeteglakó fajok (pl. a dél-

balkáni és a kis-ázsiai – transzkászpiai populációk), valamint az üde lomberdők geophyton-aljnövényzetének fajai (pl. *Corydalis cava*, *C. solida*). Ezek a lepkék petéiket fenológiai okok miatt nem a tápnövényre, hanem csak annak közelében rakják le egyesével (Weidemann, 1985; Konvicka *et al.*, 2001). Az állat testtömegéhez képest jelentős méretű pete sok szikanyagot tartalmaz, ez biztosítja, hogy a fiatal hernyó a peteburokban átteleljen. Az imágók elsősorban bíbor- és lila színű ajakos virágok (Lamiaceae, pl. *Ajuga*, *Lamium*, *Thymus*-fajok) nektárját fogyasztják. A hímek a napos délelőtti órákban jellegzetes „járőröző” repüléssel keresik az alacsony aljnövényzetben rejtőző, párzás előtt alig repülő nőstényeket.

A *P. mnemosyne* a Kárpát-medencében főleg domb- és hegyvidéki faj, viszonylag erős populációkkal mind a Dunántúli-, mind pedig az Északi-középhegységben. Jelentősebb síkvidéki elterjedése van a Dráva-síkon és a Körösök vidékén, kisebb foltokban a Bükk-hg. déli lábánál (Kerecsend, Sajólád), a Bereg-Szatmári-síkon (Magosliget, Szatmárnémeti: Sárerdő) és a Nyírség határon túli részén (Csanálosi-erdő). A kis apollólepké Európa legtöbb országában visszaszorulóban van, populációinak a száma és a mérete is csökkenő tendenciát mutat, ráadásul ezek gyakran fragmentáltak (van Swaay, Warren, & Löis, 2006; van Swaay *et al.*, 2010). Így a legtöbb országban védett faj, és szerepel az IUCN vörös listáján, valamint az EU Élőhelyvédelmi Irányelvének mellékleteiben (van Swaay *et al.*, 2010).

M.1.2. Euphydryas genusz (SCUDDER, 1872)

Az *Euphydryas* genuszt három alnem alkotja (Zimmermann, Wahlberg, & Descimon, 2000). A szűkebb értelemben vett *Euphydryas* alnem kizárólag nearktikus fajokból áll (pl. *E. editha*, *E. chalcidona*). A *Hypodryas* alnem fajai az észak-amerikai *E. gilettii* kivételével palearktikusak. Ebbe az alnembe tartozik az általunk is tanulmányozott *E. maturna*. A harmadik alnem az *Eurodryas*, melynek mind a négy faja – többek között az *E. aurinia* is – palearktikus.

Az *Euphydryas* genusz tagjai tipikusan r-stratégista fajok. A nőstények néhány csomóba rakják le a mintegy 200-300 kisméretű petéjüket a tápnövény levelének fonákjára. A kikelő hernyók fészket készítenek, és ebben a fészkekben közösen táplálkoznak. A közép-európai fajok a nyár derekán felfüggesztik táplálkozásukat és diapauzába kezdenek, melynek során az avarszintben közös szövedékben átnyaralnak és áttelelnek. A következő év tavaszán az áttelelt hernyók szétszélednek a fészkekből, és a továbbiakban egyedül táplálkoznak, majd bebábozódnak. Az imágók a tavasz végén, nyár elején kelnek ki a bábokból.

M.1.2.1. Díszes tarkalepke, *Euphydryas (Hypodryas) maturna* (LINNAEUS, 1758)

Az *E. maturna* nagy elterjedési területű, policentrikus európai – nyugat-szibériai faj, amelynek áréája Franciaország keleti részétől (Elszász) egészen Transzbajkáliáig húzódik. Az európai populációk jellegzetes kettős tagolódást mutatnak: az északkeleti populációcsoport (*E. maturna staudingeri* Wnukowsky 1929) nőstényei fás vagy cserjés (*Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Lonicera* sp.) tápnövényre rakják petéiket, bár gyakran használnak lágyszárú növényeket is (*Melampyrum* sp., *Plantago* sp., *Viola campestris*). Az északi alfaj hernyója rendszerint kétéves fejlődésmenetű (Wahlberg, 1998, 2000). Ezzel szemben a dél- és közép-európai populációk (*E. m. maturna*) kezdeti tápnövénye mindig fás szárú növény (*Fraxinus* spp., *Ligustrum vulgare*, *Lonicera* spp.), és a hernyó csak áttelelés után vált át lágyszárú tápnövényre (Magyarországon általában *Veronica* spp.) (Weidemann, 1985; Varga, 1995).

A Kárpát-medencében a nőstények a kőris esetében főleg a fiatal fák 2-3 m magasban levő, gyakran lehajló szélső ágaira, a fagyal és a lonc esetében pedig az erdőszegélyen levő cserjék 0,5-1 m magasságban levő hajtásaira rakják petéiket. Az átnyaralás és az áttelelés az erdei avarban a közös fészekben történik, amelynek kiszáradása vagy árvízi elöntése végzetes lehet a hernyók számára. A ragadozók és egyes parazitoidok szintén okozhatják a hernyófészkek jelentős pusztulását (Weidemann, 1985; Vrabec & Jindra, 1998; Eliasson & Shaw, 2003). Az imágók a napos délelőtti órákban az erdőszegélyek cserjés- és lágyszárúmagaskórós növényzetén tartózkodnak, fő nektárforrásaik egyes cserjék (*Cornus sanguinea*, *Acer tataricum*, *Ligustrum vulgare*) vagy magas termetű ernyősvirágzatúak (pl. *Anthriscus sylvester*, *Peucedanum palustre*). A hímek általában kiemelkedő pontokon posztolnak, területörző viselkedésűek. A nőstények erősen területtartók. A lepkék a kora délutáni óráktól kezdve egyre magasabbra húzódnak a fák lombkoronájában, borult időben is többnyire itt rejtőznek. Az *E. matura* tehát strukturált habitatot igényel, ritkás tisztásokkal tarkított erdőket és erdőszegélyeket.

Az *E. matura* Belgiumban és Luxemburgban kipusztult, állományai pedig jelentősen lecsökkentek Franciaországban, Németországban, Ausztriában, Csehországban és a Balkánon (Haslett, 1996; van Swaay & Warren, 1999). Visszaszorulásának fő oka az erdei habitatok általános degradációja, ami az erdőművelés jelentős átalakulásának a következménye (van Swaay *et al.*, 2006). A díszes tarkalepke tehát Európa szerte visszaszorulóban lévő, veszélyeztetett faj, és így szerepel az EU Élőhelyvédelmi Irányelvének mellékleteiben (van Swaay *et al.*, 2010).

M.1.2.2. Lápi tarkalepke, *Euphydryas (Eurodryas) aurinia* (ROTTEMBURG, 1775)

Az *E. aurinia* még az *E. maturnánál* is nagyobb elterjedésű, policentrikus eurosibériai faj, bonyolult taxonómiai tagolódással. Áréája szinte egész Európát magába foglalja, az Appenini- és a Balkán-félsziget déli részeinek kivételével. Jellemző, hogy a Brit-szigeteken is széles körben elterjedt, az Ibériai-félszigeten pedig az *E. aurinia beckeri* (HERRICH-SCHÄFFER, 1851) a legelterjedtebb lepkefajok egyike. Keleten – a Nyugat-Szibériai-síkon jelentős elterjedési hézaggal – egészen Mandzsúriáig, észak-Kínáig és Koreáig hatol. Alfajainak megítélésében máig bizonytalanság uralkodik. Az *E. aurinia* közép-európai előfordulásában egy jelentős hiátus figyelhető meg (Kudrna, 2002). Az elterjedési terület nyugati felének legkeletibb populációi a Dunántúl középső területein találhatók. Ettől keletre legközelebb az Erdélyi-medencében jelenik meg.

Az *E. aurinia* nőstények petéiket a tápnövény (nálunk főleg *Succisa pratensis*, illetve szárazabb gyepekben *Scabiosa* sp.) levélfonákaira rakják le nagy csomókban. Az áttelelt hernyók tápnövény- és élőhelyváltás nélkül, márciusban kezdenek újra táplálkozni, és az imágók, évjárattól és élőhelytől függően, május elején-közepén, magasabb hegyvidékeken inkább csak júniusban jelennek meg.

Az *E. aurinia* populációk élőhelyeiben jelentős regionális és helyi eltérések mutatkoznak. Nyugat-és Közép-Európában már régóta ismert, hogy a nedves rétek mellett a száraz és félszáraz gyepekben is megtelepszik, bár újabban mindkét élőhely típusban erősen csökkennek állományai (Ebert & Rennwald, 1991). Az alpi populációktól eltekintve, több európai államban, így Csehországban is kritikusan veszélyeztetetté vált (Hula *et al.*, 2004), ezért az európai vörös listákon mindenütt előkelő helyen szerepel (van Swaay *et al.*, 2010). Mivel az *E. aurinia* – a nedvességviszonyoktól szinte függetlenül – a tápanyagszegény gyepek jelzőfaja (Ebert & Rennwald, 1991), ezért populációinak csökkenéséért feltehetően

az antropogén eredetű tápanyagdúsulás (melioráció, légköri N-ülepedés, holt szerves anyag felhalmozódás) a felelős.

M.1.3. Hegyi szerecsenboglárka, *Aricia artaxerxes* (FABRICIUS, 1793)

Az *Aricia artaxerxes* nagy áréájú eurosibériai (boreo-montán) faj. Fő elterjedése Észak- és Kelet-Európától Közép-Ázsiáig és Kelet-Szibériáig húzódik (Obraztsov, 1935, 1936; Lukhtanov & Lukhtanov, 1994; Tshikolovets, 2003). Elterjedésének északnyugati periferiáin és Dél-Európa hegyvidéki területein számos alfajra tagolódik (Beuret, 1954; Kaaber & Hoegh-Guldberg, 1961; Hoegh-Guldberg, 1966, 1968; Hoegh-Guldberg & Jarvis, 1969; Kames, 1969). Ezeknek az alfajoknak egyike a bükki szerecsenboglárka (*A. artaxerxes issekutzi* BALOGH, 1956), ami a Kárpátok és a Dinári-hegységrendszer meszes alapkőzetű részein, illetve Magyarország területén a Bükk-hegységben és a Gömör-Tornai-karszton fordul elő (Varga, 1961, 1968).

A hazai populációk terepvizsgálataiból ismert tápnövényei: *Helianthemum ovatum* és *Geranium sanguineum*. Az *A. artaxerxes issekutzi* fontos élőhelyei a fajgazdag sovány hegyi rétek és száraz-félszáraz, meszes alapkőzetű gyepek. Fő nektárforrásai az alacsonyabb növésű Fabaceae-k (*Lotus*, *Medicago*, *Coronilla*), főleg a sárga virágszínű fajok. A hímek rendszerint csoportosan táplálkoznak a nedves talajon, gyakran más *Polyommatus* és *Plebejus* fajokkal együtt. A nőstények egyenként rakják petéiket a tápnövény levélfonákára vagy a kinyílatlan virág csészeleveleire (Varga, 1968; Malicky, 1969). A peték mennyisége nőstényenként 100 körül vagy fölötte van, a nőstény azonban 3-5 peténél többet egy növényre nem rak. Így a peték elég egyenletesen oszlanak meg az élőhelyen. A fiatal lárvák eleinte a tápnövény levelén folytatnak hámozó rágást, majd áttelelnek. A fejlettebb lárvákat hangyák (*Lasius*) gondozzák, azonban az *A. artaxerxes* csupán fakultatív mirmekofil faj (Malicky, 1969). Az *A. artaxerxes issekutzi* – szemben a rokon *A. agestis*-szel – monovoltin, az imágók rajzási ideje az időjárástól függően május végétől június elejéig tart.

M.1.4. *Maculinea* (Phengaris) *genusz* (VAN EECKE, 1915)

A *Maculinea* *genusz* érvényes neve a molekuláris markerek alkalmazása óta vitatott kérdéssé vált. Több, DNS szekvencia analízisen alapuló tanulmányban ugyanis a *Phengaris* és a *Maculinea* *genuszok* monofilétikus egységet alkotnak (Pech *et al.*, 2004; Als *et al.*, 2004; Fric *et al.*, 2007). Ennek értelmében a *genusz* érvényes neve a *Phengaris*. Ugyanakkor az újabb genetikai vizsgálatok eredménye azt támasztja alá, hogy a *Phengaris* és a *Maculinea* testvér *genuszok* (Ugelvig *et al.*, 2011). A *Maculinea* név használatát egyéb megfontolások is indokolják. A habitat fragmentáció és a földhasználat jelentős megváltozása azt eredményezte, hogy a *genusz* fajai Európa szerte visszaszorulóban vannak, populációik mérete és száma is jelentősen csökken, egyes európai országokból ki is pusztultak, illetve csak visszatelepített populációik fordulnak elő (Hollandia, Anglia). Ennek következtében a *genusz* minden faja védett, illetve veszélyeztetett státuszba került. Az IUCN vörös listán és az EU Élőhelyvédelmi Irányelvének mellékleteiben (van Swaay *et al.*, 2010) viszont ezek a fajok kizárólag a *Maculinea* *genusz* név alatt szerepelnek, és ilyen néven vannak jelen a magyar Vörös könyvben is (Rakonczay, 1990).

A *Maculinea* *genusz* tagjai a boglárkalepkék (*Lycanidae*) legspeciálisabb életmenetű fajai. Lárvális fejlődésüket két limitáló tényező határozza meg: a specifikus tápnövény és a hangyagazda. A nőstények a tápnövény fertilis hajtására rakják petéiket, és a kikelő hernyók eleinte a tápnövény fejlődő magjaival táplálkoznak, bár ezalatt végső tömegüknek mindössze 10-15%-át érik el (Elmes, Wardlaw, & Thomas, 1991; Elmes, Thomas, &

Wardlaw, 1991; Thomas & Wardlaw, 1992). Majd 2-3 hét múlva az éretlen termésekből kipotyogó hernyók várják, hogy különböző *Myrmica* fajok felfedezzék, és adoptálják őket (Thomas, 1984; Thomas *et al.*, 1989). Sikeres adoptálás esetén a hernyók a specifikus hangyagazdák fészkeibe kerülnek, és ott fejlődnek tovább, valamint ott is bábozódnak be. A *Maculinea* fajok tehát obligát mirmekofilek. A hangyafészkekbe került hernyók kétféle stratégiát folytathatnak: a predátorok hangya petéikkel, illetve lárvákkal táplálkoznak (Elmes & Thomas, 1987; Thomas & Wardlaw, 1992); a kakukk-stratégiát alkalmazó hernyók azonban elérik, hogy a dolgozók etessék és gondozzák őket (Elmes, Wardlaw, & Thomas, 1991; Elmes *et al.*, 1991; Elmes & Thomas, 1992; Hochberg *et al.*, 1994; Barbero *et al.*, 2009). Mind az adoptáláshoz, mind pedig a hangyafészkekben való fennmaradáshoz elengedhetetlen a hernyók mimikrije. Ez elsődlegesen kémiai mimikri, vagyis a hernyók olyan felszíni szénhidrogén koktélt termelnek, melynek az összetétele megegyezik a hangyagazda lárváinak felszíni szénhidrogénjeivel (Schönrogge *et al.*, 2004; Schlick-Steiner *et al.*, 2004; Nash *et al.*, 2008).

M.1.4.1. Szürkés hangyaboglárka, *Maculinea alcon* ([DENIS & SCHIFFERMÜLLER], 1775)

A *M. alcon*-t és a *M. rebeli*-t (HIRSCHKE, 1904) tradicionálisan önálló fajként kezelték a taxonómusok, az ökológusok, valamint a viselkedésbiológusok. A *M. rebeli* elnevezést azonban tévesen használták, mert Hirschke egy magashegységi változatot írt le *M. alcon* var. *rebeli* név alatt. A *M. rebeli* elnevezést tulajdonképpen részletes taxonómiai vizsgálatok nélkül kezdték használni azokra a populációkra, melyeknek fenotípusos megjelenése hasonló volt a *M. alcon* var. *rebeli* alakra. A fajok akkori elkülönítése elsősorban ökológiai alapokon nyugodott, ami magába foglalta az eltérő habitátokat, a specifikus tápnövényeket és a hangyagazdákat (Elmes & Thomas, 1987; Thomas *et al.*, 1989; Elmes *et al.*, 1991c, 1994). A *M. alcon* nedves réteken fordul elő, tápnövénye elsősorban a kornistárnics (*Gentiana pneumonanthe*) és a legjellemzőbb hangyagazda fajai a *Myrmica scabrinodis* (Thomas *et al.*, 1989) és a *My. ruginodis* (Gadeberg & Boomsma, 1997). A Kárpát-medencében azonban a szürkés hangyaboglárka két további hangyagazda fajt is használ, a *My. slovacca*-t és a *My. vandeli*-t (Hottinger, Schlick-Steiner, & Steiner, 2003; Sielezniew & Stankiewicz, 2004; Vályi Nagy & Csősz, 2007; Tartally *et al.*, 2008; Witek *et al.*, 2010). Ugyanakkor a karszti hangyaboglárka, amit az 1980-90-es években megjelent cikkekben *M. rebeli*-ként emlegettek, miközben a korrekt elnevezése *M. alcon* f. *xerofila* (= *rebeli* Auct. nec Hirschke) lenne, a viszonylag alacsonyabban fekvő fűszáraz gyepekben él. Jellemző tápnövénye a Szent László-tárnics (*Gentiana cruciata*) (Thomas & Elmes, 2001; Árnas *et al.*, 2006). Nyugat-Európában a *M. alcon* f. *xerofila* elsődleges hangyagazdája a *My. schenki*. Közép-Európa keleti területein azonban további hangyagazdái is ismertek főleg a *My. sabuleti*, ritkábban pedig a *My. scabrinodis*, a *My. sulcinodis* és a *My. speciosus* (Steiner *et al.*, 2003; Tartally & Csősz, 2004; Schlick-Steiner *et al.*, 2004).

A két faj taxonómiai státusza azonban jelentősen változott a molekuláris markerek elterjedt használata óta. Als *et al.* (2004) a mtDNS COI és COII, valamint egy nukleáris gén (EF1- α) szekvencia analízise során megállapították, hogy a *M. alcon* és a *M. alcon* f. *xerofila* egyedek szekvenciái közös ágba kalsztereződtek a törzsfán, ami egyértelműen mutatta, hogy a két taxon között nem alakult ki faji szintű genetikai differenciálódás. Hasonló eredményre jutott Pech *et al.* (2004), akik 91 morfológiai és ökológiai jelleget vizsgálva megállapították, hogy az európai *M. alcon* és *M. alcon* f. *xerofila* közelebb áll egymáshoz, mint az *M. alcon* európai és ázsiai taxonjai. Bereczki *et al.* (2005) a közép-

európai *M.alcon* és *M.alcon* f. *xerofila* populációk enzimpolimorfizmusát tanulmányozva szintén arra az eredményre jutott, hogy a genetikai differenciálódás mértéke alapján a két taxon nem különül el faji szinten. Mindezen eredmények alapján a két taxon a *M.alcon* két ökotípusának tekinthető: a korábban *M.alcon*-ként ismert faj a pneumonante ökotípus, míg a *M.rebeli*-ként azonosított faj (valójában a *M.alcon* f. *xerofila*) a cruciata ökotípus. Ugyanakkor a *M.rebeli* (HIRSCHKE, 1904) létezése az utóbbi időben igazolódott (Tartally *et al.*, 2016). A faj magas hegységekben fordul elő, és mind genetikai, mind pedig ökológiai sajátosságait illetően eltér a *M.alcon* mindkét ökotípusától.

M.1.4.2. Sötét hangyaboglárka, *Maculinea nausithous* (BERGSTRÄSSER, 1779)

A *M.nausithous* egy euroszibériai faj, melynek áréája Nyugat-Európától egészen Dél-Szibériáig, illetve Mongóliáig terjed, bár ismert populációi meglehetősen szórványosak (Lukhtanov & Lukhtanov, 1994; Tuzov, 1997; Wynhoff, 1998; Munguira & Martin, 1999; Rákosy *et al.*, 2010). A faj elterjedési területében egy határozott szakadás figyelhető meg a Kárpát-medence középső területén. Populációi viszonylag gyakoriak a Dunántúl északi és nyugati területein, de teljesen hiányoznak az Alföldről és egészen az utóbbi időkig úgy gondolták, hogy Erdélyből is. Rákosy *et al.* (2010) azonban találtak Erdélyben néhány elszigetelt populációt Kolozsvár közelében.

A *M.nausithous* nedves, üde réteken él, tápnövénye a vérfű (*Sanguisorba officinalis*), melynek a nagyobb, csúcsi virágait preferálja peterakáskor a nőstény (Thomas, 1984; Thomas & Wardlaw, 1992). A sötét hangyaboglárka elsődleges hangyagazdája a *My.rubra*, melynek fészkeiben predátor életmódot folytatnak a hernyók (Thomas, 1984; Thomas *et al.*, 1989; Tartally *et al.*, 2008).

M.1.4.3. Vérfű hangyaboglárka, *Maculinea teleius* (BERGSTRÄSSER, 1779)

A *M.teleius* elterjedési területe Euráziában egy kelet-nyugat irányú sáv, amely az Alpok nyugati szélétől Németország középső és déli területein, Svájcban, Csehországon, Szlovákián, Lengyelország déli részén, Magyarországon, Ukrajnán és Oroszország középső területén keresztül egészen Japánig tart. Legnyugatibb, elszigetelt populációi Franciaországban, az Atlanti óceán mellett található. Európában egy alfaja fordul elő, de Ázsiából négy további írtak le (Sibatani, Saigusa, & Hirowatari, 1994).

A *M.teleius* – a *M.nausithous*-hoz hasonlóan – az üde, nedves rétek lakója. Iniciális tápnövénye is megegyezik a *M.nausithous*-éval, szintén a vérfüvet (*Sanguisorba officinalis*) használja. A két faj közötti különbség a virágok helyzetének preferenciájában van: a *M.teleius* nőstények elsősorban a kisebb, oldalsó virágokba petéznek (Thomas, 1984). Közép-Európában a *M.teleius* elsődleges hangyagazdája a *My.scabrinodis* és a *My.rubra*, bár alkalmanként parazitál más *Myrmica* fajokat is, például a *My.slovaca*-t, a *My.specioides*-t, a *My.gallienii*-t, a *My.ruginodis*-t, a *My.rugulosa*-t és a *My.vandeli*-t (Stankiewicz & Sielezniew, 2002; Tartally & Varga, 2008; Witek *et al.*, 2010). A *M.teleius* hernyók predátor stratégiát folytatnak a hangyafészkekben (Thomas & Wardlaw, 1992; Witek *et al.*, 2010).

M.2. Mintavétel

Az enzimpolimorfizmus vizsgálata destruktív mintavételezést igényel. Rovarok esetében ez gyakorlatilag az egész állat elpusztítását jelenti. Természetvédelmi szempontból fontos fajoknál ez nagyon komoly problémát jelenthet. A vizsgált lepke fajok azonban mind egy generációsak, vagyis az imágók tavasszal, illetve nyáron kelnek ki a bábokból, és a

szaporodást követően elpusztulnak. Ezért vizsgálataink kardinális pontja volt a minták gyűjtésének időzítése. A mintavételi időpontokat úgy ütemeztük, hogy a kérdéses faj repülési periódusának a végére essenek, amikor a nőstények túlnyomó többsége már lerakta petéit. Így a mintavételezés lényegében nem károsította a populációt. További óvintézkedést jelentett az is, hogy minden faj esetében elsősorban hím egyedeket gyűjtöttünk. A mintaszámok rendkívül változatosak voltak, annak megfelelően alakultak, hogy milyen volt az aktuális populációk egyedszáma. A kisebb populációk esetében a mintaszám 10-15 között változott, míg az erősebb, nagyobb populációk esetében akár 40-50 egyedet is gyűjtöttünk. A begyűjtött egyedeket folyékony nitrogénbe tettük, majd a laboratóriumban – 70°C-on tároltuk a vizsgálatok megkezdéséig.

Az egyes tanulmányokhoz felhasznált minták adatait a megfelelő fejezetben tárgyalom.

M.3. Az enzimpolimorfizmus vizsgálata

Az enzimpolimorfizmus vizsgálatát vertikális poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. Első lépésben homogenizáltuk a mintákat: az egyedek torát 300 µl, míg a potrohát 150 µl pufferben. A homogenizátumokat lecentrifugáltuk (10000 rpm, 10 perc) és a felülúszóból enzimtől függően 5-10-15 µl-t vittünk fel a gélre. Elektroforézis után a különböző enzimeket hisztokémiai eljárással tettük láthatóvá. Az elektroforézis puffereket, a futási paramétereket, és a gélek festéséhez használt oldatokat az M.1. és M.2. függelékek tartalmazzák. Míg a festési eljárások alapvetően hasonlóak voltak a vizsgált fajoknál (esetleg a kofaktor, illetve a festék koncentrációkban voltak kisebb eltérések), addig néhány enzim esetében különböző elektroforetikus körülmények biztosították a változatok legoptimálisabb elválását a különböző fajokban.

A 7 fajban összesen 19 enzimet vizsgáltunk, melyek közül a torból mutattuk ki a következő 12-t: glutamát-oxálacetát-transzamináz (*Got*), glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (*G6pdh*), α-glicerofoszfát-dehidrogenáz (*Gpdh*), hexokináz (*Hk*), izocitrát-dehidrogenáz (*Idh*), laktát-dehidrogenáz (*Ldh*), malát-dehidrogenáz (*Mdh*), malik enzim (*Me*), 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz (*6Pgdh*), foszfo-glüko-izomeráz (*Pgi*), foszfo-glüko-mutáz (*Pgm*) és szuperoxid-dizmutáz (*Sod*). További 7 enzimet pedig a potroh homogenizátumában vizsgáltunk: akonitáz (*Acon*), savas foszfatáz (*Acph*), aldehyd-oxidáz (*Aox*), alkohol-dehidrogenáz (*Adh*), észteráz (*Est*), glutamát-dehidrogenáz (*Gdh*) és leucin-aminopeptidáz (*Lap*). Ennek a 19 enzimnek a kimutatása összességében 25 lokusz vizsgálatát tette lehetővé. A különböző fajokban az enzim lokuszok változatos kombinációit lehetett elemezni (M.3. függelék): a *P. mnemosyne*-ben 14, az *E. maturna*-ban és az *E. aurinia*-ban 18, az *A. artaxerxes*-ben 19, a *M.alcon* pneumonanthe és cruciata ökotípusában, valamint a *M. teleius*-ban 16, míg a *M. nausithous*-ban 17 lokusz mintázata mutatkozott konzekvensnek valamennyi mintában.

A enzimmintázatok alapján azonosítottuk az egyedek genotípusát. Ezeket az adatokat használtuk fel valamennyi későbbi vizsgálat során.

M.4. DNS szekvencia vizsgálatok

Két faj esetében (*Parnassius mnemosyne* és *Euphydryas aurinia*) meghatároztuk a mtDNS citokróm oxidáz I alegységének szekvenciáját (COI). A DNS kivonás az egyedek fejéből (*P. mnemosyne*), illetve a potroh utolsó néhány szegmentjéből (*E. aurinia*) történt a Bereczki *et al.* (2014) által leírt protokoll alapján. A COI szekvencia amplifikálásához specifikus primereket alkalmaztunk, ami az 5' végen tartalmazta az univerzális szekvenáló primert, a

T7 promótert. (Wahlberg & Wheat, 2008). A PCR termékek szekvenálását a MacroGen Inc. (Szöul, Dél-Korea) végezte. Az egyedek DNS szekvenciáit kézzel szerkesztettük a CHROMAS LITE v. 2.01 program segítségével. Az általunk meghatározott szekvenciák mellett mindkét faj esetében további szekvenciákat töltöttünk le az NCBI DNS adatbázisból. A *P. mnemosyne* szekvenciákat a Gratton *et al.* (2008) által publikált cikk adataiból választottuk ki, míg az *E. aurinia* esetében a Junker *et al.* (2015) cikkében szereplő szekvenciákból szelektáltunk.

Az *E. aurinia* populációk mintáiban megállapítottuk a populációk *Wolbachia*-val való fertőzöttségének a mértékét is. A tesztelésre a *Wolbachia* erősen konzervatív 16S rRNS génjét használtuk a Werren & Windsor (2000) által leírt specifikus primerek segítségével. A PCR reakciót Rácz *et al.* (2015) nyomán végeztük. Az amplifikáció sikerét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük. A *Wolbachia* törzs azonosításához a felszíni fehérje génjét (WSP) használtuk a Baldo *et al.* (2006) által leírt protokoll alapján.

M.5. Szárny morfometriai vizsgálatok

Két faj (*Euphydryas aurinia* és *Maculinea nausithous*) mintáiban a morfológiai variabilitás mértékét és szerkezetét is tanulmányoztuk az egyedek szárnyain mért jellegek alapján. A vizsgálatok első lépésében az egyedek nemét határoztuk meg, mert a morfometriai mérésekhez csak a hímeket használtuk. Majd a szárnyakat a rovar testfelépítésének megfelelően átlátszó fóliadarabon fixáltuk. A következő lépésben a szárnyak digitalizálása történt Sony DSC-H2 digitális fényképezőgép segítségével. Végül minden egyeden lemértük a kiválasztott jellegeket. Ezeket a jellegeket 3 csoportba soroltuk: (a) a méret típusú jellegek (teljes hossz, alapi hossz, oldalsó hossz) a szárnyak nagyságáról adnak információt; (b) a szögek a szárny alakját jellemzik (tövi és csúcsi szögek); (c) a szárny mintázatát illetve ereit leíró jellegek a szárnyon lévő foltok illetve erek méretéről és egymáshoz viszonyított helyzetéről adnak információt. A mérések megbízhatóságát úgy biztosítottuk, hogy a jellegeket fix pontok segítségével jelöltünk ki a szárnyak erezte mentén. A mérések mindkét faj esetben az IMAGEJ 1.36b számítógépes program (Kizic & Borovac, 2001) segítségével történtek.

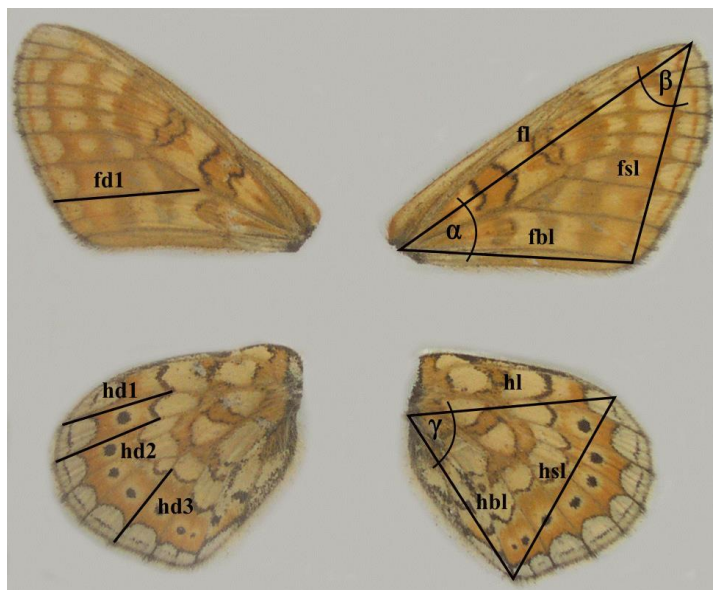
M.5.1. *Euphydryas aurinia*

A morfometriai méréseket 5 dunántúli, a szlovén és az erdélyi mintában végeztük el. Összesen 13 jelleget mértünk az elülső és a hátulsó szárnyon, melyek közül 6 jelleg a szárnyak méretét mutatta, további 3 jelleg a szárnyak alakját tükrözte, míg a maradék 4 jelleg a szárny ereire és mintázatára volt jellemző (M.1. ábra). A méréseket két lépésben végeztük:

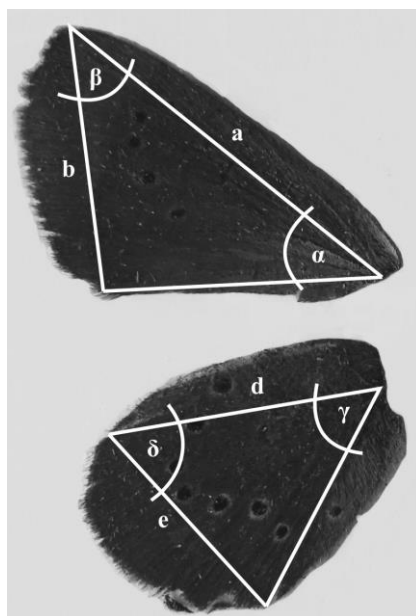
1. A morfológiai változatosság vizsgálata során az összes egyed minden jellegét a jobb szárnyon mértük le.
2. Az aszimmetria viszonyok tanulmányozásánál csak 4 dunántúli és a szlovén minta egyedeit használtuk fel. Ebben a lépésben már csak 6 jelleget mértünk (méretek: fl, fbl, hl és hbl, valamint szögek: α és γ), viszont a 6 mérést mindkét szárnyon, 3 ismétlésben végeztük el.

M.5.2. *Maculinea nausithous*

A *M. nausithous* morfometriai vizsgálatában Erdélyből 2 (Szénafüvek /Fanatele/ és Válaszút /Rascruci/), az Őrségből 2 (Kétvölgy és Magyarszombatfa) és Bukovinából egy (Radauti)



M.1. ábra: Az *E. aurinia* szárnyán mért jellegek. Az elülső szárny méretét meghatározó jellegek: teljes hossz (fl), oldalhossz (fsl), alapi hossz (fbl); a hátulsó szárny méretét meghatározó jellegek: teljes hossz (hl), oldalhossz (hsl), alapi hossz (hbl). Az elülső szárny szögei: tövi szög (α), csúcsi szög (β); a hátulsó szárny szöge: tövi szög (γ). Az elülső szárny erezetén mért jellek: kubitális ér (fd1); a hátulsó szárnyon mért jellegek: a gyöngyfolt-sor távolsága a radiális ér mentén (hd1); a gyöngyfolt-sor távolsága a mediális ér mentén (hd2); a gyöngyfolt-sor távolsága a kubitális ér mentén (hd3).



M.2. ábra: A *M. nausithous* szárnyán vizsgált jellegek. Az elülső szárny méretét meghatározó jellegek: teljes hossz (a), oldalhossz (b); a hátulsó szárny méretét meghatározó jellegek: teljes hossz (d), oldalhossz (e). Az elülső szárny szögei: tövi szög (α), csúcsi szög (β); a hátulsó szárny szöge: tövi szög (γ) csúcsi szög (δ).

populáció egyedeit használtuk fel. A bal felső és alsó szárnyon összesen 8 jelleget mértünk le egyedenként, melyek közül 4 a szárnyak méretét mutatta, további 4 jelleg pedig a szárnyak alakját tükrözte (M.2. ábra).

M.6. A genetikai adatok elemzése során alkalmazott statisztikai módszerek

Az elsődleges genetikai adatok az egyedek sok lokuszos genotípusai voltak, melyekből minden faj vizsgálata során genotípus és allélgyakoriságokat számoltunk a GENALEX6 program (Peakall & Smouse, 2006) segítségével.

M.6.1. A genetikai variabilitás mérőszámai

Az enzimpolimorfizmus szintjét 3 klasszikus mérőszámmal jellemeztük: az átlagos allélszámmal (n_A), a heterozigóták átlagos gyakoriságával (H_o) és a polimorf lokuszok arányával (P). Ez utóbbi mérőszámot a 95%-os kritérium alapján állapítottuk meg. Mivel az allélszám (n_A) az esetek többségében korrelációban volt a minta méretével, ezért a különböző populációk és fajok összehasonlíthatósága érdekében korrigált mutatót használtunk. Meghatároztuk az allélgazdagságot (A_r) a Hurlbert-féle rarefakciós módszer (Hurlbert, 1971) segítségével, ahol az allélszám értékét a legkisebb mintával egyenlő méretű „részmintában” várható allélszámmal jellemeztük. Az allélgazdagság értékeit az FSTAT ver. 1.2. (Goudet, 1995) program segítségével állapítottuk meg.

A továbbiakban a klasszikus és korrigált mérőszámok mellett egy további, általam kidolgozott paraméterrel jellemeztük a vizsgált populációk genetikai változatosságát. Az allélokat két kategóriába osztottuk gyakoriságuk alapján: fixálódott ($p=1$) és nem fixálódott allélok ($p<1$). Ezután az összes lokusz figyelembevételével meghatároztuk a fixálódott allélok arányát (Fix%) az egyes populációkban, ami fordított arányban állt a kérdéses populáció variabilitásával.

A genetikai variabilitás klasszikus és új mérőszámait ANOVA segítségével hasonlítottuk össze a fajok, vagy a földrajzi régiók között. Az analíziseket a GLIM 4 programmal (Francis, Green, & Payne, 1994) végeztük.

M.6.2. A genetikai differenciálódás mérőszámai

Egy populációrendszer totális genetikai variabilitásának részét képezik a populációk között megjelenő genetikai különbségek is, más szóval a genetikai differenciálódás. A populációk közötti differenciálódás mérésére számos módszert lehet alkalmazni.

M.6.2.1. Cavalli-Sforza és Edwards féle húrtávolságok. Dendrogram szerkesztés a távolságmátrix alapján

Az allélgyakoriságok alapján különböző geometriai és genetikai távolságokat lehet számolni az egyes populáció párok között. Az általunk alkalmazott Cavalli-Sforza és Edwards-féle húrtávolság (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) a geometriai távolságok egyik típusa, ahol a koordinátákat az allélgyakoriságok négyzetgyökei képezik. Így a populációk egy gömbfelületen találhatók, és a megfelelő algoritmus segítségével meghatározható az őket összekötő húr távolsága. A Cavalli-Sforza és Edwards-féle húrtávolságok kiszámításához a PAST ver.1.56 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001) programot használtuk.

Egy populációrendszer adatainak elemzése során, minden lehetséges populáció párt felállítva, a genetikai távolságok mátrixát kapjuk. A távolságmátrix alapján hierarchikus

klaszteranalízist (Sneath & Sokal, 1973) végeztünk, és a PAST ver.1.56 (Hammer *et al.*, 2001) program segítségével UPGMA dendrogramot szerkesztettünk.

M.6.2.2. Wright-féle F-statisztika

Wright három fixációs indexet dolgozott ki egy populáció rendszer genetikai variációjának a jellemzésére. Az F_{IT} a totális variációt, az F_{IS} a populációkon belüli, míg az F_{ST} a populációk közötti variancia komponenst jellemzi (Wright, 1978). Az F_{ST} tehát alkalmas a populációk közötti genetikai differenciálódás jellemzésére. Később Weir és Cockerham szintén definiált három paramétert (F , f és Θ) a populációrendszer genetikai variációjának jellemzésére, melyek szoros korrelációban állnak a Wright-féle indexekkel (Weir, 1996). Az adatok elemzése során az egyes fajokra, vagy földrajzi régiókra vonatkozó F_{ST} értékeket az FSTAT ver. 1.2. (Goudet, 1995) program segítségével állapítottuk meg. Több tanulmányban is vizsgáltuk a földrajzi (vagy klaszter) régiók közötti differenciálódás mértékét. Ezekben az analízisekben az egyes régiók populációinak adatait összeomlesztettük, majd megállapítottuk az így létrehozott 'óriási populációk' közötti differenciálódás mértékét.

M.6.2.3. A migránsok effektív száma

A génáramlás intenzitását a migránsok effektív számával jellemezhetjük, ami tulajdonképpen a populációba érkező egyedek aktuális, generációnkénti száma (N_m). Az N_m értékét a fixációs indexből is kiszámíthatjuk a Wright által levezett összefüggés alapján (Wright, 1931). Ugyanakkor Slatkin (1985) megállapította, hogy az N_m szignifikáns korrelációban van a populációra specifikus, privát allélok átlagos gyakoriságával. Ez a korreláció azonban függ a minta méretétől. Mivel a privát allélok gyakorisága és a minta mérete között szintén ismert az összefüggés, ezért lehetőség van a mintaszámok különbözőségéből adódó hibák korrekciójára. A genetikai adatok elemzése során Slatkin módszerét alkalmaztuk az N_m értékek meghatározására, melyet Raymond & Rousset (1995) beépített a GENEPOP version 1.2 programba.

M.6.3. A populációk közötti genetikai differenciálódás mintázatának vizsgálata

Egy nagy kiterjedésű populációrendszerben (például a Kárpát-medencében) a genetikai differenciálódás nem homogén. Ennek egyik legnyilvánvalóbb esete a differenciálódás földrajzi mintázata, amikor a nagy terület különböző földrajzi régióin belül található populációk között alacsonyabb szintű a differenciálódás, mint a régiók között. De egy populációrendszer egyes tagjai ökológiai alapon is elkülönülhetnek a többitől. A differenciálódás mintázataként tehát a populációrendszeren belüli hierarchikus tagolódás genetikai következményei jelennek meg. Ennek a differenciálódási mintázatnak a tanulmányozására több módszert is alkalmaztunk.

M.6.3.1. Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA)

A molekuláris varianciaanalízis (AMOVA) segítségével egy hierarchikus szerkezetű populációrendszer genetikai variációját lehet elemezni. Ha a populációk között csoportok különíthetők el (pl. földrajzi régiók, vagy ökotípusok), akkor a populációrendszer teljes genetikai variációját három komponensre bonthatjuk: populációkon belüli komponens, a csoporton belüli populációk közötti komponens és a populációcsoportok közötti komponens (Excoffier, Smouse, & Quattro, 1992; Weir, 1996). Ebben az analízisben tehát a populációk közötti differenciálódás homogenitását lehet tanulmányozni. Az AMOVA-t az ARLEQUIN version 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) programmal végeztük el.

M.6.3.2. Bayes-féle klaszterezési módszer

A Bayes-féle klaszterezési módszer segítségével a vizsgált egyedeket felépítő, genetikailag differenciálódott klaszterek legvalószínűbb számát (K) lehet megállapítani. Az analízis az egyedek sok lokuszos genotípusát veszi alapul anélkül, hogy figyelembe venné eredeti besorolásukat a vizsgált populációkba (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000). A Bayes-féle klaszterezési módszert a STRUCTURE 2.3.2 program segítségével végeztük el. A futási paraméterek minden faj analízisében a következők voltak: „admixture model”-t használtunk, amely megengedi az egyedek több klaszterből való származását; az „initial burin” 100000 lépés volt a paraméter térben, a futás hosszúsága pedig 500000 lépés volt. A K értékek 1 és X között változtak a különböző fajok esetében, ahol X a kérdéses faj összes vizsgált populációja volt. Minden K értéket 5 ismétlésben futtatunk le. Az eredmények megadták a vizsgált K értékek valószínűségét az elemzett fajokra nézve, és az egyedek különböző klaszterekbe tartozásának a valószínűségét („cluster membership coefficient”). A legvalószínűbb K érték meghatározásához minden analízisben megbecsültük a ΔK értéket, ami megmutatja az egymást követő K értékek valószínűségének logaritmusai közötti különbséget (Evanno, Regnaut, & Goudet, 2005). A ΔK értékeket a STRUCTURE HARVESTER 0.6.91 (Earl & vonHoldt, 2011) program segítségével állapítottuk meg.

M.6.3.3. Főkomponens analízis

A főkomponens analízis (PCA) a sokváltozós statisztikai analízisek alapvető ordinációs módszere (Podani, 1997). A PCA célja a változók számának csökkentése új változók létrehozása révén. Az első új változó egy olyan tengely, ami az adatok varianciájának a lehető legnagyobb részét magyarázza meg. Az erre merőleges második új tengely a maradék variancia következő legnagyobb hányadát fedi le. Így a legtöbb analízisben az első két tengely az adatok varianciájának jelentős részét magyarázza meg. A PCA eredményeként a pontfelhő (egyedek, vagy populációk) a változók redukált terében jelenik meg, és így megállapítható a pontthalmazok (különböző populációk egyedei, vagy különböző régiók/fajok populációi) átfedésének a mértéke. Az analízis eredménye azt is megmutatja, hogy az új tengelyek milyen hányadát magyarázzák az adatok totális varianciájának, valamint hogy az eredeti változók milyen mértékben járultak hozzá az új tengelyekhez. A főkomponens analízist a genetikai és a morfometriai adatok elemzése során egyaránt alkalmaztuk. A genetikai adatok analízisében a populációk allélfrekvencia értékeit, illetve a Bayes féle klaszter analízisben kapott átlagos klasztermegoszlási koefficienseket használtuk alapadatként. A morfometriai adatok elemzése során pedig az egyedek szárnyain közvetlenül mért értékek, illetve az *E. aurinia* esetében a standard aszimmetria indexek voltak a kiindulási adatok. A főkomponens analízist minden esetben a PAST ver.1.56 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001b) program segítségével végeztük.

M.6.3.4. Mantel-teszt

A távolsággal arányos izoláció modellje lényegében a genetikai differenciálódás és a migráció egyensúlyát a tükrözi, vagyis azt fejezi ki, hogy a populációk közötti földrajzi távolság korrelációban van a köztük lévő genetikai távolsággal. A két változó közötti korrelációt a Mantel teszt (Mantel, 1967) segítségével vizsgáltuk, ami tulajdonképpen a két távolságmátrix között mutatja meg a korreláció szorosságát. A Mantel tesztet a GENALEX6 programcsomag (Peakall & Smouse, 2006) segítségével végeztük.

M.6.4. A különböző evolúciós folyamatok genetikai következményei

A különböző evolúciós folyamatok eredményeként megváltozik a populációk genetikai összetétele, vagy a közöttük kialakult differenciálódás mintázata. A biostatistika fejlődése egyre szélesebb körben tette lehetővé, hogy feltárjuk ezeknek a hatásoknak a genetikai következményeit. Munkánk során 3 módszert alkalmaztunk, melyek különböző evolúciós folyamatok kimutatására alkalmasak.

M.6.4.1. A palacknyak hatás kimutatásának lehetősége

A palacknyak hatás során a populációméret jelentős mértékben csökken, ami együtt jár bizonyos allélok véletlenszerű kiesésével. Az allélok megmaradásának elvesztésének az esélye gyakoriságukkal arányos. Így palacknyak hatására elsősorban a ritka allélok esnek ki a populációkból. A populációméret jelentős csökkenésének eredményeként tehát megváltozik az allélok különböző gyakorisági osztályok közötti megoszlása. Az egyensúlyi populációra jellemző L-alakú eloszlás (ritka allélok túlsúlya) eltolódik a közepes gyakorisági osztályok irányába (Luikart *et al.*, 1998). Ebből adódik, hogy az allélfrekvencia adatok alapján megállapított heterozigóta gyakoriság ($2pq$) magasabb lesz, mint az a várható heterozigótaság, amit az allélok száma alapján becsülhetünk, feltételezve egyensúlyi eloszlásukat (Luikart *et al.*, 1998). A palacknyak hatás tehát egy átmeneti heterozigóta többletet eredményez a populációban (Cornuet & Luikart, 1997; Luikart & Cornuet, 1998). A palacknyak hatás vizsgálata során ezt a heterozigóta többletet teszteltük a BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1997) program segítségével.

M.6.4.2. A diverzifikáló szelekció kimutatásának lehetséges módja

Egy populáció vizsgálata során a különböző lokuszokra megállapított F_{ST} értékek jelentős szórást mutatnak. Az F_{ST} értékek random eloszlása csak a populációk közötti heterozigótaság mértékétől függ (Stinchcombe & Hoekstra, 2007). Ha viszont egy lokuszon az F_{ST} érték kiugróan magas, akkor a random folyamatokon kívül, további diverzifikáló hatással (pl. szelekció) számolhatunk. A kiugró differenciálódást mutató lokuszok analízise során a genom szintű differenciálódást lehet elválasztani a lokusz specifikus hatásoktól (Stinchcombe és Hoekstra 2007). Az analízis alapja az, hogy összehasonlítjuk a tapasztalt F_{ST} értékeket a fixációs indexek random eloszlásával, ami a populációk közötti heterozigótaság alapján szimulálható (Beaumont & Nichols, 1996). A kiugró lokuszok vizsgálatára a LOSITAN (Antao *et al.*, 2008) programot használtuk. Az összes analízisben 0.99 volt a konfidencia limit. Az F_{ST} értékek random eloszlását minden esetben 300000 szimuláció eredményeként kaptuk meg. Az analíziseket valamennyi vizsgálatban 5 ismétlésben hajtottuk végre, és csak azokat a lokuszokat tekintettük szignifikánsan kiugrónak, amelyek mind az 5 ismétlésben azonos eredményt mutattak.

M.6.4.3. A populáción belüli rokonsági viszonyok vizsgálata

Az *E. murna* vizsgálata során teljes testvéreket kerestünk a mintákban. Első lépésben az egyedek gaméta fázisát állapítottuk meg. A gaméta fázis lényegében azt az egyedi allélkombinációt ('haplotípust') jelenti a sok lokuszos genotípusban, amit az illető egyed az apai, vagy az anyai gamétában kapott. A gaméta fázis megállapításához a Bayes-féle Excoffier–Laval–Balding (ELB) algoritmust használtuk (Excoffier, Laval, & Balding, 2003). Az ELB algoritmus az egyedek gaméta fázisát sok lokuszos genotípusuk alapján rekonstruálja. A heterozigóta lokuszok gaméta fázisát iteratív módon, a kapcsolt „lokuszok ablakának” segítségével állapítja meg az algoritmus. Nekünk azonban nem volt

információnk a vizsgált enzim lokuszok kapcsoltsági viszonyáról az *E. maturna*-ban. Így 5 párhuzamos adat file-t hoztunk létre minden mintából, melyekben véletlenszerűen felcseréltük a lokuszok sorrendjét. Ebből adódóan minden egyedre 5 gamétafázis állt a rendelkezésünkre. Az analízisekben azokat az egyedeket tekintettük testvéreknek, akik ugyanazt az allélkombinációt azonos gaméta fázisban hordozták mind az 5 párhuzamos futásban. A gaméta fázis megállapításához az ARLEQUIN version 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) programot használtuk. Minden analízisben 500000 volt a kezdeti szimulációk száma („burnin”), a mintázott szakasz 1000 lépés, míg a minta mérete 5000 volt a Gibbs láncban.

A rokonsági viszonyok tanulmányozásakor megállapítottuk továbbá az átlagos rokonsági fokot (r) az egyes minták egyedei közötti egy olyan mutatót használva, ami ekvivalens a Queller & Goodnight (1989) által kidolgozott paraméterrel. Az r értékek kiszámításához az FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 1995) programot használtuk. Ezzel párhuzamosan a páronkénti rokonság fokot is megállapítottuk a minták egyedei között az ML-RELATE (Kalinowski, Wagner, & Taper, 2006) program segítségével. A program először a közös származású allélok (0, 1, 2) valószínűségét határozza meg a két egyed között sok lokuszos genotípusuk alapján. A kérdéses két egyed rokonsági fokát (r) pedig ezeknek a valószínűségeknek a felhasználásával állapítja meg.

M.7. A DNS szekvencia adatok elemzése során alkalmazott statisztikai módszerek

A mtDNS COI szekvencia analízise két fajban történt meg: *Parnassius mnemosyne* és *Euphydryas aurinia*. A szekvenciák illesztését a *P. mnemosyne* esetében a MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2013) program felhasználásával, míg az *E. aurinia* esetében a DECIPHER program segítségével (Wright, 2016) végeztük. A saját adatainkon kívül további szekvenciákat is felhasználtunk az elemzések során: a *P. mnemosyne* esetében a Gratton *et al.* (2008) által publikált cikk adataiból, míg az *E. aurinia* esetében a Junker *et al.* (2015) cikkében szereplő szekvenciákból szelektáltunk. A végső szekvencia a *P. mnemosyne* esetében 927 bp, míg az *E. aurinia*-nál 616 bp hosszúságú volt.

A szekvenciák alapján haplotípus hálózatot szerkesztettünk R környezetben a PEGAS v. 0.6 program segítségével (Paradis, 2010). A haplotípusok földrajzi megoszlásának ábrázolásához a QGIS (QGISDevelopmentTeam, 2014) programot használtuk.

M.8. A morfometriai vizsgálatokban alkalmazott statisztikai módszerek

A morfometriai és a genetikai vizsgálatokat párhuzamosan végeztük, ezért a morfometriai adatok elemzése során olyan statisztikai módszereket alkalmaztunk, amelyeknek eredményei párhuzamba állíthatók a genetikai analízisek eredményeivel. A morfometriai adatok a legtöbb esetben közvetlenül a mért értékek voltak, kivéve a szögeket, melyeket radiánban fejeztünk ki a statisztikai analízisek során.

M.8.1. A morfológiai változatosság mértéke – Levene-féle változó

Az *Euphydryas aurinia* mintákban a morfológiai változatosság szintjének a jellemzésére a Levene-féle változót használtuk (L). A Levene-féle változó a jelleg egyedre mért értékének a mintaátlagtól való eltérése abszolút értékben kifejezve ($L=|X_{\text{átl}}-X_i|$) (Levene, 1960). A Levene-féle változót tehát minden jellegre nézve külön-külön számítottuk ki. Annak érdekében, hogy a különböző jellegek Levene-féle értékei összehasonlíthatók

legyenek, a jelleg mintaátlagának a százalékában fejeztük ki őket ($L\% = |X_{\text{átl}} - X_i| / X_{\text{átl}}$). A populációk fenotípusos változatosságát pedig a Levene-féle változók átlagával jellemeztük.

A fenotípusos változatosság mértékét az *Maculinea nausithous* populációk esetében a variációs koefficienssel ('coefficient of variation': CV) jellemeztük. A variációs koefficiens lényegében a minta szórása az átlag százalékában kifejezve (Sokal & Rohlf, 1981).

M.8.2. A morfológiai változatosság szerkezete

A morfológiai változatosság szerkezetének vizsgálata során több olyan módszert is alkalmaztunk, melyek már ismertetésre kerültek a genetikai adatok elemzésével kapcsolatban. Tipikusan ilyen módszer a főkomponens analízis, melyben a morfometriai elemzések kiindulási adatai az egyedeken mért értékek, esetleg az aszimmetria indexek voltak. A főkomponens analízist a morfometriai adatok esetében is a PAST ver.1.56 (Hammer *et al.*, 2001) program segítségével végeztük. A másik statisztikai módszer a Mantel teszt (Mantel, 1967) volt, melyet a genetikai és a morfometriai adatok elemzése során egyaránt alkalmaztunk. A populációk közötti morfometriai távolságokat a Mahalanobis távolsággal (Mahalanobis, 1936) jellemeztük, melyeket az IBM SPSS Statistics 20 program csomaggal állapítottunk meg. A Mantel-teszt elvégzésére a morfometriai analízisek során is a GENALEX6 (Peakall & Smouse, 2006) programcsomagot használtuk.

M.8.2.1. Hierarchikus varianciaanalízis

A hierarchikus varianciaanalízisben a vizsgált minták hierarchikus szerkezetének megfelelő variancia komponensek megoszlását tanulmányoztuk. Mindkét faj (*E. aurinia* és *M. nausithous*) morfometriai elemzésében ugyanazt a három hierarchia szintet elemeztük, melyek az AMOVA-ban is szerepeltek: populációkon belül, az egyedek közötti variancia; a populációcsoportokon belül, a populációk közötti variancia; és a populációcsoportok közötti variancia. A hierarchikus varianciaanalízist a GLIM 4 programmal (Francis *et al.*, 1994) végeztük. Az analízist minden jellegre külön-külön hajtottuk végre, majd átlagoltuk az egyes jellegek adott szintre eső variancia hányadait. Mivel a genetikai és a morfometriai adatok elemzése során azonosak voltak a hierarchia szintek, a hierarchikus varianciaanalízis eredményeit párhuzamba tudtuk állítani az AMOVA eredményével. Így tulajdonképpen a genetikai és a fenotípusos variancia hierarchikus szerkezetét hasonlítottuk össze.

M.8.2.2. Diszkriminancia analízis

A diszkriminancia analízis az adatokban eleve meglévő csoportok elkülönítésére kidolgozott ordinációs módszer (Podani, 1997). Ebben a sokváltozós analízisben is új tengelyeket alakítunk ki, de most úgy, hogy ezek a tengelyek a lehető legnagyobb mértékben magyarázzák meg a csoportok közötti különbségeket. Amíg tehát a főkomponens analízisben az új tengelyek a teljes varianciát maximalizálják, addig a diszkriminancia analízisben a csoportok közötti varianciát. Az analízis eredménye egyrészt megmutatja az egyedek helyzetét az új tengelyek mentén (kanonikus változók), másrészt azt, hogy az új tengelyek milyen hányadát magyarázzák a csoportok közötti különbségeknek, és hogy az eredeti változók milyen mértékig játszanak szerepet a kialakításukban. A diszkriminancia analízist az IBM SPSS Statistics 20 program csomaggal végeztük.

M.8.3. Korrelációs vizsgálatok

A korreláció elemzése során azt vizsgálják, hogy milyen szoros az összefüggés két változó között. Leggyakrabban a Pearson-féle korrelációs koefficiens (r) használják, ami a két változó közötti lineáris összefüggést jellemzi. Munkám során a korreláció elemzése a *Parnassius mnemosyne* és az *Euphydryas aurinia* populációk vizsgálata során merült fel. A *P. mnemosyne* populációkban az enzimpolimorfizmus mutatói és a földrajzi hosszúsági fokok közötti összefüggést vizsgáltuk. Az *E. aurinia* populációkban pedig az egyedek morfometriai jellegei, valamint standard aszimmetria indexei és a populációkra jellemző hosszúsági fokok között állapítottuk meg a korreláció mértékét. Az analíziseket mindkét faj esetében a GLIM 4 program csomaggal (Francis *et al.*, 1994) végeztünk.

M.8.4. A fluktuáló aszimmetria vizsgálata

A szárny jellegek aszimmetriáját az *E. aurinia* populációkban vizsgáltuk. Az adatok feldolgozása során először faktoriális ANOVA-t végeztünk a GLIM 4 program (Francis *et al.*, 1994) segítségével, ahol az egyed random, míg az oldal fix faktor volt. Majd az átlagos négyzetösszegekből kiindulva meghatároztuk a fluktuáló és a direkcionális aszimmetriára eső variancia hányadot (Palmer & Strobeck, 1986). Az egyedek aszimmetriájának a mértékét a standardizált aszimmetria indexszel fejeztük ki (Palmer & Strobeck, 1986), ami nem más, mint a két oldal abszolút eltérése az átlagra vonatkoztatva ($FA = |X_j - X_b| / X_{\text{atl}}$). Az egyedek standard aszimmetria indexeivel főkomponens analízist végeztünk, majd kerestük a korrelációt az egyedek első tengely mentén kapott koordinátái és a populációk hosszúsági foka között. A PCA elvégzésére a PAST ver.1.56 (Hammer *et al.*, 2001) program csomagot használtuk.

Esettanulmányok

E.1. A kis populációkban érvényesülő evolúciós hatások tanulmányozása

E.1.1. Genetikai sodródás

A genetikai sodródás hosszú távon azt eredményezi, hogy a populációk variabilitása csökken, ami elsősorban a ritka allélok elvesztése révén valósul meg (I.3.2.1. fejezet). Ugyanakkor drift hatására nemcsak a populációk genetikai összetétele változik meg, hanem a populációk közötti differenciálódás mértéke is. Erős genetikai sodródásnak kitett populációkban tehát az várható, hogy genetikai változatosságuk alacsony szintű, míg a közöttük fellépő differenciálódás intenzív.

A genetikai sodródás alapvetően a kis populációkat érintő jelenség, de a sztochasztikus folyamatok erősödését más hatások (pl. speciális életmenet) is előidézhetik.

E.1.1.1. A szaporodási stratégia hatása a populációk genetikai szerkezetére: az *Euphydryas maturna* és a *Parnassius mnemosyne* populációk enzimpolimorfizmusának összehasonlítása

Az 1.1.1. fejezet a következő cikk, illetve könyv fejezetek alapján készült:

Meglécz, E., Neve, G., Pecsenye, K. and Varga, Z. 1999. Genetic variations in space and time in *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera) populations in northeast Hungary. *Biological Conservation* **89** (3): 251-259. (IF: 1,579)

Pecsénye, K., Meglécz, E., Kenyeres, Á. and Varga, Z. 2006. Population structure and enzyme polymorphism in three protected butterfly species in the Carpathian Basin (*Parnassius mnemosyne*, *Euphydryas maturna*, *Aricia artaxerxes*). pp. 217-229. In: I. Láng (ed.) *Environmental Science and Technology in Hungary*. Műszaki Kiadó, Budapest.

Pecsénye K., Bereczki J., Tóth A., Meglécz E., Peregovits L., Juhász E. és Varga Z. 2007. A populációstruktúra és a genetikai variabilitás kapcsolata védett nappalilepke-fajainknál. pp. 1-20. In Forró L. és Ronkay L. (szerk.) *A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása*. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest

Elméleti háttér

Egy faj szaporodási stratégiája azt befolyásolhatja, hogy populációi milyen mértékig vannak kitéve a véletlen hatásainak. Az r-K kontinuum r tartományában található fajok szaporodását röviden úgy jellemezhetjük, hogy a kérdéses faj elsősorban arra fordítja energiaforrásait, hogy sok utódot hozzon létre, viszont kevés energiát fektet az utódok túlélési esélyének növelésébe. Ebből adódóan az utódok túlélését jelentősen befolyásolják a különböző sztochasztikus folyamatok, vagyis az ilyen fajok populációi viszonylag intenzív drift hatásnak vannak kitéve. Ugyanakkor a kontinuum K tartományába tartozó fajok szaporodására az jellemző, hogy elsődlegesen az utódok túlélésére fordítják a szaporodásba fektetett energiaforrásokat, viszont kevés utódot hoznak létre. Az ilyen fajok utódainak túlélése viszonylag magas és kiegyenlített, populációikban tehát kevésbé érvényesülnek sztochasztikus hatások (pl. (MacArthur & Wilson, 1967; Stearns, 1976). Bár a nappali lepkék az állatvilág egészét tekintve inkább az r-K kontinuum r-hez közeli tartományában találhatók, a különböző fajok szaporodási stratégiája jelentős változatosságot mutat.

A díszes tarkalepke (*Euphydryas maturna*) tipikusan r-stratégista faj. Nőstényei 1-2 csomóba rakják le a mintegy 300-350 petéjüket az elsődleges tápnövényre (Weidemann, 1985; Wahlberg, 2000; Vrabec, Čížek, O., & Beneš, J., 2002a; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2007). A kikelő hernyók a tápnövény hajtásain fészket szőnek, és abban közösen táplálkoznak. A nyár közepén az avarszintben, közös szövedékben megkezdik az észtivációt, amely megszakítás nélkül megy át a hibernációba (Eliasson & Shaw, 2003; Konvička *et al.*, 2005; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2012). A hernyók tehát az első három lárvastádiumot közös szövedékben töltik, és csak a következő tavasszal szélednek szét (Vrabec *et al.*, 2002a; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2007). Ebben az időszakban tápnövényt váltanak, és a korábban használt fás, vagy cserjés növények (Magyarországon *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* ssp. *pannonica* vagy *Ligustrum vulgare*) helyett lágyszárú növényeket (nálunk főleg *Veronica* spp.) fogyasztanak (Weidemann, 1985; Varga, 1995). Ennek a speciális szaporodási stratégiának az a következménye, hogy a különböző kedvezőtlen hatások (időjárás, ragadozók, parazitoidok stb.) egy nősténynek szinte az összes utódját elpusztíthatják. Dolek *et al.* (2007) kimutatták, hogy a díszes tarkalepke hernyóinak túlélése a diapauzát megelőző időszakban nagyon alacsony, ráadásul jelentős varianciát mutat az egyes fészkek között. A speciális szaporodási stratégia következménye tehát az, hogy a díszes tarkalepke populációk egyedszáma jelentős mértékben ingadozik. Mindezek eredményeként azt várjuk, hogy az *E. maturna* populációk intenzív drift hatásnak vannak kitéve.

A kis apollólepke (*Parnassius mnemosyne*) szaporodási stratégiája a lepkék között szinte az ellenkező véglet. A nőstények nagyjából 50 petéjüket egyesével helyezik el a talajon vagy más tereptárgyon (pl. elszáradt növényen), annak közelében, ahol a következő tavasszal a tápnövény (*Corydalis cava*, *C. solida*) kihajt. A peterakó nőstények sokat

repülnek, így a petéket nagy területen szórják szét. A peték viszonylag nagyok, a bennük felhalmozott jelentős mennyiségű szikanyag teszi lehetővé a kikelt lárvák áttelelését. A *P. mnemosyne* szaporodási stratégiája tehát az r-K kontinuumban eltolódik a K-stratégia irányába az *E. maturnához* képest. Így a kis apollólepke populációi stabilabbak, egyedszámuk többnyire nem ingadozik jelentős mértékben. Ennek következtében a drift hatását is kevésbé intenzívnak várjuk a kis apollólepke populációkban.

Célkitűzések

Vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk a genetikai variabilitás szintjét és a genetikai differenciálódás mintázatát a díszes tarkalepke és a kis apollólepke hazai populációiban. Bár a két faj leszármazási kapcsolata távoli, és rendszertanilag más családokba tartoznak, ökológiai igényeik meglepően hasonlóak. Mindkét faj strukturált habitatban él: Közép-Európában, és így nálunk is erdőszéleken, tisztásokkal vagy irtásokkal tagolt üde erdőkben. Ebből adódóan populációik nemcsak szimpatrikusak, de gyakran jelennek meg szüntopikusan, a folyók menti keményfás ligeterdőkben (pl. a Szatmár-Beregi-síkon, Sajóládon, vagy a Kőrösök vidékén), kontinentális jellegű tölgyesekben (pl. a Bükk-hegységben) és köris-elegyes, geofitonokban gazdag szikla- és szurdokerdőkben (Bakony, Gömör-Tornai-karszt, Erdély). Munkahipotézisünk az volt, hogy a két faj szaporodási stratégiájában meglévő jelentős eltérések következményeként komoly különbségek várhatók a populációikra ható genetikai sodródás erősségében. Azt tételeztük fel, hogy az intenzívebb sztochasztikus hatásoknak kitett *E. maturna* populációkban alacsony lesz a genetikai variabilitás, ami párosul a populációk közötti differenciálódás magas szintjével. Ezzel szemben a *P. mnemosyne* vizsgálata során azt vártuk, hogy a populációk variabilitása magas szintű lesz, és mérsékelt differenciálódás mellett megjelenik a variabilitás földrajzi mintázata.

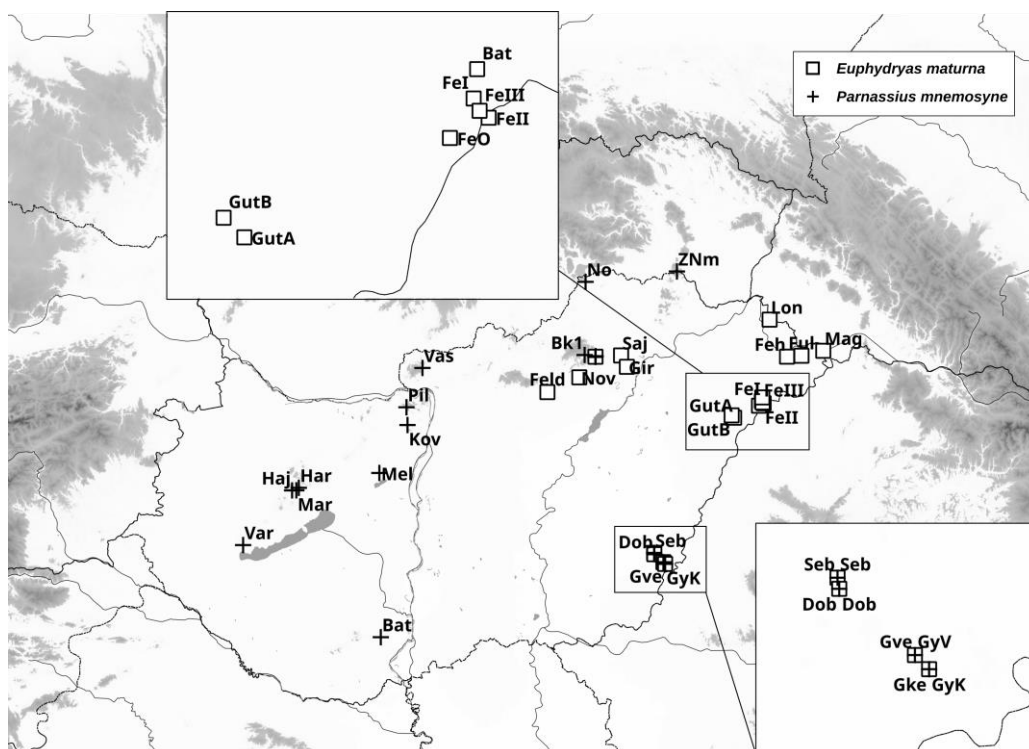
Hipotézisünk tesztelésére hasonló földrajzi léptékben vettük a mintákat a két faj magyarországi populációiból. A genetikai variabilitás szintjének és szerkezetének a tanulmányozása az enzimpolimorfizmus vizsgálata révén történt. Az *E. maturna* mintákban 18 enzim lokuszt elemeztünk, míg a *P. mnemosyne* mintákban 14-et.

Minták

Mindkét faj mintáit több földrajzi régióban gyűjtöttük 2001 és 2014 között. Az *E. maturna* minták 4 földrajzi régió (NYR, BER, KÖR és ÉMO) összesen 20, míg a *P. mnemosyne* minták 3 földrajzi régió (ÉKH, DKH és KÖR) 18 populációjából származtak (E.1.1.1. ábra és E.1.1.1. Függelék). Így a vizsgálatokban 603 *E. maturna*, míg 458 *P. mnemosyne* egyed enzimpolimorfizmusát elemeztük.

Eredmények és értékelésük

A két faj mintaszáma és a minták átlagos egyedszáma is alapvetően hasonló volt az elektroforetikus vizsgálatok során (E.1.1.1. függelék). Az adatok elemzésének első lépésében meghatároztuk a polimorfizmus legfontosabb mutatóit mind a két faj populációira nézve (E.1.1.2. függelék). A mutatókat összehasonlítva egyértelmű, hogy az *E. maturna* populációk alacsonyabb szintű változatosságot mutattak, mint a *P. mnemosyne* populációk (E.1.1.1. táblázat). Ez a különbség minden vizsgált mutató esetében magasan szignifikánsnak bizonyult (E.1.1.1. táblázat: ANOVA).



E.1.1.1. ábra: Az *E. maturna* és a *P. mnemosyne* mintahelyei. Az *E. maturna* minták 4 földrajzi régióból származtak. Nyírség (NYR) 7 populáció: FeO, FeI, FeII, FeIII, GutA, GutB és Bat; Szatmár-Beregi-sík (BER) 4 populáció: Fül, Lon, Feh és Mag; Körösök vidéke (KÖR) 4 populáció: Seb, Dob, GyV és GyK; Észak-Magyarország (ÉMO) 5 populáció: Saj, Feld, Gir, Nov és Kgy. A *P. mnemosyne* mintákat 3 földrajzi régióban gyűjtöttük. Északi-középhegység (ÉKH) 5 populáció (ZNm, No, Bk1-3); Dunántúli-középhegység (DKH) 9 populáció: Vas, Pil, Kov, Mel, Har, Haj, Mar, Var, Bat; Körösök vidéke (KÖR) 4 populáció: Seb, Dob, GyV és GyK.

Az adatok elemzésének a második szakaszában a populációk genetikai struktúráját tanulmányoztuk. Elsőként mind a két faj esetében főkomponens analízist (PCA) végeztünk a populációk allélfrekvencia adatai alapján. A *P. mnemosyne* populációkat jelképező pontok három világosan elkülönült halmazt alkottak az első két tengely mentén, a földrajzi régióknak megfelelően: Északi-középhegység, Dunántúli-középhegység és a Körösök vidéke (E.1.1.2. ábra). Különösen egyértelmű volt az utóbbi régió elkülönülése a másik kettőtől az 1. tengely mentén, ami a teljes varianciának a 45,1 %-át magyarázta meg. Ezzel ellentétben, az *E. maturna* populációk diffúz pontfelhőt alkottak a változók redukált terében, ahol a négy földrajzi régió között csak részleges differenciálódás volt megfigyelhető a 2. tengely mentén (E.1.1.2. ábra). Ez a tengely azonban a totális varianciának mindössze a 21,2 %-át magyarázta.

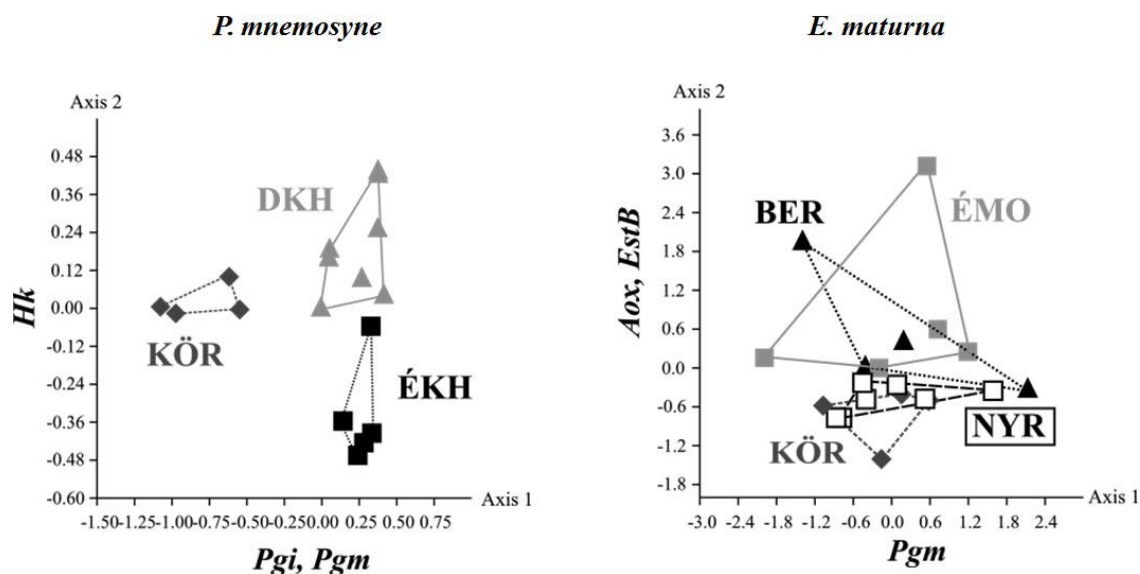
A genetikai struktúra analízisének a következő lépésében Bayes-féle klaszteranalízist végeztünk az egyedek sok lokuszos genotípusa alapján. Elsőként a mintákat felépítő klaszterek legvalószínűbb számát határoztuk meg. Sajátos módon, ez mind a két faj esetében $K=3$ volt. Majd megállapítottuk a 3 klaszterbe tartozás valószínűségét (klaszter besorolási koeficiens) minden egyedre nézve. A továbbiakban ezeket a valószínűségeket egy egyenlő oldalú háromszögben ábrázoltuk, ahol a háromszög csúcsai a klaszterek maximális valószínűségeit jelképezték. Így az egyedek (a háromszögben elhelyezkedő pontok) azt is reprezentálták, hogy genetikai állományuk kialakításában milyen mértékben vettek részt az analízisben definiált klaszterek. Minél inkább a csúcsoknál tömörültek az

egyedek, annál egyértelműbb volt, hogy genetikai összetételük megfelelt a csúcsot jelképező klaszterének. Ezzel ellentétben, a háromszög belsejében elhelyezkedő egyedek genetikai állománya kevert volt, a klaszterek különböző arányokban vettek részt a kialakításukban. Összehasonlítva az egyedek elhelyezkedését a háromszögben megállapíthatjuk, hogy a *P. mnemosyne* egyedek túlnyomó többsége a három csúcs közelében található, és klaszter összetételük a földrajzi régióknak megfelelő különbségeket mutatja (E.1.1.3. ábra). Ezzel ellentétben az *E. matura* egyedek többsége a háromszög belsejében található, ráadásul nem mutatnak a földrajzi régióknak megfelelő aggregációt sem. A Bayes-féle klaszteranalízis eredménye tehát, a PCA eredményéhez hasonlóan azt jelzi, hogy a *P. mnemosyne* populációk genetikai struktúrája földrajzi mintázatot tükröz, míg ez nem jellemző az *E. matura* populációkra.

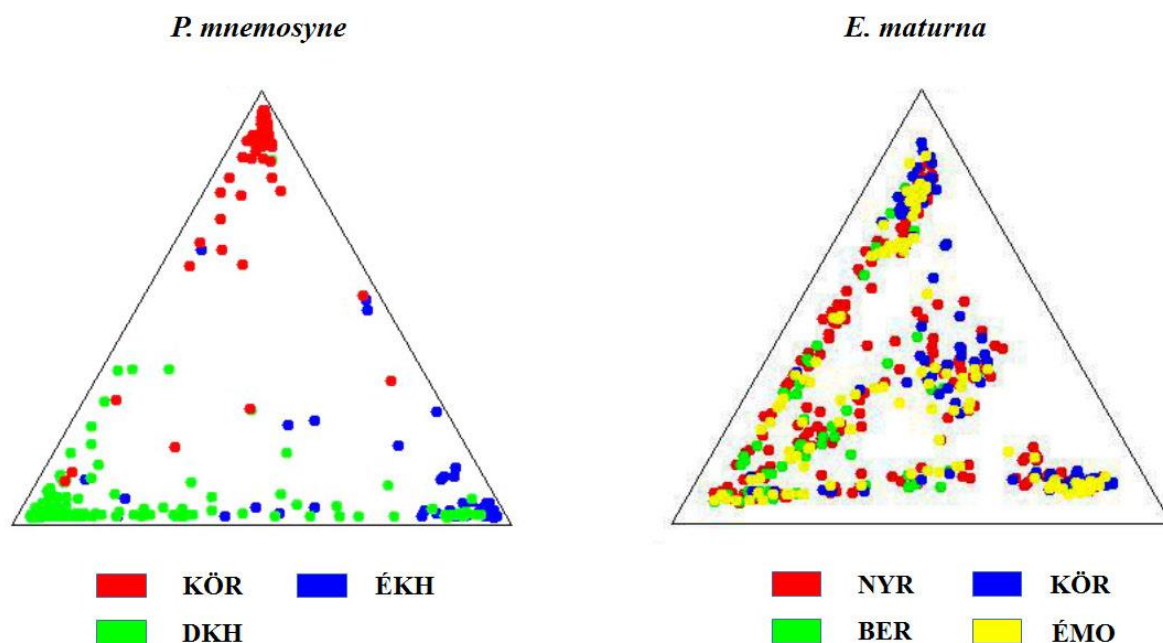
E.1.1.1. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói a *P. mnemosyne* és az *E. matura* földrajzi régióiban. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; NYR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; ÉMO: Észak-Magyarország. Np/r: a populációk száma a régióon belül; N/s: az átlagos mintaszám; n_A: az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=13); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; %Fix: a fixálódott allélok aránya; P₉₅: a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ANOVA: a két faj mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség. A kövér betűk azt jelzik, hogy a fajok közötti különbség szignifikáns.

	Régió	Np/r	N/s	n _A	Ar	Ho	%Fix	P ₉₅
<i>P. mnemosyne</i>	ÉKH	5	19.60	2.11	1.97	0.135	0.261	0.457
	DKH	8	26.55	2.59	2.33	0.193	0.165	0.580
	KÖR	4	31.25	2.50	2.26	0.217	0.108	0.732
	Átlag	5.7	25.61	2.43	2.21	0.181	0.180	0.580
<i>E. matura</i>	NYR	7	37.27	1.89	1.66	0.112	0.202	0.611
	BER	4	19.28	1.74	1.66	0.121	0.299	0.486
	KÖR	4	29.38	1.76	1.59	0.114	0.290	0.500
	ÉMO	5	28.94	1.70	1.57	0.111	0.303	0.489
	Átlag	5.0	30.01	1.79	1.63	0.114	0.264	0.533
ANOVA	F _{1,35}	-	-	7,81	10,07	17,63	13,80	11,07
	P	-	-	0,005	0,002	0,000	0,000	0,001

A két faj genetikai struktúrájában tapasztalt különbségek további alátámasztására összehasonlítottuk bennük a régiókon belüli és a régiók közötti differenciálódás mértékét. Két mutatót használtunk: a fixációs indexet (F_{ST}) és a migránsok effektív számát (N_m). Ez utóbbit Slatkin (1985) nyomán, a populációk specifikus alléljai alapján becsültük meg. Minkét mutató meghatározásakor két különböző adathalmazt használtunk mind a két faj esetében. A régiókon belüli differenciálódás vizsgálata során minden régiót külön analizáltunk; míg a régiók közötti differenciálódás elemzésénél az összes populáció adatait használtuk oly módon, hogy a régiók populációit összeolvastottuk. Ez utóbbi analízisben tehát minden földrajzi régió egyetlen nagy populációként szerepelt. A régiókon belüli differenciálódás mértékét illetően nincs számottevő különbség a két faj között. Mind a kis apollólepke, mind pedig a díszes tarkalepke esetében hasonlóan változatosnak mutatkozott a



E.1.1.2. ábra: A *P. mnemosyne* és az *E. matura* populációk allélfrekvencia adatai alapján végzett főkomponens analízis eredménye. A két tengely mentén azok a lokuszok vannak feltüntetve, amelyek a leginkább hozzájárultak a tengelyek kialakításához. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; NYR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; ÉMO: Észak-Magyarország.



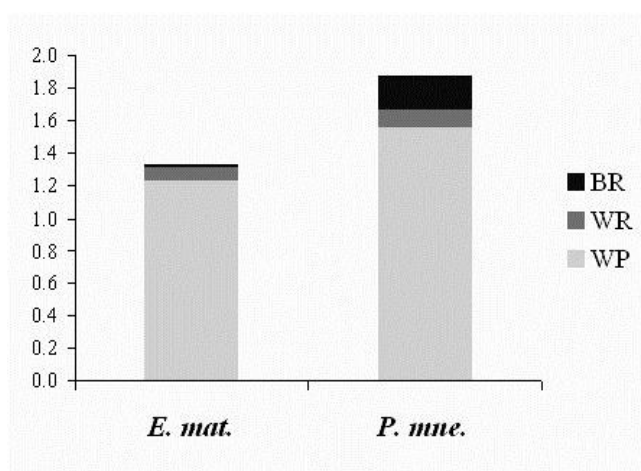
E.1.1.3. ábra: A Bayes-féle klaszteranalízis eredménye a *P. mnemosyne* és az *E. matura* mintákban három klasztert feltételezve ($K=3$). A háromszög csúcsai a 3 klaszter maximális valószínűségét jelképezik, míg a pontok a vizsgált egyedeket. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; NYR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; ÉMO: Észak-Magyarország.

populációk közötti differenciálódás az egyes régiókon belül. A régiók közötti differenciálódásra vonatkozó eredmények viszont teljes mértékig alátámasztották a PCA és

a Bayes-féle klaszteranalízis során tapasztaltakat (E.1.1.2. táblázat). A *P. mnemosyne* esetében a földrajzi régiók közötti differenciálódás mutatói egyértelműen magasabbak voltak, mint a régiókon belüliek. Ez a megállapítás, még a legmagasabb differenciálódást mutató régióra (Északi-középhegység: ÉKH) is igaz volt. Az *E. maturna* populációk esetében azonban nem tapasztaltunk ilyen trendet. Az F_{ST} értékek szinte minden régióban magasabbak voltak a populációk között, mint a régiók közötti érték. A régiók közötti migráció mértéke pedig magasabb volt, mint a régiókon belüli, egy régió kivételével (KÖR).

E.1.1.2. táblázat: A genetikai differenciálódás mutatói a *P. mnemosyne* és az *E. maturna* földrajzi régióin belül és azok között. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; NYR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; ÉMO: Észak-Magyarország. Np/r: a populációk száma a régióon belül; F_{ST} : fixációs index; Nm: a migránsok effektív száma. Szignifikancia szintek a Bonferroni korrekció után: ** 0,001<P<0,01; * 0,01<P<0,05.

	Régió	Np/r	F_{ST}	Nm
<i>P. mnemosyne</i>	ÉKH	5	0.110**	1.82
	DKH	8	0.056**	6.37
	KÖR	4	0.053**	5.43
	Reg	3	0.125**	0.62
<i>E. maturna</i>	NYR	7	0.036**	1.36
	BER	4	0.106**	4.55
	KÖR	4	0.020*	8.73
	ÉMO	5	0.109**	2.84
	Reg	4	0.024**	5.26



E.1.1.4. ábra: Az AMOVA eredménye az *E. maturna* és a *P. mnemosyne* mintákban. BR: régiók közötti variancia komponens; WR: a régiókon belüli populációk közötti variancia komponens; WP: a populációkon belüli variancia komponens.

Valamennyi korábbi analízis eredményét alátámasztotta az AMOVA (E.1.1.4. ábra). Ebben az analízisben a variancia komponensek megoszlását elemeztük a különböző hierarchia szintek között. A *P. mnemosyne* populációk totális varianciája 41 %-kal

magasabb volt, mint az *E. matura* populációké, ami alapvetően két komponensre vezethető vissza, a populációkon belüli, és a régiók közötti komponensekre. Vagyis a díszes tarkalepke populációk variabilitása jelentősen alacsonyabb volt, mint a kis apollólepke populációké. A regionális differenciálódás szintén a kis apollólepke populációk között volt magasabb, hiszen ez a komponens a díszes tarkalepke populációk esetében csak mintegy 1 %-át tette ki a totális varianciának. Ugyanakkor a régiókon belül, a populációk közötti differenciálódás mértéke hasonló (~5%) volt a két faj esetében.

Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a vizsgálatok eredményei nagyrészt alátámasztották a két faj szaporodási stratégiájának különbségei alapján felállított hipotéziseinket genetikai változatosságuk szintjével és szerkezetével kapcsolatban:

- a. A *P. mnemosyne* populációk variabilitása szignifikánsan magasabb volt, mint az *E. matura* populációké, ami a drift erőteljes hatására utal a díszes tarkalepke populációkban.
- b. Nem tapasztaltunk azonban számottevő különbséget a két faj között a populációk közötti differenciálódás mértékében akkor, amikor azt hasonló földrajzi léptékben, a régiókon belül vizsgáltuk.
- c. A genetikai differenciálódás mintázata viszont a várakozásunknak megfelelő különbséget mutatta a két faj között. A nagyobb sztochasztikus hatásoknak kitett *E. matura* populációk esetében a differenciálódásnak nem volt földrajzi mintázata, vagyis a populációk közötti genetikai különbségek hasonlóak voltak a régiókon belül és a régiók között. Ezzel szemben a *P. mnemosyne* populációk differenciálódását egyértelműen jellemezte a regionális mintázat.

Érdekes azonban végiggondolni a differenciálódás mértékére és mintázatára kapott eredmények ellentmondásait. A populációk közötti genetikai különbségek ugyanis nemcsak a jelenben és a közeli múltban zajló sztochasztikus, vagy szelekciós hatások eredményeként halmozódhatnak fel, hanem lehetnek a történelmi múlt eseményeinek a következményei is. Fakadhatnak tehát abból is, hogy a kérdéses földrajzi régiók különböző refúgiumokból népesültek be a legutolsó eljegesedés után vagy, hogy azonos refúgiumból, de eltérő kolonizációs útvonalon történt a betelepülés. Ezeknek a folyamatoknak a feltárására azonban az enzimek, mint markerek csak korlátozott mértékben alkalmasak. A vizsgálataink földrajzi léptéke sem teszi lehetővé, hogy ilyen jellegű különbségeket fel tudjunk tárni a két faj között. Az *E. matura* filogeográfiai analízise még nem történt meg, a *P. mnemosyne* esetében azonban a mtDNS COI szekvenciája alapján, Gratton *et al.* (2008) európai skálán vizsgálták a faj lehetséges refúgium területeit, illetve a feltételezhető kolonizációs utakat. Az ő munkájuk világított rá, hogy a kis apollólepke Kárpát-medencei populációi alapvetően a Balkán-félsziget refúgiumaiból származnak, ahonnan lényegében két fő útvonalon (kelet- és nyugat-balkáni útvonal) történt a kolonizáció. A vizsgálataink során tapasztalt erős regionális differenciálódás azonban csak részben magyarázható ezeknek a kolonizációs eseményeknek a genetikai következményeivel. A két útvonalnak megfelelő két genetikai vonal ugyanis a Kárpát-medence nyugati, illetve a keleti területeit népesítette be. A mi mintaterületeink közül a Dunántúli-középhegységet tekinthetjük nyugatinak, míg az Északi-középhegységet és a Körösök vidékét keletinek. A PCA eredménye azonban egyértelműen mutatja, hogy a differenciálódás elsősorban a Körösök vidéke, és a középhegységi populációk között figyelhető meg. Megállapíthatjuk tehát, hogy a történelmi múlt eseményei valószínűleg befolyásolták a vizsgált *P. mnemosyne* populációk genetikai struktúráját, de a differenciálódás regionális mintázatának kialakításában feltehetően kisebb volt a szerepük.

Genetikai differenciálódás azonban nemcsak a genetikai sodródás hatására jelenhet meg, hanem diverzifikáló szelekció eredményeként is kialakulhat. Mivel a diverzifikáló szelekció következménye az eltérő ökológiai adottságú régiók között megjelenő lokális adaptáció, ezért feltételezhetjük, hogy a *P. mnemosyne* populációk regionális differenciálódásának a hátterében a sztochasztikus hatásokon túlmenően szelekciós folyamatok is állnak.

E.1.1.2. A fakultatív és az obligát mirmekofília genetikai következményei: az *Aricia artaxerxes* és a *Maculinea alcon* (cruciata ökotípus) genetikai változatosságának összevetése

Az 1.1.2. fejezet a következő cikkek alapján készült:

Pecsenye, K., Bereczki, J., Szilágyi, M. and Varga, Z. 2007. High level of genetic variation in *Aricia artaxerxes issekutzi* (Lepidoptera: Lycaenidae) populations in Northern Hungary. *Nota Lepidopterologica* **30**: 225-234.

Bereczki, J., Pecsenye, K. and Varga, Z. 2006. Geographical versus Food plant Differentiation in Alcon Blue Populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Northern Hungary. *European Journal of Entomology* **103**: 725-732. (IF: 0,782)

Elméleti háttér

A boglárkalepkék családjának (Lycaenidae) eddig világszerte több mint 6000 fajtát írták le. A fajok jelentős többségének a hernyója valamilyen szinten kötődik a hangyákhoz (Fiedler, 2001; Pierce *et al.*, 2002). A boglárkalepke hernyók és a hangyák közötti kapcsolat az esetek túlnyomó többségében mutualista, vagyis a hernyók tápanyagban gazdag cseppeket választanak ki a hangyák számára, akik ennek fejében nem támadják meg, sőt őrzik őket (Pierce, 1989). Ezeknek a fajoknak a lárvái úgynevezett mirmekofil szervekkel rendelkeznek, melyek lényegében mirigyek, váladékukat a kutikula felszínére ürítik (Fiedler, 1991). A mutualista mirmekofil kapcsolatok sok esetben fakultatívak, a hernyók nem kerülnek be a fészkekbe, és az őrző hangyák segítsége nélkül is túlélnek a lárvastádiumot. A boglárkalepke–hangya kapcsolatoknak egy kis hányada azonban egyértelműen parazita–gazda viszony. Ilyenkor a hernyók bekerülnek a hangyafészkekbe, és ott fejezik be a fejlődésüket. Az ilyen obligát mirmekofil fajok hernyói el is pusztulnak, ha a megfelelő lárvastádiumban nem jutnak be a specifikus hangyagazda fészkebe, ahol aztán vagy hangyalárvákkal táplálkoznak (ragadozók), vagy a dolgozók táplálják őket (kakukkstratégia) (Fiedler, 2001).

A hegyi szecsenboglárka (*Aricia artaxerxes*) a fakultatív mirmekofil fajok közé tartozik. A nőtények petéiket a tápnövény (hazai adatok szerint *Helianthemum ovatum* és *Geranium sanguineum*) levélfonákára vagy virágzó hajtására rakják (Varga, 1968). Kikelés után a lárvák a levél fonákán táplálkoznak, majd a második lárvastádiumban áttelelnek a tápnövény tövére. Bár a mirmekofil szervek a hibernáció előtt is megtalálhatók a hernyókon, azok ebben a szakaszban még nincsenek kapcsolatban a hangyákkal (Ravenscroft & Warren, 1996). A hibernáció után a lárvák újra táplálkoznak, és ekkor látogatják őket a különböző hangya fajok, elsősorban *Lasius* és *Formica* spp. (Malicky, 1969; Fiedler, 1991). A fakultatív mirmekofília tehát viszonylag kiegyenlített túlélést biztosít a populáció egyedeinek. Ebből adódóan a véletlen folyamatok kevésbé intenzívek az *A. artaxerxes* populációkban.

A szürkés hangyaboglárka (*Maculinea alcon*) obligát mirmekofil faj. A *M. alcon* cruciata ökotípusának nőténye petéit a specifikus tápnövény (Szent László-tárnics – *Gentiana*

cruciata) fiatal bimbóira vagy a fertilis hajtás felső leveleire rakja (Kéry, Matthies, & Fischer, 2001; Árnas *et al.*, 2006, 2009). A kikelő lárvák a tápnövény fejlődő magjaival táplálkoznak, majd 2-3 hét múlva kirágnak magukat a tápnövény magházából és lepotyognak. A kis lárvák azt várják, hogy *Myrmica* dolgozók (elsősorban a *My. schenki* és a *My. sabuleti*) megtalálják és adoptálják őket (Steiner *et al.*, 2003; Tartally & Csősz, 2004; Schlick-Steiner *et al.*, 2004). Ez a szakasz kritikus a hernyók életében, mert azok az egyedek, amelyek nem kerülnek be a hangyafészkekbe, elpusztulnak. Mivel azonban a tápnövény és a hangyafészkek eloszlása egymástól független random eloszlás, a kipotyogó hernyók nagy részét nem találják meg a hangyadolgozók, és így elpusztulnak (Thomas *et al.*, 1989). További kritikus pont maga az adoptálás, ahol a hernyó kémiai mimikri révén téveszti meg a hangyadolgozót (Schönrogge *et al.*, 2004; Nash *et al.*, 2008). Összességében tehát a kipotyogó hernyóknak csak nagyon kis hányada, alig több mint 1%-a éli túl ezt a lárvális szakaszt és jut el a hangyagazda fészkébe (Nash, Als, & Boomsma, 2011). Így a *M. alcon* populációkban generációról generációra ismétlődik a fiatal lárvák nagyarányú pusztulása. Az obligát mirmekofil életmenet tehát mintegy felerősíti a sztochasztikus hatásokat a szürkés hangyaboglárka populációkban.

Célkitűzés

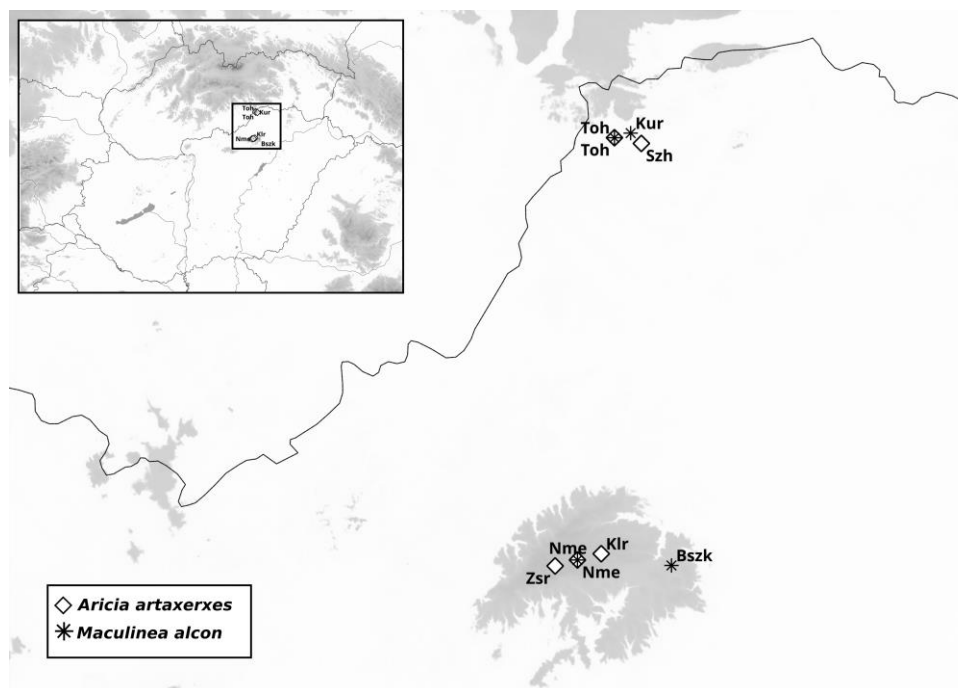
Vizsgálataink célja az volt, hogy elemezzük a mirmekofilia fakultatív és obligát típusának genetikai következményeit. Ennek érdekében összehasonlítottuk az *A. artaxerxes* és a *M. alcon* *cruciata* típusú populációinak genetikai struktúráját. A két faj ökológiai igényei (habitat típus, klimatikus feltételek stb.) rendkívül hasonlóak, ezért populációik sokszor jelennek meg szüntopikusan. Munkánk során abból a feltételezésből indultunk ki, hogy az obligát mirmekofilia következtében a szürkés hangyaboglárka populációkban erős a genetikai sodródás hatása, aminek eredményeként alacsony lesz a variabilitás mértéke, és ezzel párhuzamosan magas lesz a genetikai differenciálódás szintje. Amennyiben pedig az intenzív differenciálódás mellett a migráció mértéke alacsony, akkor a populációk genetikai struktúrája nem mutat földrajzi mintázatot. Ezzel szemben a fakultatív mirmekofiliával jellemezhető hegyi szerecsenboglárka populációkban a genetikai sodródás jelentősen alacsonyabb intenzitású, aminek az lesz a következménye, hogy a populációk variabilitása magas, míg a közöttük megjelenő differenciálódás alacsony szintű lesz. A kevésbé intenzív differenciálódás még mérsékelt migráció mellett is lehetővé teszi a földrajzi mintázat megjelenését a populációk genetikai struktúrájában.

Céljaink megvalósítása érdekében hasonló földrajzi léptékben vettük a két célfaj mintáit. Hazánkban a hegyi szerecsenboglárka egyik alfaja, a bükki szerecsenboglárka (*A. artaxerxes issekutzi* Balogh, 1956) fordul elő két földrajzi régióban: a Bükk-fennsíkon és a Gömör-Tornai-karszton. A szürkés hangyaboglárka *cruciata* ökotípusának hazai elterjedési területe ugyan szélesebb, de ebben a két földrajzi régióban is megtalálható. A genetikai variabilitás mértékét és szerkezetét enzimpolimorfizmus segítségével tanulmányoztuk. A bükki szerecsenboglárka mintákban 19, míg a szürkés hangyaboglárka mintákban 16 enzim lokuszt elemeztünk.

Minták

Mindkét faj mintáit két földrajzi régióban (Bükk-hegység és Gömör-Tornai-karszt) gyűjtöttük 2001 és 2005 között. Az *A. artaxerxes issekutzi* minták összesen 5, míg a *M. alcon* minták 4 populációból származtak (E.1.1.5. ábra és E.1.1.3. függelék). Így a

vizsgálatokban 163 *A. artaxerxes issekutzi*, míg 175 *M. alcon* egyed enzimpolimorfizmusát elemeztük.



E.1.1.5. ábra: Az *A. artaxerxes issekutzi* és a *M. alcon* mintahelyei a Bükk hegységben és a Gömör-Tornai-karszton. Az *A. artaxerxes issekutzi* mintahelyek: Tohonya-völgy (Toh), Szőlőhegy (Szh), Zsidórét (Zsr), Kecskelábrét (Klr), Nagymező (Nme). A *M. alcon* mintahelyek: Tohonya-völgy (Toh), Kuriszlán (Kur), Bükkszentkereszt (Bszk), Nagymező (Nme).

Eredmények és értékelésük

A variabilitás szintje jelentősen magasabb volt az *Aricia*, mint a *Maculinea* populációkban, amit az ANOVA eredményei is alátámasztottak (E.1.1.3. táblázat). Különösen nagy volt az eltérés az átlagos heterozigóta gyakoriságban és a fixálódott allélok arányában. A tapasztalt heterozigóta gyakoriságok között azonban az is okozhat különbséget, hogy a kérdéses faj populációiban milyen mértékű a heterozigóta hiány. A Wrigh-féle F_{IS} index éppen a heterozigóták varható és tényleges gyakoriságának az eltérését mutatja meg. Ez az érték az *Aricia* populációkban $F_{IS}=0,140$, míg a *Maculinea* esetében $F_{IS}=0,255$ volt. A csaknem háromszoros különbség a két faj heterozigótaságának a szintjében tehát legalább részben a heterozigóta hiány mértékében mutatkozó az eltérésre vezethető vissza.

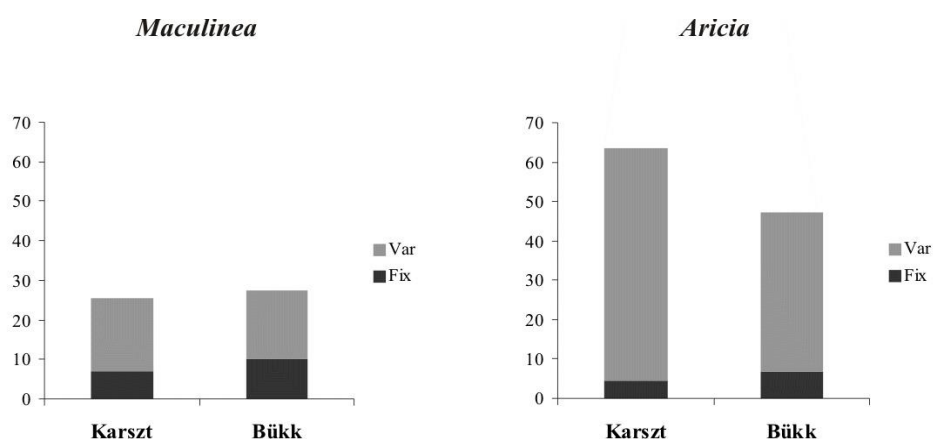
A variabilitás másik jellemző mérőszáma, hogy az allélok milyen hányada fixálódott a vizsgált populációban. A *Maculinea* populációkban a fixálódott alléloknak mind az abszolút száma, mind pedig a relatív gyakorisága magasabb volt, mint az *Aricia* populációkban (E.1.1.6. ábra). Érdekes módon a *Maculinea* populációk esetében nem tapasztaltunk különbséget a bükki és a karszti minták között, míg az *Aricia* esetében mind a populációkban tapasztalt allélok összes száma, mind pedig a fixálódott allélok aránya különbözött a két régióban, vagyis a bükki populációk variabilitása mindkét mérőszám vonatkozásában alacsonyabb volt, mint a karsztiaké (E.1.1.6. ábra).

A populációk genetikai struktúrájának az elemzésében először a differenciálódás mértékét állapítottuk meg. A fixációs indexek csak kismértékű különbséget mutattak a két

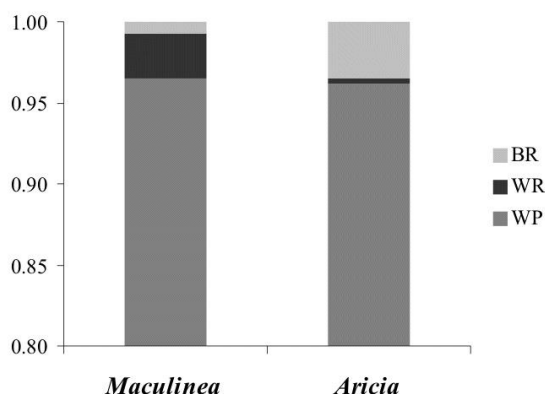
faj között, az *Aricia* populációk esetében $F_{ST}=0,025$, míg a *Maculinea* populációkra $F_{ST}=0,033$ volt. Az F_{ST} értékek közötti viszonylag kis eltéréssel ellentétben az effektív migránsok száma jelentősen különbözött a két fajban: $N_m(Aricia)=13,2$ míg az $N_m(Maculinea)=1,7$. Csaknem egy nagyságrenddel intenzívebb volt tehát a migráció az *Aricia* populációk között, mint a *Maculinea* populációk között.

E.1.1.3. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói a *M.alcon* és az *A. artaxerxes* populációkban. Kur: Kuriszlán; Toh: Tohonya-völgy; Bszk: Bükkszentkereszt; Nme: Nagymező; Szh: Szőlőhegy; Zsr: Zsidó-rét; Klr: Kecskeláb-rét. N: átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság ($N_{alc}=31$; $N_{arx}=13$); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; %Fix: a fixálódott allélok aránya; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ANOVA: a két faj mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség. A kövér betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a két faj között.

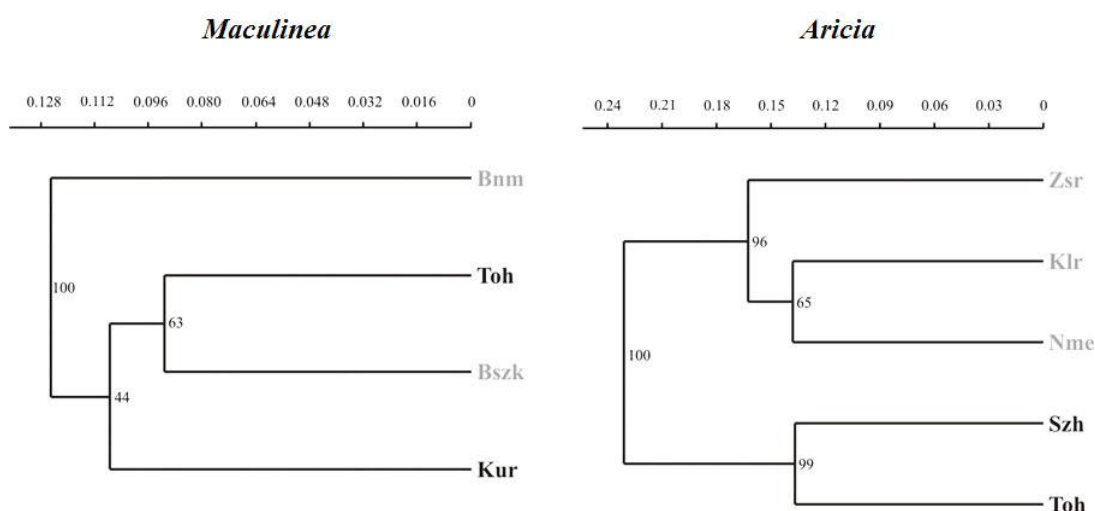
Faj	Pop	N	n_A	Ar	Ho	P_{95}	Fix%
Maculinea	Kur	49.6	1.69	1.66	0.085	0.625	0.286
	Toh	37.6	1.50	1.50	0.063	0.500	0.500
	Bszk	39.3	1.69	1.65	0.107	0.500	0.474
	Nme	46.1	1.69	1.63	0.101	0.313	0.688
	Átlag	43.1	1.64	1.61	0.089	0.484	0.472
Aricia	Toh	45.1	3.21	2.59	0.289	0.737	0.082
	Szh	58.4	3.47	2.63	0.277	0.789	0.061
	Zsr	17.7	2.42	2.31	0.239	0.684	0.128
	Klr	18.8	2.42	2.24	0.246	0.632	0.152
	Nme	19.4	2.58	2.41	0.242	0.632	0.143
	Átlag	31.9	2.82	2.44	0.259	0.695	0.108
$F_{1,8}$		-	22.06	80.33	138.40	10.03	24.85
P		-	0.002	0.000	0.000	0.016	0.002



E.1.1.6. ábra: A populációkban előforduló allélok összes száma és megoszlása az allélok két kategóriája között a *M.alcon* és az *A. artaxerxes* populációkban. Fix: fixálódott allélok ($p=1$); Var: variábilis allélok ($p<1$); Karszt: a Gömör-Tornai-karszt populációi; Bükk: a Bükk-fennsík populációi.



E.1.1.7. ábra: Az AMOVA eredménye a *M.alcon* és az *A. artaxerxes* populációkban. BR: régiók közötti variancia komponens; WR: a régiókon belüli populációk közötti variancia komponens; WP: a populációkon belüli variancia komponens.



E.1.1.8. ábra: A *M.alcon* és az *A. artaxerxes* mintákra szerkesztett UPGMA dendrogram a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap értékek. Szürke betűk: bükki populációk; fekete betűk: karszti populációk. Nme és Bnm: Nagymező; Bszk: Bükkszentkereszt; Zsr: Zsidó-rét; Klr: Kecskeláb-rét; Toh: Tohonya-völgy; Kur: Kuriszlán; Szh: Szőlőhegy.

A fajok genetikai struktúrájának elemzésében a következő lépés az AMOVA volt. Ebben az analízisben azt vizsgáltuk, hogy milyen a genetikai variancia megoszlása a hierarchia különböző szintjein. A régiók közötti és a régiókon belüli variancia komponensek összehasonlítása arra a kérdésre adott választ, hogy van-e a fajok genetikai differenciálódásának regionális mintázata. A *Maculinea* populációk esetében azt tapasztaltuk, hogy a régiókon belüli variancia jelentősen nagyobb volt, mint a régiók közötti (E.1.1.7. ábra). Ennek éppen az ellenkezője volt jellemző az *Aricia* populációkra, vagyis a régiók közötti variancia csaknem egy nagyságrenddel volt nagyobb, mint a régiókon belüli (E.1.1.7. ábra). A regionális mintázat hiánya a *Maculinea* populációk esetében egyértelmű volt a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogramon is; a bükki és a karszti minták ugyanis nem klasztereződtek eltérő ágakba (E.1.1.8. ábra).

Ezzel szemben, az *Aricia* bükki és karszti populációi 100%-os bootstrap támogatottság mellett különültek el (E.1.1.8. ábra).

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy mind a variabilitás szintje, mind pedig a differenciálódás mértéke előzetes hipotézisünknek megfelelően alakult a két fajban. A vizsgált *Aricia* populációkban magasabb volt az enzimpolimorfizmus, mint a *Maculinea* populációkban. Eredményeink jó egyezésben vannak az irodalmi adatokkal. Az *Aricia artaxerxes* és az *A. agestis* variabilitásának az átlagos szintje más vizsgálatokban is magasnak mutatkozott ($n_A=2,14$ és $H=0,187$) (Aagaard *et al.*, 2002; Pecsénye *et al.*, 2007a; Habel & Schmitt, 2009). Ezzel párhuzamosan azt is megállapíthatjuk, hogy más, fakultatív mirmekofil Lycaenidae fajokra is magas szintű polimorfizmus jellemző: a *Polyommatus coridon* 39 populációjában például Schmitt & Seitz (2001) átlagosan 2,68 allélt írt le, vagy a *P. icarus* populációkban 2,98-at (Schmitt, Giessler, & Seitz, 2003). Ugyanakkor a *Maculinea* fajok enzimpolimorfizmusának az átlagos mértéke az egyik legalacsonyabbnak bizonyult ($n_A=1,58$ és $H=0,112$) a Lycaenidae családon belül (Gadeberg & Boomsma, 1997; Figurny-Puchalska, Gadeberg, & Boomsma, 2000; Bereczki *et al.*, 2005; Pecsénye *et al.*, 2007b; Bereczki *et al.*, 2011; Hollós *et al.*, 2012; Pecsénye *et al.*, 2015). Ehhez hasonló szintű polimorfizmust ($n_A=1,77$ és $H=0,120$) tapasztalt Nice & Shapiro (1999) a *Lycaeides idas* és *L. melissa* populációkban, melyek szintén obligát mirmekofil fajok. Ugyanakkor a differenciálódás szintje, még egy viszonylag szűk földrajzi skálán is, kis mértékben alacsonyabb volt az *Aricia*, mint a *Maculinea* populációk között. Ez a különbség a két faj differenciálódásának a mértékében szintén ismert az irodalomban. Az *Aricia artaxerxes* és az *A. agestis* esetében az átlagos fixációs index $F_{ST}=0,036$ volt (Pecsénye *et al.*, 2007a; Habel & Schmitt, 2009). Hasonlóan alacsony szintű differenciálódást tapasztaltak a variábilis *Polyommatus coridon* populációk között, amennyiben európai skálán az $F_{ST}=0,06$ volt (Schmitt & Seitz, 2001), illetve a *P. icarus* esetében ahol az $F_{ST}=0,019$ volt (Schmitt *et al.*, 2003). Ugyanakkor a *Maculinea* fajoknál az átlag $F_{ST}=0,105$ -nek adódott (Figurny-Puchalska *et al.*, 2000; Bereczki *et al.*, 2005; Pecsénye *et al.*, 2007b; Bereczki *et al.*, 2011; Hollós *et al.*, 2012). Bár meg kell jegyezni, hogy a *Maculinea* fajok jelentős szórást mutattak a differenciálódás mértékét tekintve. Szintén magas szintű differenciálódást tapasztalt ($F_{ST}=0,118$) az obligát mirmekofil *Lycaeides idas* populációk között Nice & Shapiro (1999). Úgy tűnik tehát, hogy előzetes hipotézisünk nem csak az általunk vizsgált obligát és fakultatív mirmekofil fajok esetében helytálló, hanem más Lycaenidae fajoknál is igazolódni látszik.

A viszonylag magas szintű differenciálódással párhuzamosan azt is feltételeztük, hogy a *Maculinea* populációk genetikai struktúrája nem mutat majd földrajzi mintázatot. Bár a minták mindkét faj esetében csak két régióból származtak, az eredmények egyértelműen azt támasztották alá, hogy a differenciálódás az *A. artaxerxes* populációk között kifejezett regionális mintázatot mutat, míg ez nem jellemző a *M. alcon* populációkra.

E.1.1.3. A palacknyak hatás genetikai lenyomatának vizsgálata az *Aricia artaxerxes* issekutzi bükk-fennsíki és gömör-tornai-karszti populációiban

Az 1.1.3. fejezet az alábbi cikk alapján készült:

Pecsénye, K., Rácz, R., Bereczki, J. Bátori, E. and Varga, Z. 2014. Loss of genetic variation in declining populations of *Aricia artaxerxes* in Northern Hungary. *Journal of Insect Conservation* **18**: 233–243. (IF: 1.801)

Elméleti háttér

A habitatok fragmentációja és leromlása a populációk szubpopulációs tagolódását és izolációját eredményezte, ami végeredményben a populációk effektív méretének a csökkenéséhez vezetett (Thomas *et al.*, 2001). Amikor ezek a folyamatok felgyorsulnak, és a populációk egyedszámának a csökkenése hirtelen következik be, akkor beszélünk palacknyak hatásról („bottleneck”). Bottleneck során a populációk allélokat veszítenek, és így genetikai variabilitásuk csökken (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf & Luikart, 2009 valamint a bennük található hivatkozások). A variabilitás csökkenése viszont a populációk átlagos rátermettségének a csökkenését vonja maga után (Lacy, 1997; Amos & Balmford, 2001; Larson *et al.*, 2002), aminek pedig az lesz a következménye, hogy korlátozottá válik adaptációs képességük (Lande, 1988). A palacknyak hatásnak tehát természetvédelmi szempontból is nagy jelentősége van a folyamatosan zajló környezeti változások tükrében. A palacknyak hatás elemzéséhez azonban szükség lenne a veszélyeztetett populációk demográfiai változásainak a nyomon követésére. Ugyanakkor a populációk egyedszámának történeti változásait, különösen a genetikai változatosság időbeli alakulását csak ritkán dokumentálták megbízható adatokkal a kutatók (Whitehouse & Harley, 2001). Ezért váltak jelentőssé azok az új statisztikai módszerek, amelyek a jelenlegi populációk genetikai adatai alapján valószínűsítik a palacknyak hatást. Dolgozatomban kettőt emelek ki közülük, amiket mi is használtunk az analízisek során:

(a) Palacknyak hatására megváltozik az allélok eloszlása a különböző frekvencia osztályok között: lecsökken a ritka allélok aránya, míg relatíve megnő az átmeneti gyakoriságú alléloké (Luikart *et al.*, 1998).

(b) A palacknyakon átesett populációkban átmeneti heterozigóta többlet alakul ki, vagyis a heterozigóták Hardy-Weinberg egyensúlyi gyakorisága magasabb lesz, mint az a várható érték, amit az allélszámok alapján lehet becsülni, felhasználva az allélok eloszlását mutáció-drift egyensúlyban (Cornuet & Luikart, 1996b).

A palacknyak effektus vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott markerek a mikroszatellitek, mivel ezek rendkívül varábilisak (pl. az afrikai elefánt esetében Whitehouse & Harley, 2001; az európai vidra populációkban Pertoldi *et al.*, 2001; a sarki rókánál Nyström, Angerbjörn, & Dalén, 2006 stb.). Ugyanakkor néhány lepkefaj esetében, többek között az *Aricia artaxerxes* populációkban, különösen magas szintű enzimpolimorfizmust sikerült kimutatni (Aagaard *et al.*, 2002; Pecsénye *et al.*, 2007a), ami lehetővé teszi ennek a markernek az alkalmazását a palacknyak hatás elemzésére.

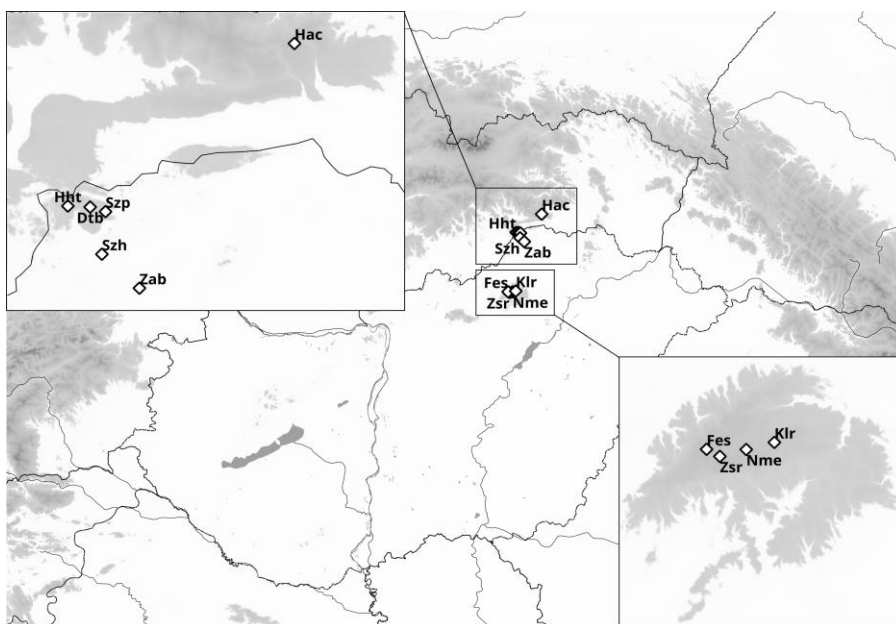
A bükki szerecsenboglárka (*A. artaxerxes issekutzi*) a mérsékelt magas fekvésű, xerofil, rövidfűvű gyepeket preferálja, melyekben lárvális tápnövénye (*Helianthemum* spp.) gyakori, valamint sok bennük a különböző nektárforrásként szolgáló virág. Az ilyen rövidfűvű gyepekben azonban kezelés híján folyamatosan zajlik a szukcesszió, ami megváltoztatja a habitat struktúráját: magas fűvek lepik el (pl. *Calamagrostis* spp.), és megindul a bokrosodás folyamata. A rövidfűvű habitatok fennmaradása tehát csak megfelelő edafikus és mikroklimatikus körülmények között lehetséges, vagy természetvédelmi beavatkozást igényel. A Bükk-fennsík viszonylag nagyobb magasságban található (hozzávetőlegesen 800-850 m), és relatíve nagyobb az éves precipitáció mértéke (≈ 800 mm). Ilyen körülmények között a szukcesszió viszonylag gyors folyamat, vagyis a rövidfűvű gyepek fenntartása csak természetvédelmi beavatkozással lehetséges. A Bükk-fennsíkon azonban a kaszálást az utóbbi években legeltetéssel váltották fel, ami a lovak taposása révén a habitat részleges degradációját eredményezte. Így a korábban nagy

kiterjedésű rövidfűvű gyepek feldarabolódott, és az egyes habitat foltok izolálttá váltak. Ennek megfelelően az itt élő *A. artaxerxes issekutzi* populációk is feldarabolódtak, és néhány habitat folton egyedszámuk jelentősen lecsökkent. Ugyanakkor a Gömör-Tornai-karszton az éves csapadék mennyiség alacsonyabb (kb. 600 mm), ami jelentősen lelassítja a szukcesszió folyamatát. Így a karszton a rövidfűvű gyepek vegetáció természetes körülmények között is fennmaradt, ami azt eredményezte, hogy a Gömör-Tornai-karszton az *A. artaxerxes issekutzi* populációk napjainkban is stabilan, nagy egyedszámban maradtak meg. Ez a szituáció ideális lehetőséget teremt arra, hogy tanulmányozzuk a palacknyak hatás genetikai következményeit a bükki szerezsenboglárka-bükk-fennsíki populációiban.

Célkitűzés

A vizsgálatok célkitűzése tehát az volt, hogy a jelenlegi populációk genetikai adatai alapján, az új statisztikai módszerek alkalmazásával, kimutassuk a közelmúltban lezajlott palacknyak hatást az *A. artaxerxes issekutzi* bükk-fennsíki populációiban összehasonlítva őket a Gömör-Tornai-karszton élő populációkkal. Előzetes eredményeink alapján (Pecsenye *et al.*, 2007a) azt vártuk, hogy a bükki populációk variabilitása, elsősorban az allélok átlagos száma, alacsonyabb lesz, mint a karszti populációké. Ebből adódóan valószínűnek tartottuk, hogy kimutatható lesz az allélok gyakorisági osztályok közötti eloszlásának a különbsége a bükki és a karszti populációk között. A heterozigótákat illetően viszont nem számoltunk jelentősen alacsonyabb gyakorisággal a bükki populációkban a karsztiakhoz képest. Ezért azt vártuk, hogy a palacknyak után jelentkező átmeneti heterozigóta többlet kimutatható lesz a bükk-fennsíki populációkban.

A célkitűzésnek megfelelően, több nagy *A. artaxerxes issekutzi* populációból gyűjtöttünk mintát a Gömör-Tornai-karszton, míg a Bükk-fennsíkon 4 populációból származtak mintáink. A genetikai variabilitás adatait 19 enzim lokusz elemzése révén kaptuk.



E.1.1.9. ábra: Az *A. artaxerxes issekutzi* mintahelyei a Bükk hegységben és a Gömör-Tornai-karszton. A bükki mintahelyek: Nagymező (Nme), Zsidórét (Zsr), Kecskelábrét (Klr) és Fekete-Sár (Fes). A karszti mintahelyek: Hačava (Hac), Haragistya (Hht), Dénes-töbör (Dtb), Szelcepuszta (Szp), Szőlőhegy (Szh) és Zabanyik (Zab).

Minták

Az *A. artaxerxes issekutzi* mintáit két földrajzi régióban (Bükk hegység és Gömör-Tornai-karszt) gyűjtöttük 2002-ben és 2005-ben. A bükki régióban, a két ciklusban összesen 4 mintát gyűjtöttünk (Nme, Klr, Zsr és Fes). Ugyanakkor a karszton mindkét periódusban 6-6 helyen történt mintavétel (Hac, Hht, Dtb, Szp, Szh és Zab) (E.1.1.9. ábra E.1.1.4. Függelék). A 4 bükki populációból 105, míg a 6 karsztiból (összesen 12 minta) 434 egyed enzimpolimorfizmusát elemeztük.

Eredmények és értékelésük

Meglepően magas szintű variabilitást tapasztaltunk a vizsgált *A. artaxerxes issekutzi* populációkban (E.1.1.4. táblázat). Az átlagos allélszám (n_A) erőteljesen függött a mintaszámtól ($F_{1,13}=7.22$, $P=0.019$), ezért két módszert is alkalmaztunk a korrekcióra:

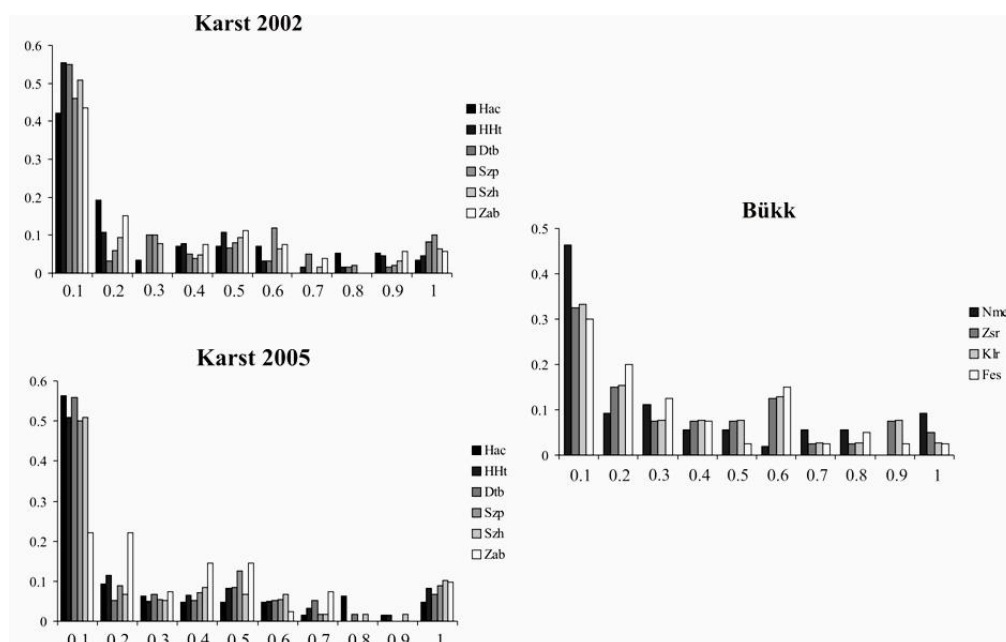
- kidolgoztunk egy, az aktuális mintaszámon alapuló korrekciós egyenletet ($n_{AN}=1.681+1.006 \log_{10}N$);
- megállapítottuk az allélgazdagságot (Ar).

E.1.1.4. táblázat: A polimorfizmus mutatói az *A. artaxerxes issekutzi* populációkban. Átlag: a két régió mintáinak átlaga; Totál: az összes populáció átlaga; ANOVA: a faktoriális ANOVA eredményei; N: átlagos mintaszám; n_A : az allélok vizsgált száma; n_{AN} : az allélok mintaszámra korrigált száma; $\Delta 1$: az allélok vizsgált és mintaszámra korrigált értékének a különbsége ($\Delta 1=n_A-n_{AN}$); Ar : allélgazdagság ($N=11$); $\Delta 2$: az allélok vizsgált számának és az allélgazdagságnak a különbsége ($\Delta 2=n_A-Ar$); He : várható heterozigóta gyakoriság; P : valószínűség. A kövér betűk szignifikáns különbséget jelölnek.

	Régió	N	n_A	n_{AN}	$\Delta 1$	Ar	$\Delta 2$	He
Átlag	Karszt	34.8	3.18	3.21	-0.024	2.66	0.525	0.321
	Bükk	26.0	2.59	3.02	-0.432	2.38	0.208	0.292
	Totál	33.0	3.07	3.17	-	2.60	-	0.316
ANOVA	reg	$F_{1,16}$	14.14	3.56	20.51	18.59	7.13	22.35
		P	0.002	0.077	0	0.001	0.017	0
	year	$F_{1,16}$	1.27	0.01	3.62	0.39	0.68	5.25
		P	0.276	0.944	0.075	0.543	0.421	0.036
	reg*year	$F_{1,16}$	1.09	2.17	0.06	1.01	0.08	0.81
		P	0.312	0.16	0.812	0.33	0.786	0.383

A Gömör-Tornai-karszt populációit szignifikánsan magasabb szintű polimorfizmus jellemezte, mint a bükkiekét kivéve a mintaszámra korrigált allélszámot (E.1.1.4. táblázat). A két régió populációinak variabilitását összehasonlítva a tapasztalt és a korrigált allélszámokon kívül minden populációban megállapítottuk ezek különbségét is: $\Delta 1=n_A-n_{AN}$ és $\Delta 2=n_A-Ar$ (E.1.1.4. táblázat). A $\Delta 1$ alacsony értéke azt jelzi, hogy az egyes minták allélszámaiban tapasztalható különbségek elsősorban az egyedszámok eltéréseire vezethetők vissza, míg a magas $\Delta 1$ további, az allélszámot befolyásoló faktorok jelenlétére utal. Ezért aztán különösen érdekes, hogy a karszti populációk esetében a $\Delta 1$ értéke szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a bükkiekben, miközben magában a mintaszámra korrigált allélszámokban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A bükki populációkban tehát számolhatunk egyéb, az alacsony mintaszámon túlmutató faktorok hatásával is. A $\Delta 2$ értéke

viszont azt mutatja meg, hogy a mintában eredetileg benne lévő allélok mennyire eltérő módon jelennek meg egy kisebb részmintában. Ha tehát a minta ritka allélokat tartalmaz, akkor annak az esélye, hogy ezek bekerülnek egy kis részmintába alacsony, vagyis az A_r és n_A különbsége ($\Delta 2$) nagy lesz. Egyenletes allél eloszlás esetén azonban (kevés a ritka allél) a $\Delta 2$ értéke alacsony lesz. A bükki populációk esetében a $\Delta 2$ szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a karsztikban (E.1.1.4. táblázat), ami egyértelműen mutatja, hogy ezekben a populációkban kevesebb volt a ritka allél.

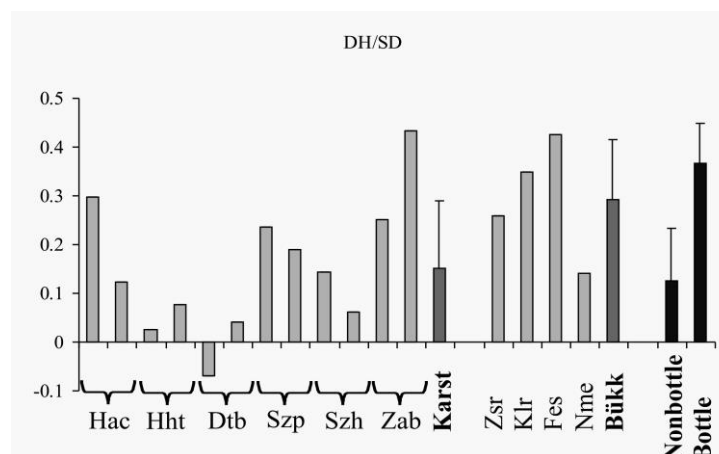


E.1.1.10. ábra: Az összes vizsgált lokusz alléljainak eloszlása a gyakorisági osztályok között az egyes mintákban. A különböző szürke árnyalatok a különböző mintákat reprezentálják.

A két régió között tapasztalt különbségek az allélok számában alátámasztották azt a feltételezést, hogy a bükki populációkban palacknyak hatás érvényesült. A továbbiakban tehát megvizsgáltuk a populációk alléljainak eloszlását a különböző gyakorisági osztályokban. Mutáció-drift egyensúly esetén az allélok várható eloszlása L-alakú, vagyis a ritka allélok ($p < 0,1$) száma a legnagyobb, majd az allélszám exponenciálisan csökken a nagyobb gyakorisági osztályokban. Palacknyak hatására azonban az allélok eloszlása eltolódik a nagyobb gyakorisági osztályok irányába. A zabanyiki populáció (Zab) 2005-ben gyűjtött mintája kivételével minden karszti mintában az allélok L-alakú eloszlását tapasztaltuk a gyakorisági osztályok között (E.1.1.10. ábra). Meglepő módon, a bükki minták közül a Nagymező populáció (Nme) szintén az allélok L-alakú eloszlását mutatta (E.1.1.10. ábra). A többi bükki mintában (Zsr, Klr, Fes) azonban a ritka allélok aránya lecsökkent, és az eloszlás eltolódott a magasabb gyakorisági osztályok irányába (E.1.1.10. ábra). A három bükki és a Zab05 mintában tehát a palacknyak utáni tipikus allél eloszlást tapasztaltuk.

A palacknyak hatás tesztelésének a következő lépésében a heterozigóta többletet elemeztük a vizsgált populációkban, vagyis összehasonlítottuk a heterozigóták Hardy-Weinberg egyensúlyi gyakoriságát azzal a várható értékkel, amit az allélok száma alapján becsültünk. Elsőként az úgynevezett „előjel-tesztet” végeztük el, ahol azt vizsgáltuk, hogy a várható és a valós gyakoriságok eltérése szignifikánsan nagyobb-e mint 0. Ebben az

analízisben csak az egyik bükki populáció (Fes) esetében sikerült szignifikáns heterozigóta többletet kimutatni ($P=0.04$). Az „előjel teszt” azonban nem veszi figyelembe a heterozigóta többlet nagyságát. Ezért a továbbiakban a standardizált heterozigóta többletet vizsgáltuk, ami a várható és a tapasztalt heterozigóta gyakoriság különbségének (DH) és a heterozigóta eloszlás szórásának a hányadosa (DH/SD). Bár a heterozigóta többlet egyik minta esetében sem bizonyult szignifikánsnak, bizonyos tendenciák szembeötlőek voltak. A standardizált heterozigóta többlet a karszti populációkban átlagosan alacsonyabbnak mutatkozott, mint a bükkiekben, bár ez a különbség nem volt szignifikáns (E.1.1.11. ábra). Az allélok eloszlása



E.1.1.11. ábra: Standardizált heterozigóta többlet a 6 karszti és a 4 bükki populációban. A karszti populációk 2-2 oszlopa a két mintavételt reprezentálja. DH: heterozigóta többlet; SD: a kérdéses heterozigóta eloszlás szórása; Karst: a standardizált heterozigóta többlet átlaga a karszti mintákban; Bükk: a standardizált heterozigóta többlet átlaga a bükki mintákban; Bottle és Nonbottle: a standardizált heterozigóta többlet átlaga azokban a mintákban, amelyek az alléloszlás alapján valószínűleg ki voltak téve a palacknyak hatásnak, illetve azokban, amelyek nem.

E.1.1.5. táblázat: Az allélszámok alakulása az *A. artaxerxes issekutzi* azon populációiban, amelyek az allélok eloszlása alapján feltehetően ki voltak téve a palacknyak hatásnak (bot), és azokban, amelyek nem (nonbot). Átlag: a populációk két típusának az átlaga; ANOVA: a faktoriális ANOVA eredményei; n_A : az allélok vizsgált száma; n_{AN} : az allélok mintaszámra korrigált száma; $\Delta 1$: az allélok vizsgált és mintaszámra korrigált értékének a különbsége ($\Delta 1 = n_A - n_{AN}$); Ar: allélgazdagság ($N=11$); $\Delta 2$: az allélok vizsgált számának és az allélgazdagságnak a különbsége ($\Delta 1 = n_A - Ar$). A kövér betűk szignifikáns különbséget jelölnek.

			n_A	n_{AN}	$\Delta 1$	Ar	$\Delta 2$
Átlag		nonbot	3.22	3.25	-0.024	2.66	0.559
		bot	2.45	2.88	-0.431	2.38	0.072
ANOVA	bot	$F_{1,16}$	54.18	30.05	20.51	21.66	11.97
		P	0	0	0	0	0.003
	év	$F_{1,16}$	0.43	2.34	3.62	0.29	1.5
		P	0.52	0.145	0.075	0.597	0.239
	bot*év	$F_{1,16}$	0.02	0.33	0.06	0.76	0.05
		P	0.878	0.575	0.812	0.398	0.826

az egyes mintákban azonban azt jelezte, hogy nem minden bükki populációban érvényesült a palacknyak hatás: a Nme mintában a mutáció-drift egyensúlynak megfelelő L-alakú eloszlást tapasztaltuk. Ugyanakkor a karszti Zab05 mintában az allélok eloszlása palacknyak hatásra utalt. Ennek megfelelően újra csoportosítottuk a mintákat annak megfelelően, hogy melyikről tételezhetjük fel a palacknyak hatás érvényesülését (bot), és melyik lehet mutáció-drift egyensúlyban (non-bot). Az új csoportosításban a Zab05 (Karszt), Zsr, Klr, Fes (Bükk) a „bot”, míg az összes többi a „non-bot” csoportba került. A két csoport között a standardizált heterozigóta többlet szignifikánsan különbözött ($F_{1,14}=16.9$; $0.001 < P < 0.01$): a „bot” csoportban több mint kétszer nagyobb volt, mint a „non bot” csoportban (E.1.1.11. ábra).

Végül összevetettük a polimorfizmus mutatóit az újonnan felállított „bot” és „non bot” csoportok között. Megállapítottuk, hogy minden paraméter (a mintaszámra korrigált allélszám is) szignifikánsan különbözött a két csoport között (E.1.1.5. táblázat).

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy kimutattuk az allélok megoszlásának palacknyak után várható megváltozását 3 bükki és egy karszti mintában. Az átmeneti heterozigóta többletet azonban csak tendenciájában sikerült megállapítani ezekben a populációkban. A standardizált heterozigóta többlet ugyanis egyik mintában sem mutatkozott szignifikánsnak. Ennek a jelenségnek több magyarázata is lehet. A szignifikáns heterozigóta többlet kimutatásának ugyanis számos előfeltétele van (Cornuet & Luikart, 1996b; Luikart & Cornuet, 1998):

- (a) Minimum 30 egyedből álló minta és minimum 20 vizsgált lokusz szükséges. A „bot csoport” mintáiban azonban egyik kritérium sem teljesült maradéktalanul.
- (b) Szimulációs tapasztalatok alapján körvonalaódott, hogy a populációk méretének több nagyságrenddel kell alacsonyabbnak lenni a palacknyak után. Mivel ezeknek a populációknak a múltbéli méretéről csak terepi tapasztalatok alapján van képünk, ezért a palacknyak hatás méretét nem tudtuk megállapítani.
- (c) Végül a teszt akkor sikeres, ha a palacknyak hatás eltelte után néhány generációval történik a mintavétel. A populációméret csökkenése azonban folyamatosan zajlott a mintavételezések során is, vagyis a mintákat nem a palacknyak után, hanem annak folyamatában vettük.

Ugyanakkor eredményeink hatására pontosítani kellett előzetes hipotézisünket. Eredeti feltételezésünk ugyanis az volt, hogy a bükki populációk ki voltak téve a palacknyak hatásnak, míg a karsztiak nem. A palacknyak hatás azonban nem egy földrajzi régióban érvényesül, hanem populáció specifikus jelenség. A Nagymezőn élő *A. artaxerxes issekutzi* populációban nem tapasztaltuk a palacknyak hatás genetikai következményeit. Ez a populáció számos kicsi habitat folton él, melyek között intenzív a migráció. Összességében tehát a Nagymező populáció viszonylag nagynak és stabilnak tekinthető. A másik három bükki populáció esetében azonban (Zsr, Klr és Fes), melyek meglehetősen kis és elszigetelt habitatban élnek, egyértelműek voltak a palacknyak hatás genetikai következményei. Ugyanakkor a Zabanyik populáció 2005-ös mintájában (Gömör-Tornai-karszt) mutatkozott a palacknyak esetén várható genetikai változás. Ez a habitat a karszt régió egyik legmelegebb és legszárazabb területe, ami feltehetően a faj toleranciájának a határán van. Így, aszályos és meleg években a populáció egyedszáma jelentősen csökkenhet. A 2003 és 2005 közötti években a nyári hőmérséklet az átlagosnál magasabb, míg a csapadék mennyisége az átlagosnál kevesebb volt. A Zabanyik populációban tehát valószínűsíthető egy komoly egyedszám csökkenés ebben a periódusban.

E.1.2. Beltenyészet

A beltenyészet során megnő a közös származású allélokat hordozó, vagyis a rokon egyedek gyakorisága a populációban, és így nő a közöttük zajló párosodások valószínűsége is. A rokonok párosodásából pedig olyan utódok is létrejöhetnek, akik homozigóta formában hordozzák a közös származású allélokat (identikus homozigóták) (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf & Luikart, 2009). Mivel a közös származású allélok megjelenése sztochasztikus folyamatokra vezethető vissza (bizonyos értelemben ez is tekinthető egyfajta genetikai mintavételi hibának), ezért gyakoriságuk a populációméret függvénye (Maynard Smith, 1989; Hedrick, 2011). Kis populációkban felerősödnek a véletlen hatások, és így megnő a közös származású allélok aránya is. Ugyanakkor a véletlen hatások intenzitásának a növekedését más tényezők (pl. életmenet jellemzők, szaporodási stratégia stb.) is előidézhetik.

E.1.2.1. A finom genetikai struktúra tanulmányozása az *Euphydryas maturna* egyik nyírségi populációjában

A fejezet a következő cikk alapján készült:

Pecsenye, K., Tóth, A., Bereczki, J., Tóth, J.P., Varga, Z. 2017. A possible genetic basis for vulnerability in *Euphydryas maturna* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Genetica* **145**(2): 151–161. (IF: **1.343**)

Elméleti háttér

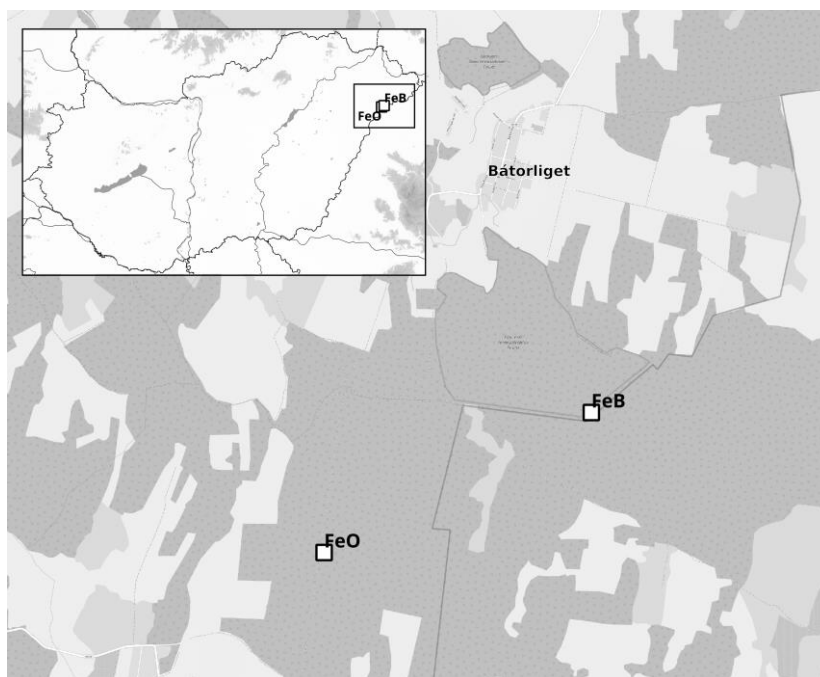
A díszes tarkalepke, *E. maturna* egy regionálisan és szezonálisan oligofág faj (Wahlberg, 2000; Eliasson & Shaw, 2003; Konvička *et al.*, 2005; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2012). A nőstények 1-2 petecsomóban rakják le petéiket különböző fás szárú növények leveleire, hazánkban elsősorban *Fraxinus* és *Ligustrum* fajokra (Weidemann, 1985; Vrabec, Čížek, O., & Beneš, J., 2002b; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2007). A fiatal lárvák fészket szőnek maguk köré, és abban közösen táplálkoznak (Weidemann, 1985; Wahlberg, 2000; Vrabec *et al.*, 2002b; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2012). Nyár végén a lárvák a fészkekben közösen kezdik a diapauzát, először észtiválnak, majd ősszel kezdik a hibernációt. Tavasszal megváltozik a lárvák életmódja: egyrészt szétszélednek és magányosan táplálkoznak; másrészt viszont tápnövényt váltanak, és különböző lágyszárú fajokat (pl. *Plantago*, *Veronica*, *Melampyrum* stb.) fogyasztanak (Wahlberg, 2000; Eliasson & Shaw, 2003; Konvička *et al.*, 2005; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2012). A diapauza előtti lárvák életmódjából adódik, hogy a különböző kedvezőtlen környezeti hatások egyetlen fészkeknek akár az összes lakóját érinthetik. Dolek *et al.* (2007) kimutatták, hogy a fiatal lárvák mortalitása rendkívül magas (átlagosan ~70%), ráadásul nagy a fészkek közötti variancia. Eredményeikből egyúttal az is következik, hogy számos fészkekben az összes hernyó elpusztult. Vrabec & Jindra (1998) egy közép-csehországi habitatban azt figyelték meg, hogy a tüskés címerespoloska (*Picromerus bidens*) addig őrizte a megtalált hernyófészket, amíg az összes hernyót meg nem ette. De a kutatók azt is feljegyezték, hogy egy cserebogár faj (*Melolontha* sp.) egyik egyede a levelet a rajta lévő petecsomóval együtt fogyasztotta el (Wahlberg, 2001; Dolek *et al.*, 2007). A lárvák a különböző parazitodok támadásának is együtt vannak kitéve a hernyófészkekben. Dolek *et al.* (2007) például egy *Cotesia* faj nőstényét figyelték meg a petecsomó körül, aki rögtön belepetézt a kikelő kis lárvákba. A rossz időjárási viszonyok (pl. szeles, viharos idő) szintén együtt pusztítják el egy hernyófészkek összes lakóját (McLaughlin *et al.*, 2002). Ezeknek az intenzív

sztochasztikus hatásoknak a következtében az *E. matura* populációkban jelentős mértékű a fluktuáció (Konvička *et al.*, 2005): rossz években annyira lecsökkenhet az egyedszám, hogy a populáció a kihalás szélére sodródhat, míg szerencsésebb években az egyedszám megsokszorozódik. Ezek az intenzív sztochasztikus hatások nemcsak a genetikai sodródást, hanem a beltenyészetet is felerősítik a populációkban. Hiszen a hernyófészkeknek nemcsak a pusztulása, hanem a benne élő hernyók túlélése is közös. Így a populáció egyedszámának akár számottevő hányada is állhat csupán néhány nőtény túlélő utódaiból.

Célkitűzés

Munkánk célkitűzése az volt, hogy több generáción keresztül elemezzük egy *E. matura* populáció finom genetikai struktúráját. A faj speciális szaporodási stratégiájából kiindulva azt vártuk, hogy a populációt alacsony effektív méret és relatíve magas beltenyészet jellemzi. Ezzel párhuzamosan arra számítottunk, hogy a kis effektív populációméret következtében intenzív lesz a genetikai sodródás, vagyis a generációk között viszonylag magas lesz a genetikai differenciálódás, illetve random változások jelennek meg egyes allélok frekvenciájában. Feltételezésünk szerint az alacsony effektív populációméret hátterében az áll, hogy a nőtények utódainak a túlélése között jelentős különbségek vannak. Ebből adódóan bármely konkrét generációban a populáció számottevő hányadát olyan egyedek teszik ki, melyek egy anyától származnak, tehát teljes, vagy féltestvérek. Ezért a kutatás elsődleges célkitűzése az ilyen testvérek („családok”) keresése volt a díszes tarkalepke egyik nyírségi populációjában.

Céljaink megvalósítása érdekében mintákat vettünk a Fényi-erdő két szubpopulációjából. A két mintavételi terület távolsága mintegy 3,5 km volt. A genetikai variabilitás szintjét az enzimpolimorfizmus vizsgálatával határoztuk meg, a mintákat 17 enzim lokuszon elemeztük.



E.1.2.1. ábra: A Fényi erdő két szubpopulációja. FO: Ömböly; FB: a román magyar határ melletti szubpopuláció (határszél).

Minták

Az *E. matura* mintáit a Fényi erdő két szubpopulációjában (Ömböly és a román magyar határ) gyűjtöttük 4 egymást követő évben 2005, 2006, 2007 és 2008 (E.1.2.1. ábra, E.1.2.1. függelék). A 4 Ömbölyi mintában összesen 173, míg a 4 határszéli mintában 128 egyed enzimpolimorfizmusát elemeztük.

Eredmények és értékelésük

A vizsgált *E. matura* populáció viszonylag alacsony variabilitású volt, a 17 lokusból négyen ugyanaz az allél fixálódott mind a 8 mintában. A 13 polimorf lokusz közül az egyedek átlagosan 2 lokuszon voltak heterozigóták (E.1.2.3. és E.1.2.4. táblázat: H).

Az effektív populációméret meglehetősen alacsonynak adódott, mindkét szubpopulációban $N_e \approx 12$ volt (E.1.2.1. táblázat). Az alacsony effektív populációméretnek megfelelően jelentős mértékű heterozigóta hiány mutatkozott a két szubpopulációban, az F_{IS} átlagos értéke 0,190 volt határszéliben (FB), míg 0,196 az ömbölyiben (FO). Ráadásul a heterozigóta hiány minden mintában (az FO szubpopuláció 2007-es mintája kivételével) következetesen szignifikáns volt (E.1.2.2. táblázat).

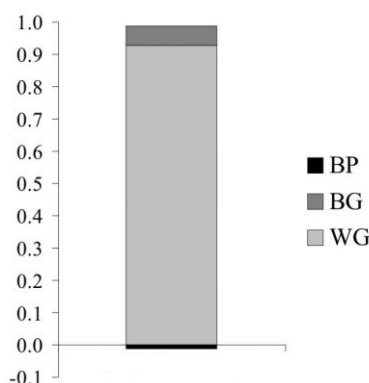
E.1.2.1. táblázat: A Nei és Tajima-féle temporális módszer alapján megállapított effektív populációméret (N_e) a két szubpopulációban. 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum. FB: a magyar-román határon fekvő szubpopuláció; FO: Ömböly szubpopuláció. Gen.: generáció párok; Totál: a generációpárok alapján megállapított értékek harmonikus átlaga.

Gen.	FB			FO		
	N_e	95% CI		N_e	95% CI	
1-2	10.0	4.6	20.9	19.8	6.9	86.3
1-3	15.9	3.9	53.3	12.5	2.9	49.4
1-4	8.8	2.9	21.2	17.5	5.6	52.4
2-3	26.0	10.2	86.0	6.0	0.9	31.5
2-4	12.6	4.3	36.2	13.0	1.5	130.0
3-4	13.4	4.9	53.3	18.9	5.4	Inf.
Totál	12.8			12.4		

E.1.2.2. táblázat: A heterozigóta hiány mértéke a két szubpopuláció mintáiban. F_{IS} : Wright-féle index; P: valószínűség. FB: a magyar-román határon fekvő szubpopuláció; FO: Ömböly szubpopuláció. Totál: a szubpopuláció összes mintájára megállapított F_{IS} érték. A kritikus valószínűség a Bonferroni korrekció után 0.0038.

	FB		FO	
	F_{IS}	P	F_{IS}	P
2005	0.271	0.0007	0.275	0.0007
2006	0.126	0.0028	0.135	0.0036
2007	0.164	0.0007	0.156	0.0153
2008	0.275	0.0014	0.197	0.0014
Totál	0.190	0.0003	0.196	0.0003

A populációk genetikai szerkezetének az elemzése azt mutatta, hogy a Fényi-erdő két szubpopulációjának a totális variáciája legnagyobb részben a szubpopulációk mintáin/generációin belül figyelhető meg. A minták közötti variáciát pedig egyértelműen a szubpopulációkon belül, a minták/generációk közötti komponens határozta meg (E.1.2.2. ábra). Az egyes évek/generációk mintái között tehát jelentős különbséget tapasztaltunk.



E.1.2.2. ábra: Az AMOVA eredménye az *E. matura* két szubpopulációjában. BP: szubpopulációk közötti variancia komponens; BG: a szubpopulációkon belüli minták/generációk közötti variancia komponens; WG: a minták/generációkon belüli variancia komponens.

A továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy milyen az egyes minták finom genetikai struktúrája, vagyis azt a hipotézist próbáltuk igazolni, hogy a minták számottevő hányadát néhány nőtényi utódai alkotják. Ennek érdekében testvéreket/családokat kerestünk mind a 8 mintában. A testvérek keresését azzal kezdtük, hogy mindkét szubpopulációban megnéztük az allélgyakoriságok változását a 4 egymást követő generációban. Olyan allélokot kerestünk, melyeknek frekvenciája véletlenszerűen megnőtt egyik generációról a másikra. Számos ilyen allélt találtunk elsősorban az *Acon*, *Aox*, *Mdh*, *Me* és a *SodB* lokuszokon. Abból indultunk ki, hogy a kérdéses allél gyakoriságának a növekedését az okozhatta, hogy egy hordozó nőtényinek több utódja élt túl, mint a populációs átlag. Így a következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy ezek az allélok milyen kombinációban fordulnak elő más lokuszok alléljeivel, és hogy az így talált specifikus allélkombinációk hány egyedre jellemzőek az egyes mintákban. Nagyszámban találtunk olyan allélkombinációkat, melyekben szerepelt valamelyik hirtelen megnőtt gyakoriságú allél. Ráadásul közülük számos allélkombináció több egyedben is jelen volt. Azt feltételeztük, hogy az ilyen specifikus allélkombinációkat közösen hordozó egyedek között vannak olyanok, amelyek egyetlen nőténytől származtak, tehát testvérek. Ez a megközelítés azonban nem adott lehetőséget a valódi testvérek kiszűrésére a specifikus allélkombinációt közösen hordozó egyedek közül.

Az analízis következő lépésében meghatároztuk az egyedek gamétafázisát az Excoffier–Laval–Balding (ELB) algoritmus segítségével (Excoffier *et al.*, 2003). Az analízisben a gamétafázis megállapítása iteratív módon történik, amelyben fontos szerepet játszik az egyes lokuszok közötti linkage. Mivel nem ismertük az enzim lokuszok közötti kapcsoltsági viszonyokat, ezért mind a 8 mintára 5 adat file-t hoztunk létre, melyekben a lokuszok sorrendjét véletlenszerűen változtattuk meg. Így az analízis eredményeként minden egyedre 5 párhuzamos gamétafázist és azok valószínűségeit kaptuk meg. Az eredmények értékelése során először az 5 párhuzamos gamétafázis valószínűségét átlagoltuk minden egyedre

nézve, majd az egyedi átlagokból minta átlagot számoltunk. A mintákra jellemző átlagos valószínűségi értékek meglehetősen magasak voltak, a határszéli szubpopulációban (FB) 0,786, míg az ömbölyiben (FO) 0,784 (E.1.2.3. és E.1.2.4. táblázatok: P átl.). Azt is megállapítottuk, hogy mekkora azoknak az egyedeknek az aránya, amelyeknél az algoritmus által meghatározott gamétafázis megbízhatatlan, vagyis a valószínűsége alacsonyabb, mint 50%. Ez az arány a határszéli szubpopulációban (FB) 13,1%-nak, míg az ömbölyiben (FO) 15%-nak adódott (E.1.2.3. és E.1.2.4. táblázatok: %P<0,5). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az algoritmus segítségével megállapított gamétafázisok az egyedek többségénél megbízhatóak.

E.1.2.3. táblázat: A gamétafázis rekonstrukció eredményei a magyar-román határon fekvő szubpopulációban (FB). Totál: a minta összes egyedének átlaga; Sib: a feltételezett család egyedeinek átlaga; Sib átl.: a minta összes családjának átlaga; N/sib: a feltételezett családba tartozó egyedek száma; P átl.: a gamétafázis valószínűségének átlaga; %P<0,5: azoknak az egyedeknek az aránya, akiknél a gamétafázis valószínűsége 50%-nál alacsonyabb; H: az egyedek hetrozigóta lokuszainak átlagos száma.

		N/sib	P átl.	%P<0.5	H
2005	Totál	-	0.814	0.080	1.88
	Sib FB5-A3	2	0.835	0	2.50
	FB5-A5	2	0.863	0	2.00
	FB5-G2	5	0.876	0	1.60
	FB5-G3	3	0.908	0	1.67
	Sib átl.	3.00	0.870	0	1.94
2006	Totál	-	0.720	0.182	2.09
	Sib FB6-A3	4	0.720	0	2.00
	FB6-G1	4	0.927	0	1.50
	FB6-G6	5	0.791	0	2.40
	Sib átl.	4.67	0.813	0	1.97
2007	Totál	-	0.791	0.086	1.95
	Sib FB7-A6	4	0.794	0	1.75
	FB7-A7	3	0.943	0	1.00
	Sib átl.	3.50	0.869	0	1.38
2008	Totál	-	0.819	0.176	1.95
	Sib FB8-A2	3	0.921	0	1.67
	Sib átl.	3.00	0.921	0	1.67
	Totál átl.	-	0.786	0.131	1.97
	Sib 10	3.50	0.868	0	1.74

Az elemzést azzal folytattuk, hogy kerestük azokat az azonos gamétafázisú allélkombinációkat (lényegében haplotípusokat), amelyek több egyedben is előfordultak. A továbbiakban ellenőriztük az ilyen, közös haplotípusokat hordozó egyedek gamétafázisát az 5 párhuzamos futásban. Csak azokat az egyedeket tekintettük valószínű testvéreknek, amelyeknél a kérdéses allélkombináció mind az öt futásban azonos gamétafázisban volt. A testvérek keresésének utolsó fázisában pedig összehasonlítottuk az így kiválasztott egyedek

gamétafázisának átlagos valószínűségét az adott minta átlagával. A végső szűrés után azokat az egyedeket fogadtuk el valószínű testvéreknek, amelyeknél az egyedi átlag magasabb volt, mint a mintaátlag.

E.1.2.4. táblázat: A gamétafázis rekonstrukció eredményei az Ömböly szubpopulációban (FO). Totál: a minta összes egyedének átlaga; Sib: a feltételezett család egyedeinek átlaga; Sib átl.: a minta összes családjának átlaga; N/sib: a feltételezett családba tartozó egyedek száma; P átl.: a gamétafázis valószínűségének átlaga; %P<0.5: azoknak az egyedeknek az aránya, akiknél a gamétafázis valószínűsége 50%-nál alacsonyabb; H: az egyedek hetrozigóta lokuszainak átlagos száma.

		N/sib	P átl.	%P<0.5	H
2005	Totál -		0.772	0.158	2.05
	Sib FO5-G1	2	0.881	0	1.50
	Sib átl.	2.00	0.881	0	1.50
2006	Totál -		0.782	0.116	2.30
	Sib FO6-A3	3	0.976	0	1.33
	FO6-G1	2	0.896	0	1.50
	FO6-G2	3	0.890	0	2.00
	Sib átl.	2.67	0.921	0	1.61
2007	Totál -		0.846	0.174	1.65
	Sib FO7-N	3	0.970	0	1.00
	FO7-A1	3	0.979	0	1.33
	Sib átl.	3.00	0.974	0	1.17
2008	Totál -		0.734	0.150	2.25
	Sib FO8-G3	2	1	0	1.00
	Sib átl.	2.00	1.000	0	1.00
	Totál átl. -		0.784	0.150	2.06
	Sib 7	2.57	0.942	0	1.38

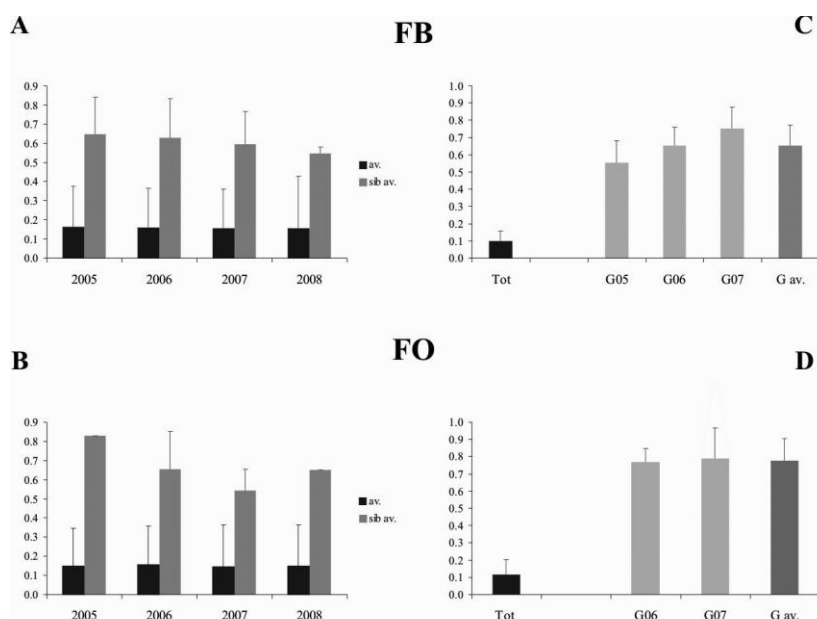
A szűrési folyamat eredményeként tíz lehetséges családot detektáltunk a határszéli (FB), míg hetet az ömbölyi (FO) szubpopulációban (E.1.2.3. és E.1.2.4. táblázat, valamint az E.1.2.2. és az E.1.2.3. függelék). A családok száma és mérete változatos volt a 8 mintában (E.1.2.3. és E.1.2.4. táblázat). A legtöbb családot a határszéli populáció 2005-ös mintájában találtuk, és egyúttal a legnépesebb családok is ebben a szubpopulációban jelentek meg (E.1.2.3. táblázat: FB5-G2 és FB6-G6). A családok átlagos mérete 3,46 volt a határszéli (FB) szubpopulációban, míg 2,57 az ömbölyiben (FO) (E.1.2.2. és E.1.2.3. függelék). Ez egyúttal azt is jelenti, hogy egy család átlagosan a minta 9%-át tette ki (E.1.2.2. és E.1.2.3. függelék). A feltételezett családokra jellemző volt egy-egy ritka allél jelenléte, melyek közül néhány mindkét szubpopuláció családjában előfordult (pl. a *Me1* az FB5-G2, FB6-G6, FB7-A7 és FB8-A2 valamint az FO6-G1 családokban) (E.1.2.4. ábra, valamint E.1.2.2. és E.1.2.3. függelék). Egyes családok azonban szubpopuláció specifikus ritka allélt hordoztak, mint az *Mdh4* allél az FB6-A3 családban vagy a *Lap2* allél az FO6-A3-ban (E.1.2.5. ábra, valamint E.1.2.2. és E.1.2.3. függelék). Néhány ritka allél esetében azt tapasztaltuk (pl. a *Me1* allél a határszéli szubpopulációban), hogy több generációban is megjelennek olyan családok, amelyek hordozzák őket. Ezért összehasonlítottuk az ilyen családokban található haplotípusokat, és megállapítottuk, hogy különböző allélokat tartalmaztak a többi 12

polimorf lokuszon. Így feltételeztük, hogy ezek a családok egymástól függetlenül jelentek meg az egymást követő generációkban. Az azonos generációban talált családok haplotípusait összevetve azt a következtetést vontuk le, hogy az esetek többségében 2 család is származhatott egyetlen nőténnytől. Ehhez csupán annak a feltételnek kellett teljesülnie, hogy a kérdéses nőtény 3 lokuszon volt heterozigóta, ami az egyedek 19%-ra igaz volt. Ebben az esetben viszont egy nőtény utódai a mintának akár a 18-20%-t is kitehették.

Annak alátámasztására, hogy a feltételezett családok valóban egy szülőtől származó testvérek megállapítottuk az egyedek közötti rokonság mértékét. Azt vizsgáltuk, hogy a családok tagjainak rokonsági foka milyen mértékben tér el az egész mintára megállapított értéktől. Két módszert alkalmaztunk:

- (a) minden mintán belül meghatároztuk az egyedpárok közötti rokonsági fokokat, majd külön-külön átlagoltuk azokat az egész mintára és az egyes családok tagjaira nézve;
- (b) átlagos rokonsági fokot számoltunk az FSTAT program segítségével egyrészt az egész mintára, másrészt pedig a családokra.

Mindkét analízis eredménye azt mutatta, hogy a mintákon belüli átlagos rokonsági fok jelentősen alacsonyabb volt, mint az egyes családokon belüli érték (E.1.2.3. ábra). Mi több, a családokon belüli r értékek azt jelezték, hogy az egyedek teljes testvérek ($r \geq 0,5$).



E.1.2.3. ábra: A rokonsági fok mértéke az *E. matura* két szubpopulációjának mintáiban. FB: a magyar-román határon fekvő szubpopuláció; FO: Ömböly szubpopuláció.

A és B: Az MLRELATE program segítségével meghatározott páronkénti rokonsági fokok átlaga. Av. (sötét): a teljes minta átlaga; sib av. (szürke): a feltételezett családok tagjainak átlaga.

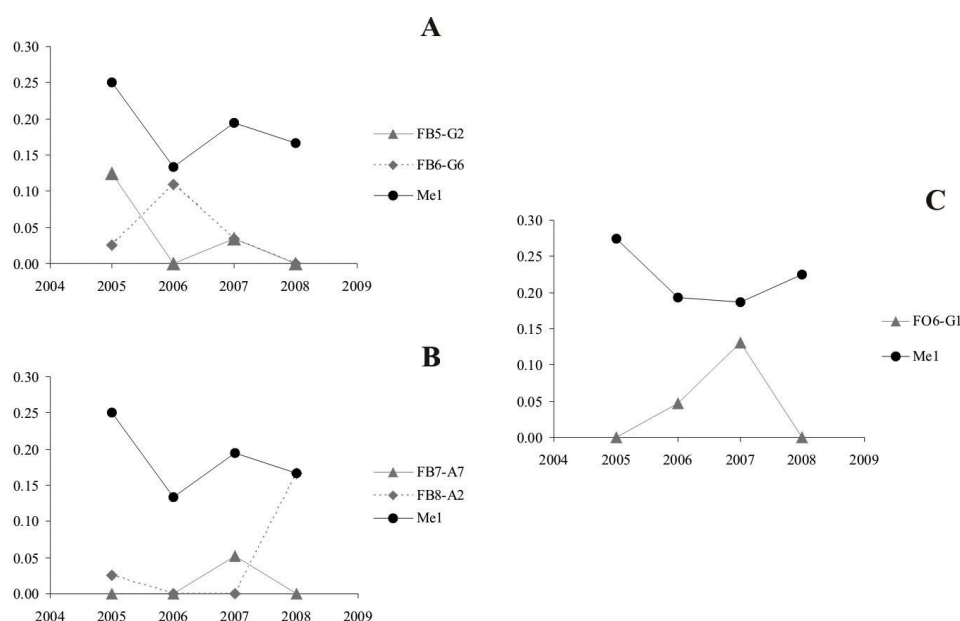
C és D: Az FSTAT program segítségével meghatározott átlagos rokonsági fok. Tot (sötét): a szubpopuláció 4 mintájának átlaga; G05-G07 (FB) és a G06-G07 (FO) (világos szürke): a kérdéses évben megjelenő családok átlagos rokonsági foka; G av. (sötétebb szürke): A szubpopuláció összes feltételezett családjának az átlagos rokonsági foka.

Végül pedig azt vizsgáltuk, hogy egy adott generációban detektált családot jellemző allélkombináció milyen gyakorisággal volt jelen azonos gamétafázisban az előző, illetve a következő generációkban. Ha ugyanis munkahipotézisünk igaz, és a kérdéses haplotípust testvérek hordozzák, akkor annak frekvenciája abban a generációban nő meg (esetleg csak

abban a generációban jelenik meg) amikor magát a családot azonosítottuk. Ezért minden család esetében kerestük a rá jellemző haplotípust az összes többi generációban. Ebben az esetben is úgy jártunk el, mint a családok azonosításánál, vagyis a keresett allélkombinációt hordozó egyedek csak akkor fogadtuk el, mint haplotípust, ha mind az öt párhuzamos futásban azonos gamétafázisban hordozta a kérdéses allélkombinációt. Ezek után minden generációban meghatároztuk a családokra jellemző haplotípust hordozó egyedek gyakoriságát. A legtöbb esetben azt tapasztaltuk, hogy a családokra jellemző haplotípusok abban a generációban jelentek meg, vagy gyakoriságuk akkor nőtt meg jelentősen, amikor detektáltuk őket (E.1.2.4. és E.1.2.5. ábrák).

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy minden előzetes hipotézisünk helytállónak bizonyult.

- Igazolódott az a feltevés, hogy a szubpopulációk effektív populációmérete alacsony, és jelentős mértékű bennük a beltenyészet.
- Feltártuk, hogy a generációk közötti genetikai különbségek messze meghaladják a két szubpopuláció közötti differenciálódás nagyságát, ami erőteljes drift hatásra utal.
- Minden mintában sikerült kimutatni, a családok (teljes testvérek) jelenlétét.



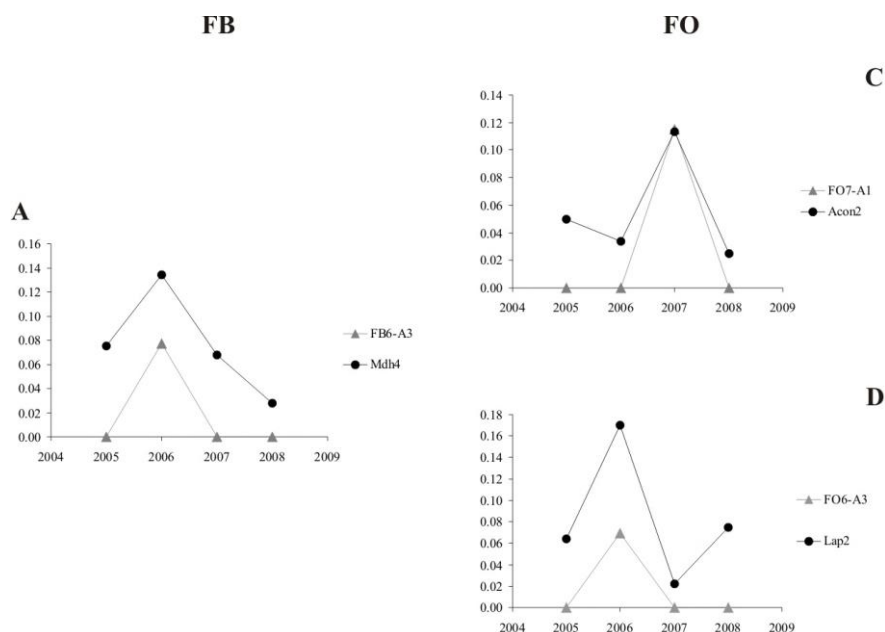
E.1.2.4. ábra: A *Me1* ritka allélt hordozó feltételezett családok gyakorisága a két szubpopuláció 4 egymást követő generációjában. A fekete pontok a *Me1* allél gyakoriságát mutatják. A szürke szimbólumok az egyes családok gyakoriságait jelzik.

A és B: A négy feltételezett család gyakorisága a magyar-román határon lévő szubpopulációban (FB).

C: A feltételezett család gyakorisága az Önböly szubpopulációban (FO).

Ezt a három pontot összekapcsolva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az *E. maturna* populációk méretének fluktuációja és a genetikai sodródás intenzív hatása a nőstények speciális reprodukzív stratégiájára vezethető vissza. A hernyók közös táplálkozása és hibernációja azt eredményezi, hogy a lárvális túlélés varianciájának egy jelentős hányada nem az egyedek, hanem a hernyófészkek (családok) között jelentkezik (Vrabec & Jindra,

1998). Ebből adódik, hogy a következő generáció egyedeinek akár számottevő hányada is származhat néhány nőténytől, ami intenzív beltenyészetet okoz, és az egyedek között magas rokonsági fokot eredményez. Mindezek következményeként pedig alacsony lesz a populációk effektív mérete.



E.1.2.5. ábra: A család-specifikus ritka allélt hordozó feltételezett családok gyakorisága a két szubpopuláció 4 egymást követő generációjában. A fekete pontok a kérdéses család-specifikus allél gyakoriságát mutatják. A szürke szimbólumok az egyes családok gyakoriságait jelzik.

A: A *Mdh4* allélt hordozó feltételezett család gyakorisága a magyar-román határon lévő szubpopulációban (FB).

B: Az *Acon2* allélt hordozó feltételezett család gyakorisága az Ömböly szubpopulációban (FO).

C: A *Lap2* allélt hordozó feltételezett család gyakorisága az Ömböly szubpopulációban (FO).

E.2. A variabilitás mértékére és szerkezetére ható ökológiai faktorok

A populációk genetikai struktúráját alapvetően a genetikai differenciálódás és a vele ellentétes hatású génáramlás határozza meg (lásd: Hartl, 1988; Futuyma, 2006; Hedrick, 2011). A genetikai differenciálódás hátterében azonban a genetikai sodródás mellett számolni kell a szelekciós hatásokkal is. A differenciálódást erősítő szelekciós hatások leginkább akkor jelennek meg, amikor a populációk eltérő környezetben élnek, és különböző ökológiai faktoroknak vannak kitéve, valamint nem jelentős közöttük a génáramlás. Ilyen esetekben a szelekció hatása diverzifikáló, aminek eredményeként az egyes populációk specifikusan adaptálódnak lokális környezetükhöz. A diverzifikáló szelekció és a genetikai sodródás differenciálódást erősítő hatása között azonban van egy jelentős különbség. Amíg a genetikai sodródás hatása bármely génen érvényesülhet, addig a diverzifikáló szelekció hatása lokusz specifikus, vagyis csak a szelekciónak kitett lokuszokon eredményez a vártnál magasabb szintű differenciálódást (Stinchcombe & Hoekstra, 2007). Diverzifikáló szelekció hatására tehát az eltérő habitatokban élő populációk genetikai állománya megváltozik, és kialakul a lokális adaptáció. Nosil, Funk, & Ortiz-Barrientos (2009) megállapították, hogy a lokuszok mintegy 5-10%-nál tapasztalható a neutrális folyamatok alapján vártnál magasabb szintű differenciálódás. Az ökológiai

faktorok, melyek diverzifikáló szelekciót előidézhetnek elő nagyon változatosak: a növényevő rovarok esetében ilyen lehet a specifikus tápnövény (pl. a *Timema* fajoknál Nosil, 2007; a *Neochlamisus bebbianae* levélbogár esetében Egan, Nosil, & Funk, 2008 stb.), vagy a habitatok eltérő jellege (pl. az *Aricia agestis* esetében Buckley, Butlin, & Bridle, 2012; a *Melitaea cinxia* esetében Haag *et al.*, 2005 stb.).

E.2.1. A lokális adaptáció vizsgálata a *Maculineaalcon* és *M. teleius* populációkban

A 2.1. fejezet a következő cikk alapján készült:

Pecsenye, K., Bereczki, J., Juhász, E., Tartally, A., Varga, Z. 2015. Contrasting genetic structure in cuckoo and predatory *Maculinea* butterflies. *Conservation Genetics* **16**: 939–954. (IF: 2.185)

Elméleti háttér

A *Maculinea* fajok életsiklusa rendkívül speciális, amennyiben lárvális túlélésüket alapvetően két egymáshoz csatlakozó (szekvenciális) környezeti forrás határozza meg: a specifikus tápnövény és a hangyagazda. Az obligát mirmekofília, ami a genusz minden fajára jellemző, jelentős kockázati tényező a fiatal lárvák számára. Mivel egy habitatban a tápnövény és a hangyafészkek eloszlása egymástól függetlenül random (Thomas & Elmes, 2001; Fürst & Nash, 2010), a virágokból kipotyogó hernyóknak a túlnyomó többsége elpusztul, mert nem találják meg őket a *Myrmica* dolgozók. Így intenzív sztochasztikus hatások érvényesülnek valamennyi *Maculinea* faj populációiban, vagyis erősen ki vannak téve a genetikai sodródásnak. Mivel ezek a hatások lényegében minden *Maculinea* faj esetében hasonlóak, ezért populációikban alapvetően hasonló genetikai struktúrát várunk. Ugyanakkor az alapvető hasonlóságok mellett kisebb nagyobb különbségek is megjelennek az egyes fajok életmenetében.

A Kárpát-medence nedves rétjein három hangyaboglárka faj fordulhat elő: a *M.alcon* *pneumonanthe* ökotípusa, a *M. teleius* és a *M. nausithous*. A *M. teleius* és a *M.alcon* ökológiai igényeit összehasonlítva két jellegzetes különbséget kell megemlíteni.

(a) A vérfű hangyaboglárka (*M. teleius*) specifikus tápnövénye a *Sanguisorba officinalis* (Thomas, 1984; Nowicki *et al.*, 2007), ami nagy tömegben és többé-kevésbé egyenletes borítással jelenik meg a habitatban. Ráadásul a *M. teleius* nőstények egy virágfejbe egy petét tojnak (Elmes & Thomas, 1987; Figurny & Woyciechowski, 1998; Thomas & Elmes, 1998; Ebert & Rennwald, 1991), így feltételezhetjük, hogy a peték többé-kevésbé egyenletesen oszlanak el a habitatban. Ugyanakkor a szürkés hangyaboglárka (*M.alcon*) *pneumonanthe* ökotípusának a tápnövénye a *Gentiana pneumonanthe* (Sielezniew *et al.*, 2002; Fürst & Nash, 2010; Czekes *et al.*, 2014), ami egyenetlen, gyakran foltos eloszlást mutat a habitatban. Mi több a nőstények számos petét raknak egy tápnövényre (Nowicki *et al.*, 2007; Körösi *et al.*, 2008). A *M.alcon* peték eloszlása tehát meglehetősen egyenlőtlen a habitatokban. A peték eloszlásának az a jelentősége, hogy befolyásolhatják annak az esélyét, hogy a kipotyogó hernyókat megtalálják a hangyadolgozók. Hosszú vita volt ugyan a szakirodalomban arról, hogy a petéző nőstények érzékelik-e a hangyagazda fészkeit a habitatban (pl. Dyck *et al.*, 2000 versus Thomas & Elmes, 2001), de jelenleg az a valószínűbb hipotézis, miszerint a nőstények egyértelműen a tápnövény jellemzői alapján választják ki a petézésre alkalmas növényeket (Fürst & Nash, 2010). Ebben az esetben viszont egy egyenletes borítású tápnövény több lárvának nyújt esélyt arra, hogy felfedezzék a hangyadolgozók, mint egy foltos eloszlású. Ráadásul a *M.alcon* a Kárpát-medencében maximum két hangyagazdát használ egy adott habitatban (Tartally *et al.*, 2008), míg a *M.*

teleius szinte minden, a habitatban előforduló *Myrmica* fajt parazitál (Tartally & Varga, 2008). A sztochasztikus hatások tehát a *M. teleius* populációkban feltehetően kevésbé intenzívek, mint a *M. alcon* populációkban.

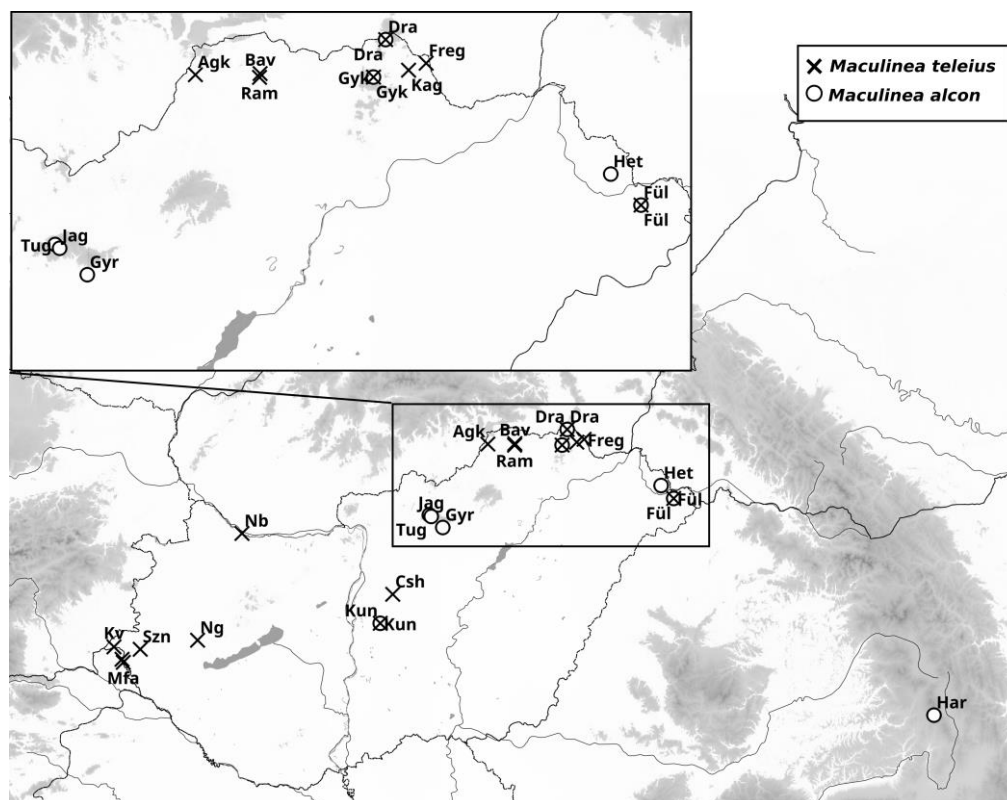
(b) A *M. alcon* hernyók kakukk-stratégiát folytatnak a hangyagazda fészkeiben, vagyis a dolgozók etetik és gondozzák őket (Hochberg *et al.*, 1994; Thomas & Elmes, 1998; Barbero *et al.*, 2009). Ezzel szemben a *M. teleius* lárvák ragadozók (Thomas & Wardlaw, 1992; Witek *et al.*, 2010), azaz a hangyagazda petéivel és lárváival táplálkoznak. A lárvák fészekbeli stratégiája két szempontból is jelentős. Egyrészt a fészkek eltartó képessége eltér a két stratégia esetében. Amíg egy hangyafészekben akár egy tucat, vagy még több kakukk-stratégiájú hernyó is képes kifejlődni (Als, Nash, & Boomsma, 2002; Tartally *et al.*, 2008), addig a fészkek eltartó képessége jóval alacsonyabb a predátor hernyók tekintetében (Thomas & Wardlaw, 1992). A *Maculinea* hernyók kémiai mimikri révén tévesztik meg a hangyagazdát, ami abban nyilvánul meg, hogy felszíni szénhidrogénjeik összetétele hasonló a hangya lárvákéhoz (Schönrogge *et al.*, 2004; Schlick-Steiner *et al.*, 2004). Feltételezhető, hogy a hernyók mimikrijének a pontossága is különbözik a két stratégia esetében; amennyiben a kakukk-stratégiájú hernyók folyamatosan ki vannak téve a dolgozók „tesztelésének” a gondozás és az etetés során. A megtévesztéshez tehát nagyon precíz mimikri szükséges a kakukk-stratégia esetében. Ezzel szemben a predátor hernyók mimikrijének a tesztelése kevésbé alapos. Számos tanulmány dokumentálta, hogy a hangyalárvákkal való hasonlóság a felszíni szénhidrogének kémiai összetételében nagyobb a kakukk-stratégiát folytató, mint a predátor lárvák esetében (pl. (Schönrogge *et al.*, 2004; Schlick-Steiner *et al.*, 2004; Nash *et al.*, 2008). Ennek a jelenségnek viszont az a következménye, hogy a lokális adaptációnak nagyobb jelentősége lehet a *M. alcon*, mint a *M. teleius* populációkban.

Célkitűzések

A két faj életmenetének különbségeiből kiindulva az volt a célunk, hogy megkeressük ezeknek a különbségeknek a genetikai lenyomatait populációik variabilitásának a struktúrájában. Két alternatív munkahipotézisünk volt:

1. A populációk genetikai struktúráját alapvetően a sztochasztikus folyamatok következményeként fellépő genetikai sodródás határozza meg. Mivel a genetikai sodródás várhatóan a *M. alcon* populációkban erősebb a *M. teleius*-hoz képest, ezért a szürkés hangyaboglárka populációiban alacsonyabb variabilitásra és ezzel párhuzamosan magasabb szintű differenciálódásra számítottunk, mint a vérfű hangyaboglárka populációkban. Azt is feltételeztük, hogy az intenzív differenciálódás következményeként egyik faj esetében sem tapasztalunk majd földrajzi mintázatot a genetikai variabilitás szerkezetében.
2. A populációk genetikai struktúrája alapvetően annak a lenyomatát tükrözi, hogy a lárvák stratégiája eltérő a hangyagazda fészkeiben. Vagyis a mimikri precizitásában mutatkozó különbségek a lokális adaptációban, lényegében a diverzifikáló szelekció intenzitásában nyilvánulnak meg. Ebből adódóan azt vártuk, hogy határozott mintázat jelenik meg a kakukk-stratégiával jellemezhető szürkés hangyaboglárka populációk genetikai szerkezetében, nevezetesen ökológiai differenciálódást tapasztalunk majd a különböző hangyagazdát használó populációk között.

A hipotézisek tesztelésére a Kárpát-medence több *M. alcon* (pneumonanthé ökotípus) és *M. teleius* populációjában elemeztük az enzimpolimorfizmus szintjét és szerkezetét. Mindkét faj mintáiban 16 enzim lokuszt vizsgáltunk.



E.2.1.1. ábra: A *M. alcon* (pneumonanthe ökotípus) és a *M. teleius* mintái a Kárpát-medencében. *M. alcon* mintahelyek: Drahos-rét (Dra), Gyertyánkút (Gyk), Fülesd (Fül), Hetefejércse (Het), Gyilkos-rét (Gyr), Jáger-rét (Jag), Tugár-rét (Tug), Kunpeszér (Kun) és Hargita (Har). *M. teleius* mintahelyek: Drahos-rét (Dra), Gyertyánkút (Gyk), Kovácsvágás (Kov), Felsőregmec (Freg), Aggtelek (Agk), Barakonyi-völgy (Bav), Rakaca-meszes (Ram), Fülesd (Fül), Kunpeszér (Kun), Csévharaszt (Csh), Nagybjacs (Nb), Szaknyér (Szn), Nagygörbő (Ng), Magyarszombatfa (Mfa), Kétvölgy (Kv) és Szomoróc (Szn).

Minták

A *M. alcon* pneumonanthe ökotípusának a mintáit a Kárpát-medence 5 földrajzi régiójának (Zemplén, Mátra, Kiskunság, Szatmár-Beregi-sík és Erdély) 9 populációjából gyűjtöttük; míg a *M. teleius* minták 6 régió (Zemplén, Szatmár-Beregi-sík, Gömör-Tornai-karszt, Cserehát, Közép-Magyarország és Nyugat-Magyarország) 16 populációjából származtak (E.2.1.1. ábra, E.2.1.1. függelék). A minták gyűjtése 2000 és 2004 között történt. A 9 *M. alcon* mintában összesen 365, a 16 *M. teleius* mintában pedig 771 egyed enzimpolimorfizmusát elemeztük.

Eredmények és értékelésük

Az enzimpolimorfizmus szintje mindkét faj esetében viszonylag alacsony volt (E.2.1.1. táblázat, E.2.1.2. függelék). Ennek ellenére a *M. teleius* populációkban, az átlagos heterozigóta gyakoriság kivételével, minden mutató szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, mint a *M. alcon* populációkban (E.2.1.1. táblázat: ANOVA).

A populációk genetikai struktúrájának a tanulmányozása során az első lépés a differenciálódás mértékének a megállapítása volt a két fajban. Három paramétert használtunk: Wright-féle fixációs indexet (F_{ST}), az allélfrekvencia adatok alapján számított

E.2.1.1. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói a *M.alcon* és a *M. teleius* vizsgált populációiban. N: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (*M. alc.*: N=15; *M. tel.*: N=9); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ANOVA: a két faj mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség. A kövér betűk szignifikáns különbséget jeleznek a fajok között

	Fajok	N	n_A	Ar	Ho	P_{95}
	<i>M. alc.</i>	41.50	1.51	1.43	0.097	0.382
	<i>M. tel.</i>	46.83	1.79	1.53	0.087	0.617
ANOVA	$F_{1,23}$	-	19.86	5.87	0.79	37.06
	P	-	0.000	0.024	0.382	0.000

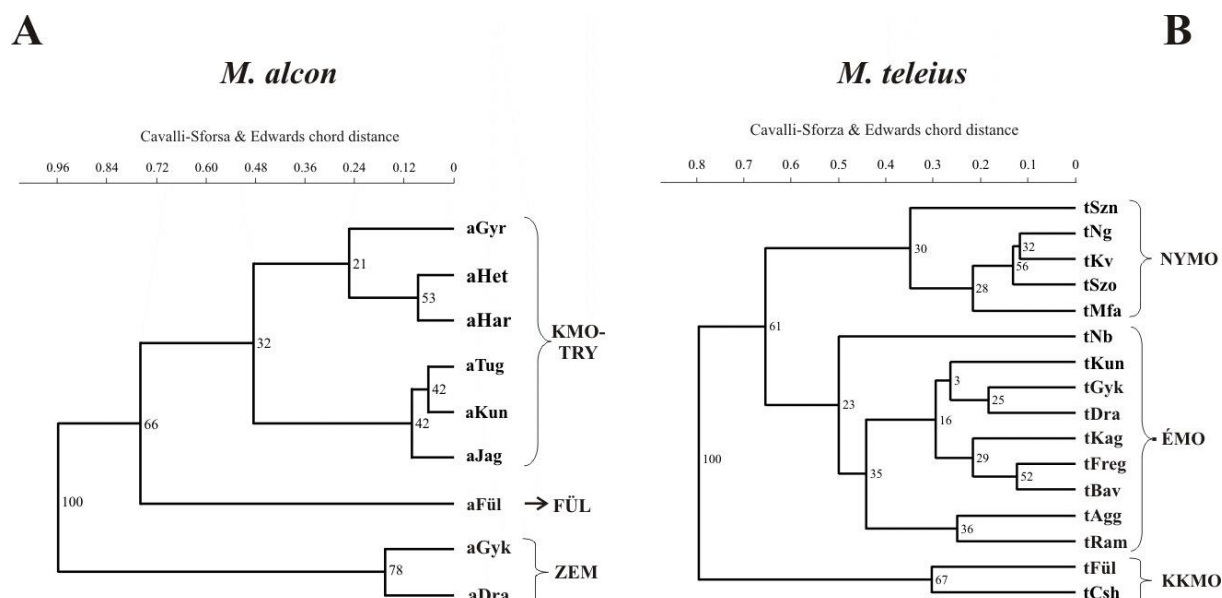
E.2.1.2. táblázat: A differenciálódás mérőszámai a *M.alcon* és a *M. teleius* vizsgált populációi között. n: a populációk száma; F_{ST} : fixációs index; D: Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlaga; Nm: a migránsok effektív száma. Szignifikancia szint: ** 0,05>P>0,01.

	n	F_{ST}	D	Nm
<i>M. alc.</i>	9	0.161**	0.212	2.1
<i>M. tel.</i>	16	0.056**	0.127	11.4

Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlagát (D), és a populációk specifikus alléljai alapján megállapított effektív migráns számot (Nm). A mérőszámok egyértelműen azt mutatták, hogy a differenciálódás mértéke magasabb a *M.alcon*, mint a *M. teleius* populációk között (E.2.1.2. táblázat).

A továbbiakban Bayes-féle klaszteranalízist végeztünk a fajok egyedeinek sok lokuszos genotípusai alapján. Az eredmények azt mutatták, hogy a *M.alcon* populációkban a genetikai klaszterek legvalószínűbb száma K=3, míg a *M. teleius* populációkban K=5 (E.2.1.3. függelék). A továbbiakban a klaszterek genetikai összetételét hasonlítottuk össze, és meghatároztuk a rájuk jellemző, specifikus allélokat. Minkét faj valamennyi klasztere jellemezhető volt minimálisan egy specifikus alléllal, ami a többi klaszterben nem jelent meg.

A következő lépésben minden populációban átlagoltuk az egyedek klaszterbe tartozásának valószínűségeit (klaszter besorolási koefficiens), és úgy tekintettük ezeket az átlagokat, mint a populációk genetikai összetételét jellemző klaszter megoszlást. A klaszterek megoszlása alapján Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokat számoltunk és UPGMA dendrogramot szerkesztettünk a *M.alcon* és a *M. teleius* populációkra egyaránt. A *M.alcon* populációk esetében 3 ág különült el a dendrogramon (E.2.1.2.A. ábra). A zempléni populációk elválásának a bootstrap támogatottsága különösen magas volt, de a fülesdi populáció is egyértelműen szeparálódott a többitől. A dendrogram alapján 3 „klaszter régiót” (ZEM: Zemplén, KMO-TRY: Közép-Magyarország és Erdély, valamint FÜL: a fülesdi populáció) azonosítottunk a *M.alcon* vizsgált populációiban (E.2.1.2.A. ábra). A *M. teleius* populációkra szerkesztett dendrogramon szintén 3 fő ágba kalsztereződtek a minták (E.2.1.2.B. ábra), így ebben az esetben is három „klaszter régiót” tudunk elkülöníteni (NYMO: Nyugat-Magyarország, ÉMO: Észak-Magyarország és KKMO: Közép-Magyarország keleti régiója), melyek közül a KKMO bootstrap támogatottsága volt kiemelkedő (E.2.1.2.B. ábra).



E.2.1.2. ábra: A populációk klaszter gyakoriságai alapján szerkesztett UPGMA dendrogramok.

A: A legvalószínűbb klaszter szám a *M. alcon* populációkban $K=3$. ZEM: Zemplén-hg.; KMO-TRY: Közép-Magyarország és Erdély; FÜL: a fülesdi populáció;

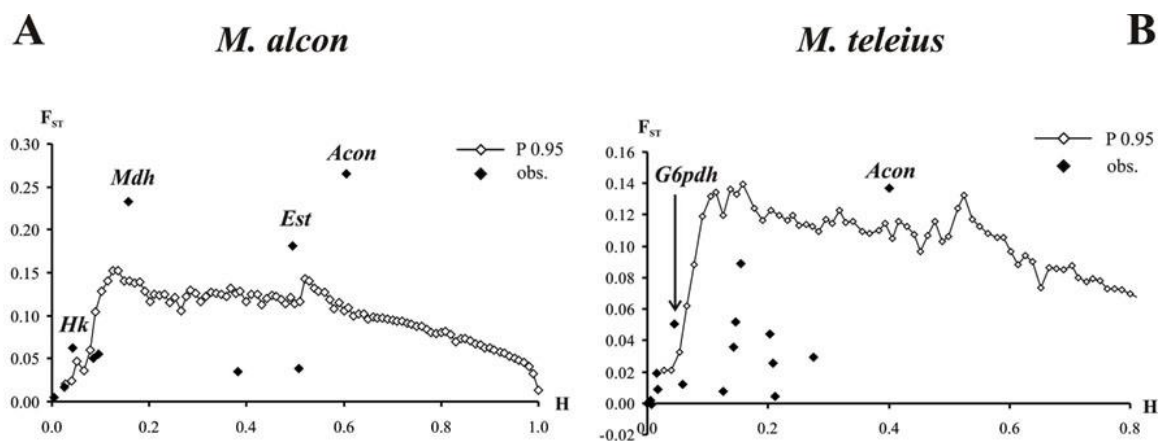
B: A klaszterek legvalószínűbb száma a *M. teleius* populációkban $K=5$ volt. ÉMO: Észak-Magyarország; KKMO: Közép-Magyarország keleti régiója; NYMO: Nyugat-Magyarország.

E.2.1.3. táblázat: A differenciálódás mérőszámai a *M. alcon* és a *M. teleius* klaszter régióin belül és azok között. ZEM: Zemplén-hg.; KMO-TRY: Közép-Magyarország és Erdély; FÜL: a Fülesdi populáció; ÉMO: Észak-Magyarország; KKMO: Közép-Magyarország keleti régiója; NYMO: Nyugat-Magyarország; Totál: a régiók közötti differenciálódás mérőszámai, amiket az összevont adatok alapján számítottunk ki. Np/r : a populációk száma a klaszter régiókban; F_{ST} : fixációs index; D : Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlaga; Nm : a migránsok effektív száma. Szignifikancia szint: ** $0,05 > P > 0,01$.

		Np/r	F_{ST}	D	Nm
<i>M. alc.</i>	ZEM	2	0.021	0.110	9.86
	KMO-TRY	6	0.146**	0.190	1.96
	FÜL	1	-	-	-
	Totál	3	0.132**	0.219	0.43
<i>M. tel.</i>	ÉMO	9	0.030**	0.090	7.92
	KKMO	2	0.054**	0.141	0.71
	NYMO	5	0.008*	0.104	6.57
	Totál	3	0.059**	0.136	4.03

A két faj genetikai struktúrájának összehasonlításában a következő lépés az volt, hogy megállapítottuk a differenciálódás mértékét a klaszter régiók között és azokon belül. Ismét a korábban említett három paramétert használtunk: F_{ST} , D és Nm . Az eredmények jelentős különbséget tártak fel a két faj genetikai struktúrájában, ami legegyszerűbben a migránsok effektív számában mutatkozott meg. A *M. alcon* esetében ez a paraméter

egyértelműen magasabb differenciálódást mutatott a régiók között, mint azokon belül (E.2.1.3. táblázat), még a meglehetősen távoli földrajzi régiókat (Mátra, Kiskunság, Szatmár-Beregi-sík (Het) és Erdély) magába foglaló KMO-TRY klaszter régióban is. Ezzel szemben a *M. teleius* esetében a klaszter régiók közötti differenciálódás hasonló szintűnek bizonyult, mint a régiókon belüli (E.2.1.3. táblázat).

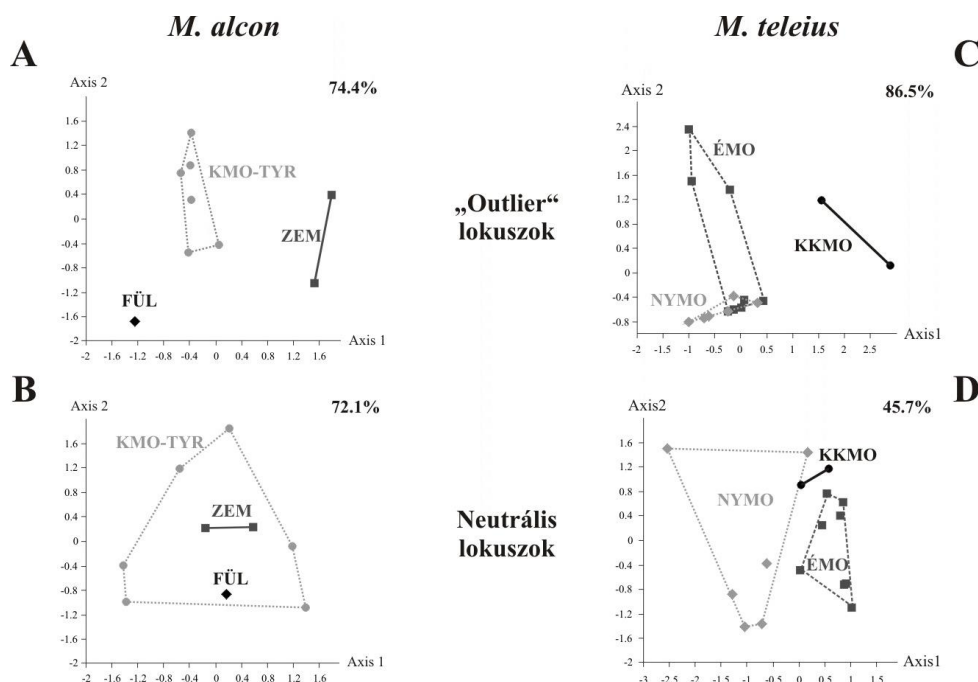


E.2.1.3. ábra: A kiugró differenciálódást mutató lokuszok analysisének eredménye a *M. alcon* és a *M. teleius* populációkban. Üres rombusz és folytonos vonal (P0.95): a szimulált fixációs index értékek 95%-os konfidencia intervalluma; obs.: a tapasztalt F_{ST} értékek; H: a „populációk” (klaszter régiók) közötti heterozigótasság mértéke. A vártnál szignifikánsan magasabb differenciálódást mutató lokuszok jelölve vannak.

Az analízisek utolsó fázisában azt vizsgáltuk meg, hogy a klaszter régiók közötti differenciálódásban szerepet játszanak-e lokusz specifikus hatások. Ennek érdekében kiugró differenciálódást mutató lokuszokat („outlier”) kerestünk a klaszter régiók között mindkét faj esetében. A fixációs indexek random eloszlását, a klaszter régiók közötti heterozigótasság függvényében, a LOSITAN program segítségével szimuláltuk. A *M. alcon* esetében 4 lokuszt (*Acon*, *Est*, *Hk* és *Mdh*) találtunk, ahol a differenciálódás mértéke szignifikánsan magasabb volt a migráció-drift egyensúly alapján vártnál (E.2.1.3.A. ábra). Mind a négy „outlier” lokusz részt vett a három klaszter elkülönítésében, amennyiben egyedi allélok jelentek meg rajtuk a különböző klaszterekben. Ugyanakkor a *M. teleius* esetében csak két lokuszon (*Acon*, *G6pdh*) tapasztaltunk a vártnál szignifikánsan magasabb differenciálódást (E.2.1.3.B. ábra), miközben 6 lokuszon jelentek meg klaszter specifikus allélok ebben a fajban.

Végül PCA segítségével teszteltük, hogy különbözik-e a populációk genetikai struktúrája akkor, ha csak a neutrális, illetve csak a kiugró differenciálódást mutató, tehát feltehetően diverzifikáló szelekciónak kitett lokuszok alapján végezzük az analízist. Így mindkét faj esetében két-két PCA-t végeztünk a megfelelő lokuszok allélfrekvencia adatai alapján. Az eredmények meggyőzőek voltak. A *M. alcon* populációk elemzése során jelentős különbséget tapasztaltunk a két PCA eredménye között: A kiugró differenciálódást mutató lokuszok alapján végzett PCA a genetikai differenciálódás egyértelmű regionális mintázatot mutatott (E.2.1.4.A. ábra), míg a neutrális lokuszok alapján végzett PCA semmilyen regionális tagolódást nem tükrözött a populációk között (E.2.1.4.B. ábra). Ugyanakkor a *M. teleius* esetében, egyértelműen elkülönültek a Kárpát-medence észak-keleti és nyugati régiói a neutrális lokuszok alapján (E.2.1.4.D. ábra: ÉMO és NYMO), míg az „outlier” lokuszok

csak Közép-Magyarország keleti régióját választották el egyértelműen a többi populációtól (E.2.1.4.C. ábra: KKMO).



E.2.1.4. ábra: A populációk allélfrekvencia adatai alapján végzett PCA eredménye a *M. alcon* (A és B) valamint a *M. teleius* (C és D) populációkban. A két tengely által magyarázott variancia hányad szintén szerepel az ábrán. ZEM: Zemplén régió; KMO-TYR: Közép-Magyarország és Erdély; FÜL: a fülesdi populáció; KKMO: Közép-Magyarország keleti régiója; ÉMO: Észak-Magyarország; NYMO: Nyugat-Magyarország.

A és C: A PCA alapjául csak a vártól szignifikánsan magasabb differenciálódást mutató lokuszok szolgáltak („Outlier” lokuszok).

B és D: Az analízist a neutrális lokuszok (Neutrális lokuszok) alapján végeztük.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk tehát, hogy a két faj között tapasztalt különbségek a variabilitás mértékében és a differenciálódás szintjében a sztochasztikus hatások intenzitásának a különbségét látszanak igazolni. Munkahipotézisünk az volt, hogy az egyenletes pete eloszlással jellemezhető *M. teleius* populációkban alacsonyabb lesz a genetikai sodródás intenzitása, és így magasabb szintű lesz bennük az enzimpolimorfizmus, ami párosul egy alacsonyabb mértékű differenciálódással a populációk között. Eredményeink egy része teljes mértékig megfelelt ennek a várakozásnak.

A *M. alcon* esetében viszont azt tételeztük fel, hogy éppen a magas szintű differenciálódás eredményeként nem tapasztalunk majd specifikus mintázatot a populációk genetikai struktúrájában. A Bayes-féle klaszteranalízis segítségével azonban mind a két fajnál sikerült klaszter régiókat azonosítani. Mi több, a klaszter régiók közötti differenciálódás a régiókon belül tapasztaltnál képest éppen a *M. alcon* esetében bizonyult egyértelműnek. Úgy tűnik tehát, hogy a viszonylag magas szintű differenciálódás mellett is tapasztalható egy határozott regionális mintázat a *M. alcon* populációk struktúrájában.

Mivel a klaszter régiók csak részben tükrözték a fajok populációinak földrajzi elhelyezkedését, ezért megvizsgáltuk, hogy mi lehet a differenciálódásban tapasztalt mintázat hátterében. Az előzetesen felállított alternatív hipotézisünknek (ökológiai

differentiálódás) megfelelően összehasonlítottuk a klaszter régiók populációiban elsődlegesen használt hangyagazdákat. Kiderült, hogy a *M. alcon* három klaszter régiójának populációi három különböző hangyagazdát parazitálnak: a zempléni populációkban (ZEM) az elsődleges gazdafaj a *Myrmica vandeli*, míg a fülesdi populáció (FÜL) egyedi gazdahangyát (*My. slovacica*) használ (Tartally & Csősz, 2004; Tartally & Varga, 2008; Tartally *et al.*, 2008). A többi populációban (KMO-TRY) pedig a domináns hangyagazda a *My. scabrinodis* (Tartally & Varga, 2008; Tartally *et al.*, 2008). A *M. alcon* esetében tehát a klaszter régiók közötti genetikai differenciálódás, legalább is részben a különböző hangyagazdáknak megfelelő ökológiai differenciálódásra vezethető vissza. Ezt a feltételezést az is alátámasztotta, hogy a kiugró differenciálódást mutató lokuszok alapján végzett PCA eredménye tükrözte legvilágosabban a klaszter régiók elkülönülését. Ugyanakkor a *M. teleius* populációkban a differenciálódás regionális mintázata kevésbé volt egyértelmű. A három klaszter régió populációinak elsődleges hangyagazdái sem különböztek olyan egyértelműen, mint a *M. alcon* populációké. A nyugati *M. teleius* populációk (NYMO) elsősorban a *My. rubra*-t parazitálják, míg az északiak (ÉMO) elsődleges gazdafaja a *My. scabrinodis* (Tartally & Csősz, 2004; Tartally & Varga, 2008; Tartally *et al.*, 2008). Ugyanakkor a nagybajcsi populáció genetikai összetétele alapján az ÉMO régióba tartozik, miközben hangyagazdaként a nyugati régióra jellemző *My. rubra*-t használja. Közép-Magyarország keleti régiójának (KKMO) populációiban sem egyértelmű a hangyagazda kérdése. Az egyik populációban (Fülesd) a *M. teleius*, a *M. alcon*-hoz hasonlóan, a *My. slovacica*-t használja, míg a másik populációban (Csévharaszt) még ismeretlen a hangyagazda.

Összességében kijelenthetjük, hogy a sztochasztikus hatások mindkét vizsgált *Maculinea* faj esetében jelentős szerepet játszanak a populációk genetikai struktúrájának a kialakításában. A két faj életmenetének kisebb különbségei alapján várható volt, hogy intenzívebb lesz a drift hatása a *M. alcon* populációkban, aminek a genetikai lenyomatát egyértelműen ki is mutattuk. Ezzel párhuzamosan azonban az ökológiai differenciálódás eredményeként megjelenő lokális adaptáció is fontos szerepet játszik a faj differenciálódási mintázatának a kialakításában. A lokális adaptáció fennmaradásának fontos feltétele, hogy az ökológiai és a genetikai szempontból egyaránt differenciálódott populációk között a génáramlás ne mossa el a kialakult genetikai különbségeket (Kawecki & Ebert, 2004). A *M. alcon* klaszter régiói között jóval alacsonyabb volt a génáramlás mértéke ($N_m=0,4$), mint a *M. teleius* régiók között ($N_m=4,03$). A *M. alcon* hernyók kakukk-stratégiájának a következményeként kialakult lokális adaptáció tehát fenn tudott maradni ilyen, relatíve alacsony szintű génáramlás mellett.

E.3. A populációk genetikai struktúráját alakító erők eltérő idősíkjai

A populációk genetikai struktúráját különböző evolúciós hatások alakítják ki. Ezek a hatások azonban gyakran nem azonos idősíkból érvényesülnek. Három idősíkot érdemes megkülönböztetni, a történeti múlt és a közeli múlt eseményeit, valamint a jelenkori történésüket. A történeti múlt eseményei a glaciális ciklusokhoz kötődnek, amennyiben a klimatikus változások alapvetően változtatták meg a fajok elterjedési területét, és így populációiknak a számát és a méretét. Az eljegesedések során a mérsékeltövi fajok zöme refúgiumokba húzódott vissza, majd a felmelegedéskor szétterjedt és kolonizálta a számára alkalmassá vált területeket (pl. Hewitt, 2001, 2004; Schmitt, 2007b; Gratton *et al.*, 2008 stb.). Mindkét folyamatnak, de különösen a kolonizációnak speciális genetikai következményei vannak a populációk variabilitására nézve. Ugyanakkor a közeli múlt

eseményeiként lényegében a különböző evolúciós erők hatásával kell számolnunk, melyek folyamatosan alakítják a populációk genetikai összetételét. Közülük a két leghatékonyabbat érdemes kiemelni, a genetikai sodródást és a szelekciót (pl. Hartl, 1988; Futuyma, 2006; Hedrick, 2011 stb.). Ezek eredményeként kialakul a populációk közötti genetikai differenciálódás, melyet aztán a génáramlás tart egyensúlyban. A harmadik idősík a jelenkori folyamatokat foglalja magába, melyek a környezet közvetlen hatásait tükrözik. A három különböző idősíkon zajló evolúciós változások genetikai lenyomatának a tanulmányozása a variabilitás eltérő szintjein történhet a leghatékonyabban: a történeti múlt folyamatainak a következményeit a mtDNS, illetve a standard nukleáris gének szekvencia analízise tárja fel a leghatékonyabban; a közeli múlt folyamatainak a megismeréséhez a nukleáris markereken (pl. enzim, vagy mikroszatellit lokuszok) tapasztalt allélfrekvencia adatok biztosítanak nagyobb felbontóképességet, míg a jelenben zajló változásokra a fenotípusos jellegek tanulmányozása révén deríthetünk fényt.

E.3.1. A *Parnassius mnemosyne* populációk genetikai struktúrája

A 3.1. fejezet a következő cikk alapján készült:

Pecsenye, K., Bereczki, J., Tóth, J.P., Szolnoki, N., Varga, Z. 2016. Genetic structure of *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera: Papilionidae) populations in the Carpathian Basin. *Organisms, Diversity and Evolution* **16**(4): 809-819. (IF: 1.734)

Elméleti háttér

A történeti múlt eseményei olyan módon befolyásolják a populációk genetikai állományát, hogy amikor az eljegesedések során a faj különböző refúgiumokba húzódik vissza, akkor az ott fennmaradó populációk között akár jelentős mértékű genetikai differenciálódás is kialakulhat, vagyis elkülönült genetikai vonalak jönnek létre. Az expanziós fázisban azonban ezek a vonalak közösen népesíthetnek be egy adott földrajzi régiót, és így hibridizáció alakulhat ki közöttük (Hewitt, 2001; Schmitt *et al.*, 2003; Hewitt, 2004; Wahlberg & Saccheri, 2007; Schmitt & Seitz, 2008). Ezek a folyamatok még összetettebbek azoknál a fajoknál, melyeknek az úgynevezett „kriptikus” refúgiumai részben extra-mediterrán területeken voltak (Stewart *et al.*, 2010; Schmitt & Varga, 2012 és a bennük szereplő hivatkozások). Ezzel párhuzamosan azt is figyelembe kell venni, hogy az expanziós fázisban, a kolonizáció során mintegy lépésről lépésre érvényesül az alapító hatás, amelynek következtében az új területek genetikai variabilitása folyamatosan csökken (pl. a *Polymmatius coridon* esetében Schmitt & Seitz, 2001).

A kis apollólepké azok közé a fajok közé tartozik, melyeknek extra-mediterrán refúgiumai voltak. A faj filogeográfiai elemzését Gratton *et al.* (2008) végezték el a mtDNS COI szekvencia analízise alapján. Megállapították, hogy a fajnak két fő refúgiuma volt: a nyugati (Alpok körüli régió) és a keleti, több részre bomló refugiális terület (a Peloponnészi-félsziget és a Balkán/Kárpátok régiója). Azt is kimutatták, hogy Európa benépesülése több útvonalon keresztül, alapvetően két refúgiumból történt: az Alpok körüli (nyugati genetikai vonal) és a balkáni (keleti/balkáni genetikai vonal) refúgiumokból. A nyugati vonal népesítette be a közép- és nyugat-európai területeket (Ausztria, Németország, Csehország stb.). A balkáni régióból azonban legalább két útvonal indult ki: a kelet-, és a nyugat-balkáni útvonal. Ennek megfelelően a balkáni genetikai vonalnak két ága van: a kelet- és a nyugat-balkáni ágak. A kelet-balkáni ág egyrészt a Kárpátokon átjutva, a Kárpát-medence keleti területeit népesítette be, másrészt pedig a Kárpátok megkerülésével, az

ukrán és orosz síkság területeit. Ugyanakkor a nyugat-balkáni ágon szintén eljutott a faj a Kárpát-medencébe, első sorban annak nyugati területeire. Így a Kárpát-medencében három genetikai vonal találkozik, a nyugati, valamint a keletinek a két ága. Gratton *et al.* (2008) azt is feltételezték, hogy az észak-Európában elterjedt északi ág (a keleti vonal harmadik ága) lényegében a Kárpát-medencéből ered.

A közeli múlt folyamatainak a megértéséhez mindenképp a fajok ökológiai igényeit, elsősorban az általuk preferált habitatok elterjedését kell figyelembe venni. A *P. mnemosyne* strukturált habitatot igényel, ahol a lárvális tápnövény (*Corydalis cava* vagy *C. solida*) és a lepkék számára szükséges nektárforrások egyaránt megtalálhatók. Ilyen habitatok a laza szerkezetű hegyvidéki, és Közép-Európában a keményfás ártéri ligeterdők, melyekben a fényviszonyok jók, és sok tisztás található bennük. Ugyanakkor ezek a habitatok jelentős mértékben átalakultak az utóbbi évtizedekben. A hegyvidéki erdők fő veszélyeztető tényezője az erdőművelés átalakulása, tarvágásos rendszerűvé válása; míg a keményfás ártéri erdők erőteljes visszaszorulását a folyók szabályozása idézte elő. Speciális habitat igénye miatt a *P. mnemosyne* nagyon érzékeny az erdők struktúrájában bekövetkezett változásokra (Warren & Key, 1991; Konvička & Kuras, 1999; Freese *et al.*, 2006). Így a kis apollólepké populációi Európa szerte visszaszorultak, méretük jelentősen csökkent, izolációjuk fokozódott, esetleg már ki is pusztultak. Az erdő habitatok degradációja jelentősen átalakította a kis apollólepké lepké populációk genetikai struktúráját is.

Célkitűzések

Vizsgálataink célja az volt, hogy összehasonlítsuk a két idősíkon zajló evolúciós folyamatok hatását a *P. mnemosyne* Kárpát-medencei populációinak a genetikai struktúrájára. Gratton *et al.* (2008) európai léptéken feltárták ugyan a *P. mnemosyne* filogeográfiáját, de a Kárpát-medence vonatkozásában eredményeik felbontó képessége nem volt elég finom. Munkájuk nyomán azt feltételeztük, hogy az általuk leírt 3 genetikai vonal alapvetően a középhegységi régióban fordul elő (Dunántúli- és Északi-khg.). Ugyanakkor lényeges kérdés maradt a Kárpát-medence keleti populációinak az eredete.

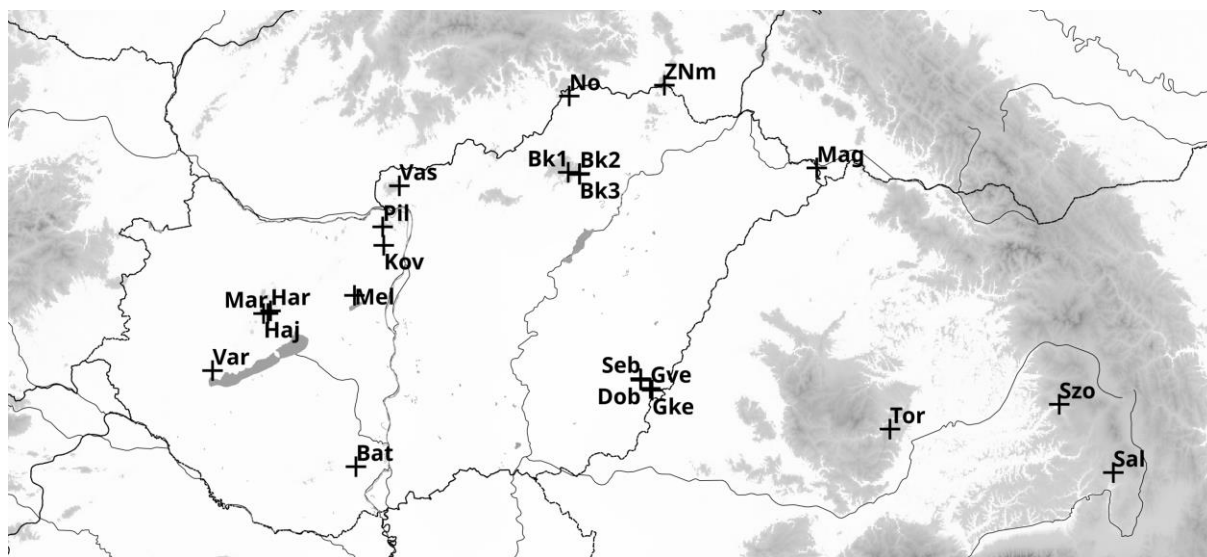
Amikor a közeli múlt eseményeinek a genetikai következményeit tanulmányoztuk, akkor abból indultunk ki, hogy az erdő habitatok degradációja a Kárpát-medencében elsősorban a keményfás ártéri ligeterdőket érintette. Ezért azt tételeztük fel, hogy az itt élő populációk izolációja kifejezettebb lesz, mint a hegyvidéki erdőkben élőké, ami együtt járhat ezen populációk genetikai állományának a leromlásával, illetve fokozott mértékű genetikai differenciálódásukkal.

Céljaink elérése érdekében eltérő markereket alkalmaztunk arra, hogy elemezzük a két különböző idősíkon ható evolúciós erők genetikai következményeit. A történeti múlt eseményeinek hatására abból következtettünk, hogy vizsgáltuk a mtDNS citokróm oxidáz I alegységének (COI) egy 927 bp-ból álló szakaszán a haplotípusok leszármazási kapcsolatait és megoszlását a Kárpát-medencében. A közeli múlt eseményeinek a tanulmányozására pedig nukleáris markert használtunk, és elemeztük az enzimpolimorfizmus szintjét és szerkezetét 14 lokuszon.

Minták

A *P. mnemosyne* minták a Kárpát-medence 6 földrajzi régiójának (Dunántúli-középhegység: 9; Északi-középhegység: 5; Körösök vidéke: 4; Szatmár-Beregi-sík: 1; Erdélyi Sziget-hg.: 1 és a Keleti-Kárpátok: 2) 22 populációjából származtak (E.3.1.1. ábra és E.3.1.1. függelék). A minták gyűjtése 1998 és 2012 között történt. Az enzim lokuszokon összesen 525 egyed

genotípusát határoztuk meg, míg a mtDNS COI szekvencia analízisét 20 egyeden végeztük el.



E.3.1.1. ábra: A *P. mnemosyne* mintahelyei a Kárpát-medencében.

DKH: Vasverem (Vas), Pilis-tető (Pil), Nagyszénás (Kov), Meleg-hegy (Mel), Márkó (Mar), Közép-Hajag (Haj), Hárskút (Har), Vár-hegy (Var) és Bátaapáti (Bat);

ÉKH: Nagymilic (ZNm), Nagyoldal (No) és Bükk (Bk1, Bk2, Bk3);

KÖR: Sebesfoki-erdő (Seb), Dobozi-erdő (Dob), Gyula-Városerdő (GyV) és Gyula-Köriserdő (GyK); BSZK (klaszter régió): Magosliget (Mag), Torockó (Tor), Szaldobos (Sal) és Szováta (Szo).

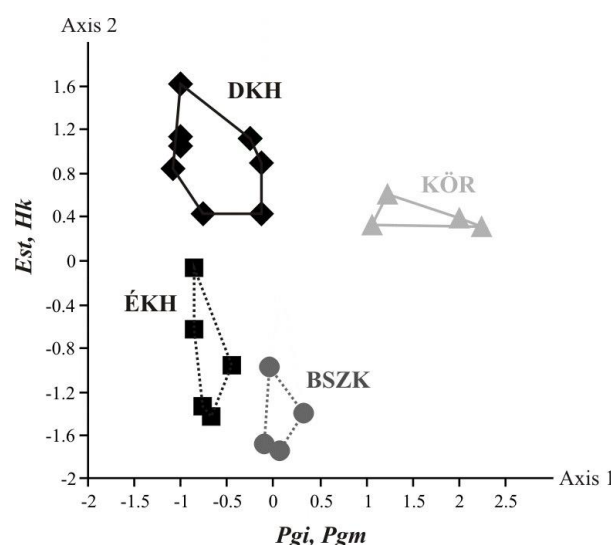
Eredmények és értékelésük

A kis apollólepke Kárpát-medencei populációiban magas szintű enzimpolimorfizmust tapasztaltunk: az átlagos allélszám $n_A=2,45$, míg a heterozigóták átlagos gyakorisága $H_o=0,188$ volt (E.3.1.1. táblázat, E.3.1.2. függelék). A variabilitás szintjében tapasztalt különbségek egyik mutató esetében sem bizonyultak szignifikánsnak a régiók között (E.3.1.1. táblázat: ANOVA). Ugyanakkor az Északi-középhegység populációinak minden mutatója alacsonyabb volt, mint a többi régióé. Ezért megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a polimorfizmus szintje egy földrajzi klin mentén változik, vagyis elemeztük a korrelációt a variabilitás mutatói, és a populációk földrajzi hosszúsági foka között a középhegységi régiókban (ÉKH+DKH). A korrelációs koefficiens valamennyi paraméter esetében szignifikáns volt jelezve, hogy a variabilitás kelet felé haladva fokozatosan csökken a középhegységi régiókban (E.3.1.1. táblázat: R).

A populációk genetikai struktúrájának elemzése során az első lépés egy PCA volt az allélfrekvencia adatok alapján. A mintákat reprezentáló pontok 4 jól elkülönült felhőt alkottak a változók redukált terében (E.3.1.2. ábra), melyek azonban csak részben feleltek meg a populációk földrajzi helyzetének. A Dunántúli- és az Északi-középhegység, valamint a Körösök vidékének populációi egy-egy önálló pontfelhőt alkottak, és egyértelműen elkülönültek egymástól. Meglepő módon azonban, a földrajzilag viszonylag távoli szatmár-beregi-síki (Mag), erdélyi-szigethegységi (Tor) és keleti-kárpáti (Sal, Szo) populációk szintén egy meglehetősen kompakt pontfelhőt alkottak (BSZK), amely világosan elvált az Északi-középhegység populációitól (E.3.1.2. ábra).

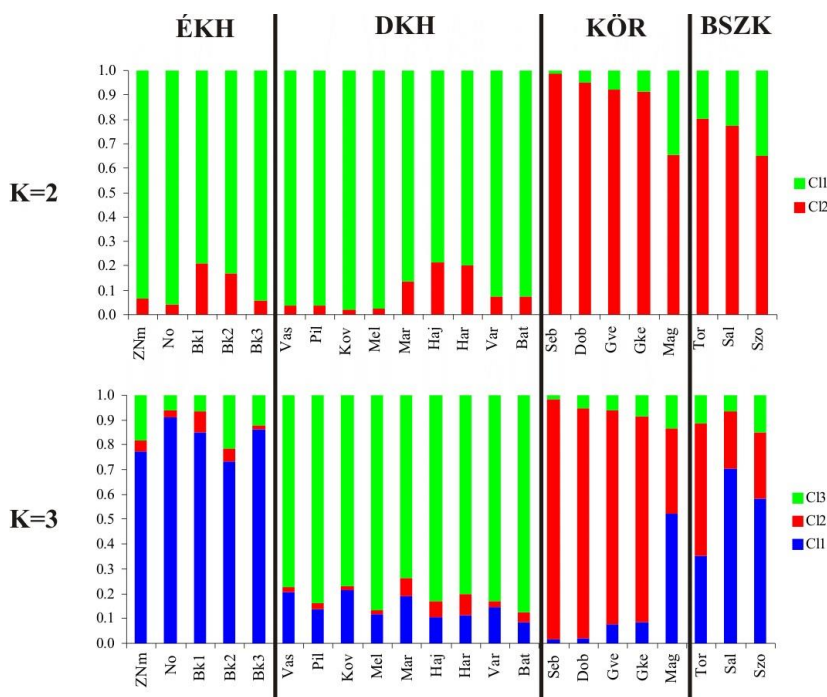
E.3.1.1. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói a *P. mnemosyne* klaszter régióiban. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; BSZK: Szatmár-Beregi-sík, Sziget-hg. és Keleti-Kárpátok; Totál: az összes vizsgált populáció átlaga. Np/r: a populációk száma a régión belül; N/p: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=11); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; %Fix: a fixálódott allélok aránya. ANOVA: a régiók mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség. ÉKH+DKH: a hosszúsági fokokkal való korreláció vizsgálata a középhegységi régió populációiban; P: valószínűség; R: korrelációs koefficiens. A kövér betűk szignifikáns korrelációt jeleznek.

	Régió	Np/r	N/p	n_A	Ar	%Fix	Ho
Átlag	ÉKH	5	19.6	2.11	1.92	0.261	0.135
	DKH	9	26.0	2.54	2.22	0.173	0.192
	KÖR	4	31.3	2.50	2.11	0.108	0.217
	BSZK	4	16.7	2.63	2.43	0.139	0.218
	Totál	22	23.8	2.45	2.19	0.175	0.188
ANOVA	$F_{3,19}$	-	-	0.8	0.73	1.65	0.74
	P	-	-	0.511	0.548	0.211	0.541
ÉKH+DKH	$F_{1,12}$	-	-	6.88	13.69	8.42	38.15
	P	-	-	0.0222	0.0030	0.0133	0.0000
	R	-	-	-0.604	-0.730	0.696	-0.872



E.3.1.2. ábra: A *P. mnemosyne* populációk allélfrekvencia adatai alapján végzett PCA eredménye. A tengelyek mentén a kialakításukban legnagyobb szerepet játszó lokuszok láthatók. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; BSZK: Szatmár-Beregi-sík, Sziget-hg. és Keleti-Kárpátok.

A Bayes-féle klaszteranalízis során a klaszterek legvalószínűbb száma $K=2$ volt (E.3.1.3. függelék: $K=2$). Két klaszter jelenlétét feltételezve, minden populációban átlagoltuk az egyedek klaszterbe tartozásának a valószínűségét (klaszter besorolási koefficiens), és úgy tekintettük ezeket az átlagokat, mint a populációk genetikai összetételét jellemző klaszter megoszlásokat. A két klaszter populációkban tapasztalt megoszlása alapján megállapítottuk,



E.3.1.3. ábra: A Bayes-féle klaszteranalízis eredménye a vizsgált *P. mnemosyne* populációkban. A populációk átlagos klaszter besorolási koeficiense két ($K=2$), illetve három ($K=3$) klaszter feltételezése esetén. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; BSZK: Szatmár-Beregi-sík, Sziget-hg. és Keleti-Kárpátok.

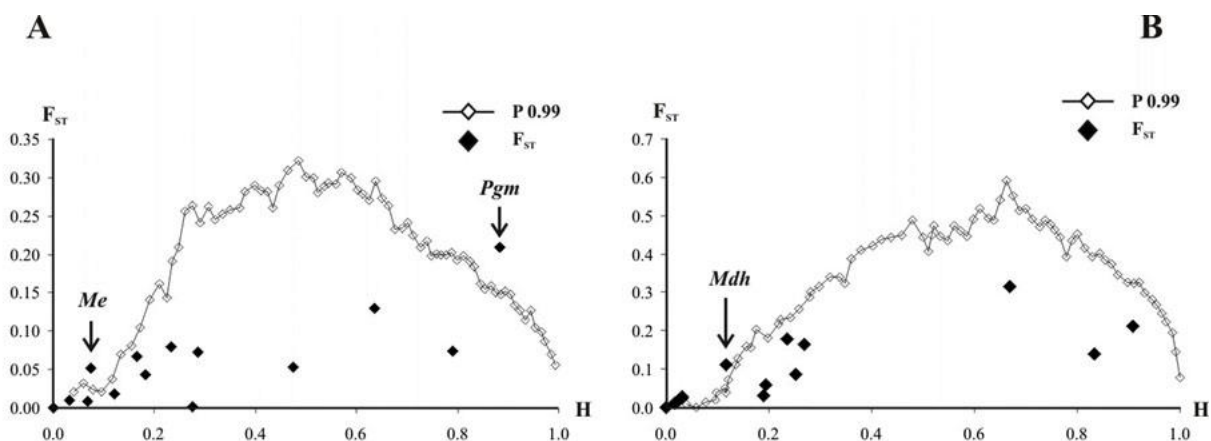
hogy a genetikai differenciálódás elsősorban a Körös (KÖR) és a középhegységi régiók (ÉKH és DKH) között nyilvánult meg, amennyiben mind a két régióra jellemző 1-1 klaszter dominanciája (E.3.1.3. ábra: $K=2$). Ugyanakkor $K=2$ esetén nem érzékelhető a két középhegységi régió közötti elkülönülés, ami a PCA eredményében egyértelmű volt. Továbbá, két klasztert feltételezve, a BSZK „régió” (Szatmár-Beregi-sík – Sziget hg. – Keleti-Kárpátok) differenciálódása sem egyértelmű, ugyanis ebben a régióban a két genetikai vonal (klaszter) keveredése figyelhető meg. Ezért megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy 3 klaszter építi fel a vizsgált populációk genetikai állományát (E.3.1.3. függelék $K=3$).

Összehasonlítva a $K=2$ esetében talált két klaszter genetikai összetételét a $K=3$ esetén detektált hárommal, kiderült, hogy klaszter 2-nek mindkét analízisben ugyanaz a 3 egyedi allélja volt (*Acon2*, *Gpdh3* és *Pgi7*), így feltételezhető, hogy ez a klaszter ugyanazt a genetikai vonalat képviselte mind a két analízisben ($K=2$ és $K=3$). Párhuzamba állítva klaszter 1 ($K=2$), valamint klaszter 1 és 3 ($K=3$) becsült allélfrekvencia adatait, az is egyértelmű volt, hogy a 3 klaszternek van egy közös egyedi allélja (*Est11*), ami mindkét K érték esetén megkülönbözteti őket klaszter 2-től. Ebből az következik, hogy van bizonyos hasonlóság a három klaszter genetikai összetételében, vagyis klaszter 1 és 3 ($K=3$) lényegében klaszter 1 ($K=2$) két leszármaztatott klaszterének (klaszter 1A és 1B) tekinthető. Ugyanakkor ennek a két leszármaztatott klaszternek a genetikai összetételét egybevetve megállapítottuk, hogy vannak olyan klaszter specifikus allélok, amelyek megkülönböztetik őket egymástól (*Est13* és *Hk1*).

A továbbiakban megvizsgáltuk a populációk átlagos klaszter megoszlását $K=3$ feltételezése mellett. A Körös régió (KÖR) ebben az analízisben is egyértelműen elkülönült

a többtől. $K=3$ esetében azonban világos differenciálódást tapasztaltunk a két középhegységi régió között is (E.3.1.3. ábra: $K=3$), nevezetesen klaszter 1 (leszármaztatott klaszter 1A) az ÉKH, míg klaszter 3 (leszármaztatott klaszter 1B) a DKH régióban dominált. Sőt, $K=3$ -t feltételezve az is nyilvánvalóvá vált, hogy a BSZK régió genetikai állománya valóban kevert, egyrészt a KÖR, másrészt pedig az ÉKH régiót jellemző klaszterek építik fel (E.3.1.3. ábra: $K=3$).

Az analízis utolsó fázisában azt vizsgáltuk, hogyan alakulhatott ki a Kárpát-medence keleti területének (ÉKH, KÖR és BSZK) genetikai állománya, figyelembe véve a régiók klaszter összetételét. Tekintettel arra, hogy ezekben a régiókban a *P. mnemosyne* által benépesített habitatok jellege eltérő (mezofil hegyvidéki erdő, illetve ártéri ligeterdő) feltételeztük, hogy a sztochasztikus folyamatok mellett a diverzifikáló szelekciónak is szerepe lehetett az intenzív differenciálódás kialakulásában. Ezért kerestük a diverzifikáló szelekció genetikai lenyomatát, vagyis kiugró differenciálódást mutató lokuszokat a régiók között. Az adatokat úgy hoztuk létre, hogy összeömlesztettük az egyes régiók populációit, majd párba állítottuk a régiókat: ÉKH versus BSZK, ÉKH versus KÖR, illetve BSZK versus KÖR. A fixációs indexek random eloszlását a LOSITAN program segítségével szimuláltuk a régiók közötti heterozigótaság függvényében. Minden régió pár esetében 5 párhuzamos futtatást végeztünk, majd összevetettük ezek eredményeit. A BSZK-KÖR régió pár esetében két lokuszon (*Me* és *Pgm*) tapasztaltuk, hogy valamennyi párhuzamos futásban szignifikánsan magasabb volt a differenciálódás, mint az várható drift-migráció egyensúlyban (E.3.1.4.A. ábra). Az ÉKH-KÖR régió pár esetében pedig 1 lokusz (*Mdh*) mutatott konzekvensen kiugró differenciálódást (E.3.1.4.B. ábra) az öt párhuzamos futásban. Ugyanakkor az ÉKH-BSZK régiók esetében egyetlen lokuszt sem találtunk, ahol a differenciálódás mértéke minden futtatás során konzekvensen magasabb lett volna a várhatónál.

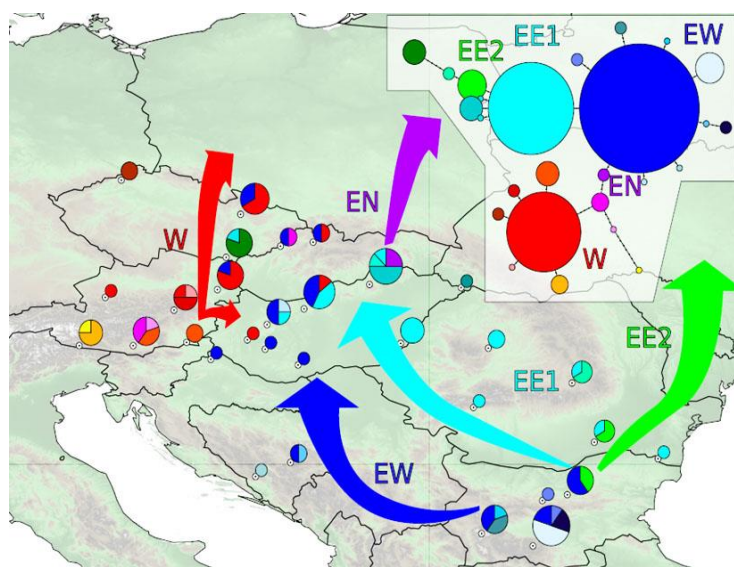


E.3.1.4. ábra: A kiugró differenciálódást mutató lokuszok analízisének eredménye a *P. mnemosyne* populációkban. Üres rombusz és folytonos vonal (P0.99): a szimulált fixációs index értékek 99%-os konfidencia intervalluma; Teli rombusz (F_{ST}): a tapasztalt F_{ST} értékek; H: a „populációk” (klaszter régiók) közötti heterozigótaság mértéke. A vártnál szignifikánsan magasabb differenciálódást mutató lokuszok jelölve vannak.

A: A BSZK és a KÖR régiók adatait használtuk az analízisben.

B: Az ÉKH és a KÖR régiók adatait használtuk az analízisben

A mtDNS COI szekvenciájának tanulmányozása során egy 927 bp hosszúságú szakaszt elemeztünk. A saját adatainkon túlmenően a Gratton *et al.* (2008) által megadott szekvenciák közül is felhasználtuk azokat, amelyek a Kárpát-medencéből és a környező területekről származtak. A vizsgált DNS szakasz 22 informatív helyet tartalmazott. Összesen 26 haplotípust találtunk, melyekből haplotípus hálózatot állítottunk fel. A hálózatban, világos földrajzi tagolódás volt felismerhető annak ellenére, hogy ezek a haplotípusok általában csak 1-2 bázisban különböztek egymástól (E.3.1.5. ábra). A Kárpát-medencében, a várakozásnak megfelelően 3 haplotípus csoportot (genetikai vonal) sikerült kimutatni. A nyugati csoport (W) csak a DKH régióban volt jelen, a keleti csoport nyugat-balkáni ága (EW) szintén a DKH régióban volt kimutatható, míg a keleti csoport kelet-balkáni ága (EE1) valamennyi régióban (BSZK, KÖR, ÉKH és DKH) előfordult (E.3.1.5. ábra). Ki kell emelni, hogy az Északi-középhegységben kimutattunk egy egyedi haplotípust, mely a keleti csoport északi ágára (EN) jellemző, vagyis az Észak-Európában és Skandináviában elterjedt mtDNS vonal feltehetően a Kárpát-medence északi részén alakulhatott ki.



E.3.1.5. ábra: A *P. mnemosyne* mtDNS COI haplotípus hálózata és az egyes haplotípusok megoszlása a populációkban. A nyilak a feltételezett rekolonizációs utakat mutatják. W: nyugati vonal; EW: a keleti vonal nyugati ága (nyugat-balkáni ág); EE: a keleti vonal keleti ága (kelet-balkáni ág); EN: a keleti vonal északi ága.

A kis apollólepke populációk elemzése során kapott eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- a. A *P. mnemosyne* populációk mind az enzim lokuszokon, mind pedig a mtDNS COI szekvencia alapján viszonylag magas szintű variabilitással jellemezhetők a Kárpát-medencében.
- b. A két marker sok tekintetben hasonló genetikai struktúrát tárt fel a vizsgált populációkban. Mind a mtDNS COI szekvencia, mind pedig az enzim adatok Bayes-féle klaszter analízise 2 fő genetikai vonal jelenlétét igazolta a Kárpát-medencében. Mi több, mindkét marker esetében kimutatható volt az egyik genetikai vonal két további ágra történő tagolódása.

A COI szekvencia nagyobb mintán végzett elemzése révén lehetőségünk volt arra, hogy a *P. mnemosyne* Gratton *et al.* (2008) által felvázolt filogeográfiáját árnyaljuk, és finomabb felbontásban vizsgáljuk a Kárpát-medence vonatkozásában. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a Kárpát-medence benépesülése elsősorban a balkáni refúgiumokból történt, párhuzamosan a kelt- és a nyugat-balkáni kolonizációs útvonalon. A nyugati útvonal a Balkán-félsziget hegyvidékei mentén, a Dunántúl felől érhetett el a medence nyugati területeit, míg a keleti útvonal a Kárpátokon átlépve jutott el a keleti területekre. A két útvonal a középhegységi régióban találkozhatott. Mivel az Északi-középhegységet a haplotípusok meglehetősen magas diverzitása jellemzi, mi több területén kimutatható a keleti vonal északi ágának egyik haplotípusa is, ezért valószínűsíthető, hogy ezen a területen a *P. mnemosyne* túlélhette a legutolsó eljegesedést egy másodlagos refúgiumban. Ehhez hasonló mintázat figyelhető meg a *Fagus sylvatica* (Magri *et al.*, 2006; Magri, 2008), vagy még jellemzőbben a *Clethrionomys glareolus* (Kotlík *et al.*, 2006; Filipi *et al.*, 2015) esetében is. A Dunántúli-középhegység COI szekvenciájának változatosságát a keleti vonal két ágának posztglaciális terjedésén túlmenően az is fokozta, hogy ebben a periódusban a nyugati ág is behatolt a régióba az Alpok keleti pereme felől. Így tehát előzetes hipotézisünknek megfelelően 3 mtDNS vonal alakította ki a kis apollólepke Kárpát-medencei populációinak genetikai állományát.

c. A két marker eredményeinek a hasonlósága mellett, néhány ellentmondás is mutatkozott a *P. mnemosyne* általuk feltárt genetikai struktúrájában. Ez mindenképp előtt a Kárpát-medence keleti régióinak genetikai mintázatában jelentkezett. Miközben a mtDNS szekvencia alapján a KÖR, a BSZK és az ÉKH régiókat egyértelműen a balkáni vonal keleti ága (EE1) kolonizálta, addig az enzimek (nukleáris markerek) alapján végzett Bayes-féle klaszteranalízis eredménye más képet mutatott. A KÖR és az ÉKH régiót egy-egy önálló klaszter jellemezte, míg a BSZK régió genetikai állományában keveredett ez a két klaszter. A két markerrel kapott eredményekben mutatkozó különbségek egyik lehetséges magyarázata, hogy a rájuk ható evolúciós erők időskija eltérő. A mtDNS szekvencia adatok azt tárták fel, hogy a három régió közös kolonizációs útvonalon népesült be. A nukleáris markerek viszont azt jelezték, hogy a 3 régióban eltérő evolúciós hatások érvényesültek. A Körös régióban a kis apollólepke az ártéri ligeterdő maradvány foltjaiban él, míg az Északi-középhegységben (ÉKH) és a BSZK régió nagy részén középhegységi erdőkben. Így a Körös régió populációi földrajzi és ökológiai értelemben is perem helyzetű izolátumoknak tekinthetők. A Körös régió és a középhegységi erdők populációi között detektált kiugró differenciálódást mutató lokuszok is valószínűsítik a diverzifikáló szelekció hatását a két erdő típusban.

E.3.2 Az *Euphydryas aurinia* populációk genetikai struktúrája

A 3.2. fejezet az alábbi könyv fejezet és kézirat alapján készült:

Pecsénye K., Bereczki J., Tóth A., Meglécz E., Peregovits L., Juhász E. és Varga Z. 2007. A populációstruktúra és a genetikai variabilitás kapcsolata védett nappalilepke-fajainknál. pp. 1-20. In Forró L. és Ronkay L. (szerk.) *A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása*. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest

Pecsénye K., Tóth, A., Tóth, J.P., Bereczki, J., Katona, G., Varga, Z. 2017. Allozyme polymorphism, mtDNA sequence diversity and morphometric variation in Marsh Fritillary populations. (kézirat)

Elméleti háttér

A lápi tarkalepke, *E. aurinia* egy policentrikus eurosibériai faj, amelynek lokalizált populációi Európa nagy részén megtalálhatók (Tolman & Lewington, 1997; Liu, Wang, & Xu, 2006; Bulman *et al.*, 2007). Áréája azonban Európában diszjunkt, amely két nagy, összefüggő részre tagolódik: a nyugat- és a kelet-európai területre (Kudrna, 2002). Az área két része között egy északkelet-délnyugat irányú hiátus figyelhető meg, amely Nyugat-Lengyelországon, Szlovákia és Magyarország keleti térségén keresztül, Románia és Szerbia legnagyobb részén át húzódik. Az elterjedési terület nyugati felének a keleti pereme a Kárpát-medencében a Dunántúl középső részén található. Az *E. aurinia* tehát teljesen hiányzik az Alföldről és az Északi-középhegységből. A Dunántúl középső területeihez képest a legközelebbi előfordulása az Erdélyi-medencében van. Az erdélyi populációk azonban nem képezik szerves részét az elterjedési terület keleti felének, ezek a populációk inkább többé-kevésbé izolálódott „szigeteknek” tekinthetők.

Az *E. aurinia* alapvetően tápanyagban szegény gyepekben fordul elő, melyek a talajnedvesség szempontjából lehetnek nedves, vagy meszes szárazabb rétek, esetleg erdőszegélyek (Betzholtz *et al.*, 2007; Smee *et al.*, 2011; Meister, Lindman, & Tammaru, 2015). A Kárpát-medencében leginkább a nedves réteken jellemző (Őrség, Tapolcai-medence), bár populációi megjelennek homoki (Somogy) és hegyi réteken (Bakony, Vértes-hegység) is. A lápi tarkalepke tápnövénye habitatfüggő, nedves réteken túlnyomórészt a réti ördögharaptafű (*Succisa pratensis*) (pl. Konvicka, Hula, & Fric, 2003; Anthes *et al.*, 2003; Sigaard *et al.*, 2008). Félsszáraz gyepekben és erdőszegélyeken azonban a lárvák a galambszínű ördög szemet (*Scabiosa columbaria*) és a mezei varfűvet (*Knautia arvensis*) használják (Warren, 1994; Schtickzelle *et al.*, 2005).

A lápi tarkalepke nőtényei petéiket 1-3 csomóban rakják le a tápnövény levelére. A hernyók, a díszes tarkalepkéhez hasonlóan, szövedéket szőnek maguk köré, és abban közösen táplálkoznak majd hibernálnak (Porter, 1982). Csak az áttelelés után, az 5-6. lárvastádiumban, szélednek szét a fészekből, amikor magányosan táplálkoznak, később pedig bebábozódnak. A Kárpát-medencében májustól június végéig repülnek az adultak. Életciklusának következményeként a lápi tarkalepke populációk erősen ki vannak téve különböző sztochasztikus hatásoknak. Ennek eredményeként populációik mérete jelentősen ingadozik. A populációméret változása azonban nem lokális, hanem sokkal inkább regionális mintázatot mutat, ami arra utal, hogy nagyrészt a populációk denzitásától független faktorok (pl. időjárás) hatására vezethető vissza (Porter, 1982).

Az *E. aurinia* európai populációinak genetikai struktúráját Junker *et al.* (2015) tanulmányozták részben nukleáris markerek (17 enzim lokusz), részben pedig mtDNS szekvencia adatok (Citokróom oxidáz I alegység) analízise révén. Mintáik egész Nyugat-Európát lefedték az Ibériai-félszigettől Csehország, Ausztria és Szlovénia vonaláig. Rendelkeztek továbbá két mintával az Erdélyi-medencéből is. Megállapították, hogy a genetikai differenciálódást mind az enzim lokuszokon, mind pedig a mtDNS haplotípusok esetében erős földrajzi mintázat jellemzi. A mtDNS haplotípus hálózat elemzése alapján feltételezték, hogy a Kárpát-medence nyugati területeit az Alpok keleti peremén lévő refúgiumból népesítette be a faj, míg az Erdélyi-medencében egy önálló refúgiumot valószínűsítettek.

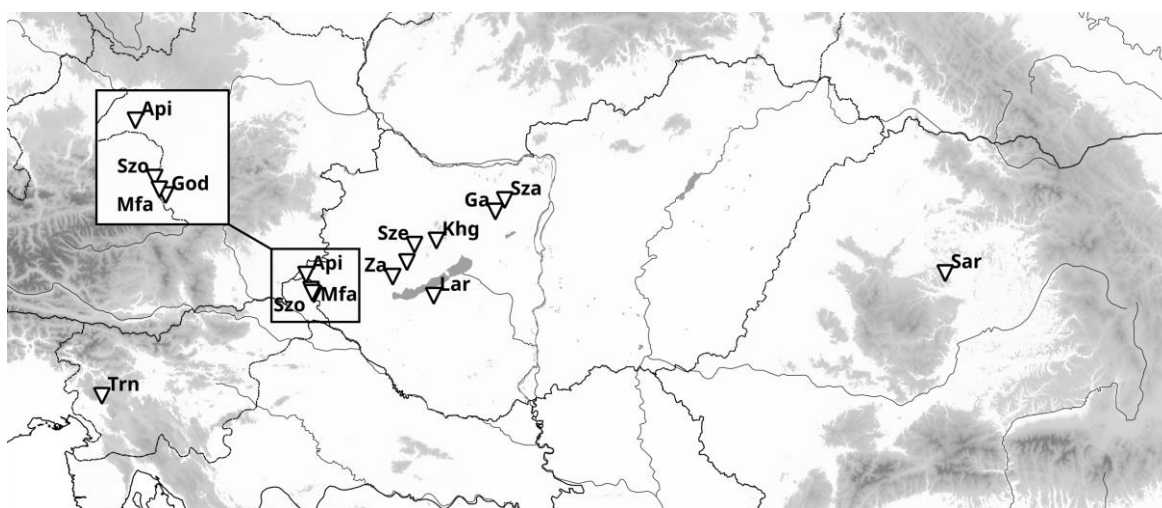
Célkitűzések

Az *E. aurinia* speciális életmenete és elterjedési területének Kárpát-medencei sajátosságai számos kérdést vetnek fel az itt élő populációkra ható evolúciós erőkkel kapcsolatban.

Mivel Junker *et al.* (2015) a Kárpát-medencéből csak az Erdélyi-medencében gyűjtöttek mintákat, ezért fontosnak tartottuk, hogy a lápi tarkalepke genetikai struktúrájáról általuk felvázolt képet további adatokkal egészítsük ki, különös tekintettel a Kárpát-medence nyugati populációira. Másrészt viszont Junker *et al.* (2015) a variabilitás két típusát vizsgálták: nukleáris markereket (enzim lokuszokat), és mtDNS COI szekvenciát. Az *E. aurinia* diszjunkt elterjedési területén húzódó hiátus a Kárpát-medence középső, és részben a keleti részét érinti. Ennek tükrében izgalmasnak tartottuk az előbbi két molekuláris marker mellett, a fenotípusos változatosság tanulmányozását is a lápi tarkalepke Kárpát-medencei populációiban. A legalapvetőbb kérdésünk az volt, hogy milyen mértékű a differenciálódás a medence nyugati és keleti populációi között a három vizsgált jellegtípus tekintetében. Azt tételeztük fel, hogy magas szintű differenciálódást tapasztalunk majd az erdélyi és a nyugati populációk között, elsősorban a molekuláris markerek analízise során.

Ugyanakkor jelenlegi ismereteink szerint a közép-dunántúli populációk a lápi tarkalepke nyugat-európai elterjedési területének a keleti peremén találhatók. Így lehetőség nyílt arra, hogy tanulmányozzuk ezekben a populációkban a periferikus elhelyezkedés hatását a variabilitás különböző típusaira. Abból kiindulva, hogy az elterjedési terület peremén található populációk valószínűleg szuboptimális körülmények között élnek, az volt a munkahipotézisünk, hogy a bennük érvényesülő szelekciós hatások lokálisan változatosak lehetnek, aminek a genetikai lenyomata várhatóan az enzim lokuszokon jelenik majd meg. Ugyanakkor azt is feltételeztük, hogy az elterjedési terület periferiáján lévő habitatokban a populációk erőteljesebben vannak kitéve a környezeti stressznek, mint a centrálisakban. A nagyobb környezeti stressz viszont csökkentheti az egyedfejlődés stabilitását, és így növelheti a fluktuáló aszimmetria szintjét.

Mindezen kérdések megválaszolása érdekében a lápi tarkalepke több Kárpát-medencei populációjában gyűjtöttünk mintákat és vizsgáltuk az enzimpolimorfizmus szintjét 18 lokuszon, elemeztük a szekvencia változatokat a mtDNS COI génjének 616 bázispárnnyi szakaszán, és tanulmányoztuk a morfometriai változatosságot 13 szárnyjelleg esetében.



E.3.2.1. ábra: A vizsgálatokban használt *E. aurinia* minták. SLO: Trnovsky Gozd (Trn); ŐRS: Apátistvánfalva (Api), Szomoróc (Szo), Gödörháza (God), Magyarszombatfa (Mfa), KDT: Középhajag (Khg), Széki-erdő (Sze), Látrány (Lar); TRY: Magyarsárd (Sar). További minták a COI szekvencia analízisében: Zalaszántó (Za); Szár (Sza) és Gánt (Ga).

Minták

Az *E. aurinia* minták a Kárpát-medence 3 régiójának (Őrség: ÖRS; Közép-Dunántúl: KDT; Erdély: TRY) 8 populációjából származtak, valamint 1 mintánk volt Szlovéniából (SLO) is (E.3.2.1. ábra és E.3.2.1. Függelék). A 9 populációban összesen 209 egyed gyűjtöttünk 2004 és 2007 között. Az összes egyed esetében vizsgáltuk az enzimpolimorfizmust, 110 hím egyedben (6 populáció) végeztünk morfometriai analíziseket, és 21 egyedben (4 populáció) elemeztük a mtDNS COI szekvenciát és a *Wolbachia* fertőzöttség mértékét. A COI szekvencia analízisébe bevontunk további 15 egyed, melyek 3 populációból származtak (E.3.2.1. Függelék).

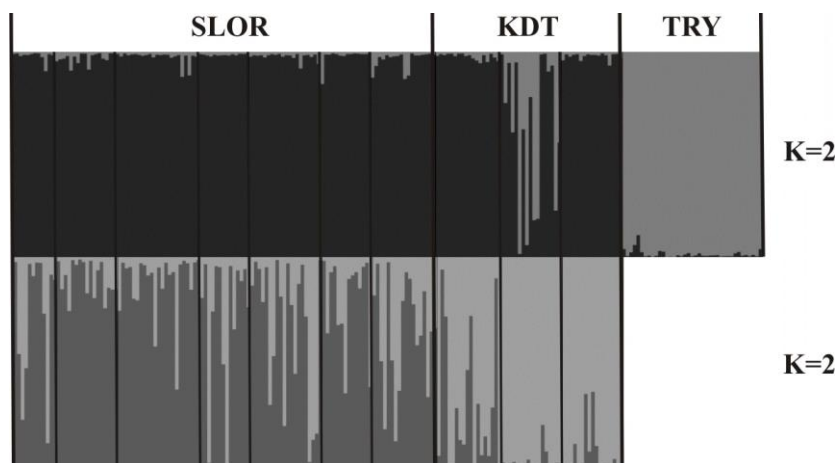
Eredmények és értékelésük

A vizsgált lápi tarkalepke populációk átlagos szintű enzimpolimorfizmussal jellemezhetők a Melitaeini tribuszon belül: az átlagos allélszám 2,17 volt (Melitaeini átlag 2,12), míg a heterozigóták átlagos gyakorisága 0,133 (Melitaeini átlag 0,151) (E.3.2.1. táblázat és E.3.2.2. függelék). Bár a polimorfizmus minden mutatója alacsonyabbnak mutatkozott a később definiált SLOR (Szlovénia+Őrség) régióban, ezek egyike sem bizonyult szignifikánsnak (E.3.2.1. táblázat: ANOVA).

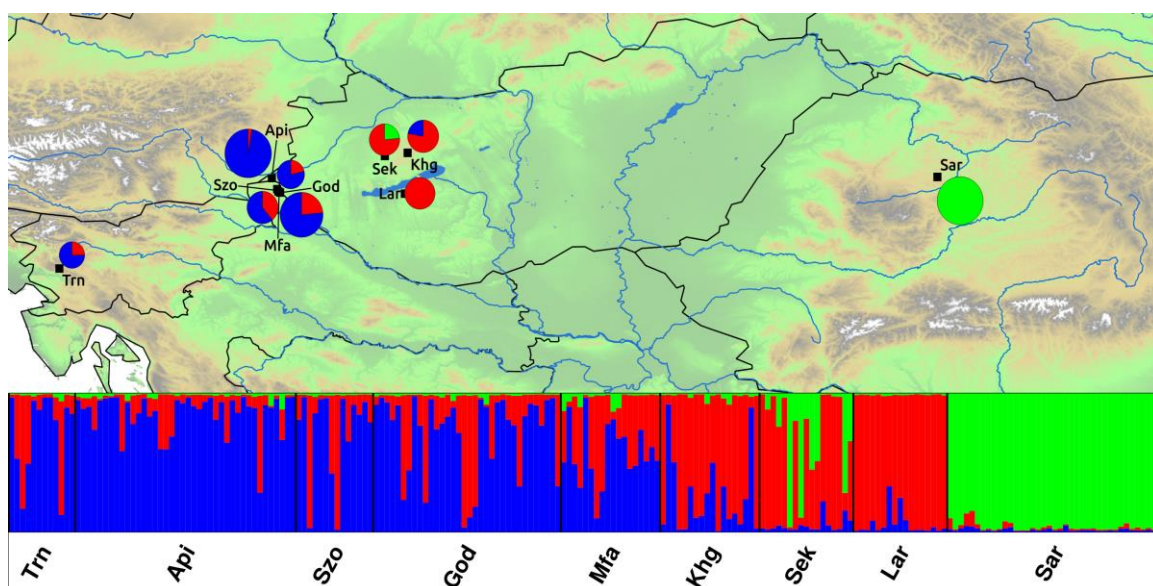
E.3.2.1. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói az *E. aurinia* régiókban. SLOR: a szlovén minta és az őrségi régió; KDT: Közép-Dunántúl; TRY: Erdély. Np/r: a populációk száma a régióon belül; N/p: az átlagos mintaszám; n_A: az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=10); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P₉₅: a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján; Fix%: a fixálódott allélok aránya. Átlag: régiós átlagok; ANOVA: a régiók átlagos mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség.

		Np/r	N/p	n _A	Ar	Ho	P ₉₅	%Fix
Átlag	SLOR	5	22.92	2.13	1.88	0.122	0.578	0.208
	KDT	3	16.91	2.20	1.99	0.157	0.593	0.186
	TRY	1	37.39	2.22	1.93	0.119	0.444	0.250
	Totál	-	22.52	2.17	1.93	0.133	0.568	0.206
ANOVA	F _{2,7}	-	-	1.72	1.79	1.93	2.47	1.34
	P	-	-	0.247	0.236	0.214	0.155	0.320

A lápi tarkalepke populációk genetikai struktúrájának elemzése során először Bayes-féle klaszteranalízist végeztünk az egyedek sok lokuszos genotípusai alapján. Az eredmények azt valószínűsítették, hogy 2 klaszter (K=2) van jelen az általunk vizsgált mintákban (E.3.2.3. függelék). A két klaszter genetikai összetétele jelentősen különbözött egymástól különösen az *EstC* és *LdhB* lokuszokon. A két klaszter egyedekben való megoszlása alapján az erdélyi populáció egyértelműen elkülönült a nyugati populációktól (E.3.2.2. ábra). Amikor azonban a Bayes-féle klaszteranalízist a 8 nyugati populáció esetében végeztük el, a klaszterek legvalószínűbb száma szintén K=2 volt. Ebben az analízisben is két populáció csoport különült el a klaszterek egyedekben való megoszlása alapján: a szlovén és az őrségi populációk (SLOR), valamint a közép-dunántúli populációk (KDT: Bakony és Somogy) (E.3.2.2. ábra). Ezért megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy 3 klaszter van jelen (K=3) az összes populációban (E.3.2.3. függelék).



E.3.2.2. ábra: A Bayes-féle klaszteranalízis eredménye az *E. aurinia* populációkban. A felső ábra az összes populáció egyedeinek klaszterösszetételét mutatja K=2 esetén. Az alsó ábrán csak a nyugati populációk szerepelnek. SLOR: a szlovén és az őrségi populációk; KDT: a közép-dunántúli populációk; TRY: Erdély.

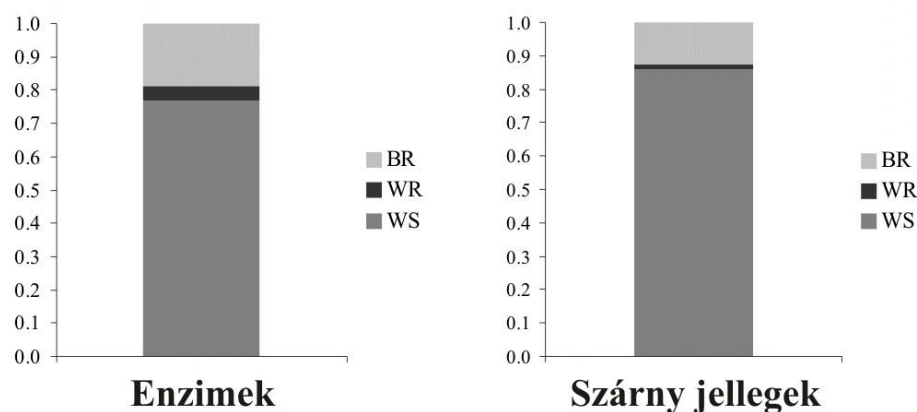


E.3.2.3. ábra: A Bayes-féle klaszter analízis eredményei K=3 esetén. Az ábra alsó részén az egyedek klaszter besorolási koefficienseinek oszlopdigramjai láthatók. A térképen a kördiagramok a koefficiensek átlagos megoszlását mutatják a vizsgált populációkban. A színek az egyes klasztereket jelképezik. A minták rövidítése ugyanaz, mint az E.3.2.1. ábrán.

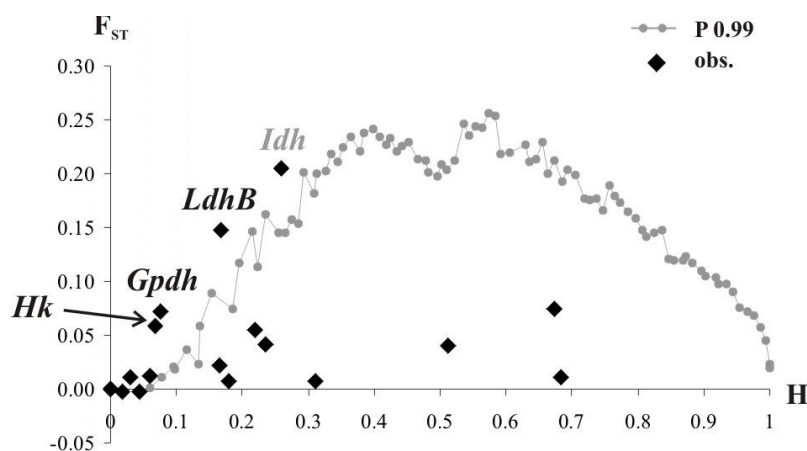
A 3 klaszter megoszlása az egyedekben egyértelmű regionális struktúrát tárt fel a vizsgált populációkban, amennyiben mindhárom régióban egy-egy klaszter dominált (E.3.2.3. ábra). Az erdélyi populációt (TRY: Sar) jellemző klaszterben két lokuszon is egyedi allélok jelentek meg (*EstC3* és *LdhB4*); ráadásul ezeknek az egyedi alléloknak (különösen az *LdhB4* allélnak) meglehetősen magas volt a frekvenciája ($p=0,588$). A közép-dunántúli populációkban (KDT) egy másik klaszter volt túlsúlyban, melyet két klaszter specifikus allél jellemzett (*Idh2* és *6Pgdh5*). Az őrségi és a szlovén populációkban (SLOR) pedig egy

harmadik klaszter dominált, amelyben nem jelentek meg klaszter specifikus allélok, de néhány allél frekvenciája markánsan eltért a másik két klasztertől (pl. *Pgi10*).

A régiók közötti intenzív differenciálódást az AMOVA eredménye is alátámasztotta: a régiók közötti variancia komponens (18,6%) több mint a háromszorosa volt a régiókon belülinek (4,5%) (E.3.2.4. ábra: Enzimek). Ennek megfelelően a régiók közötti fixációs index messze magasabb volt ($F_{CT}=0,186$), mint a régiókon belüli ($F_{SC}=0,050$).



E.3.2.4. ábra: Az AMOVA (enzimek) és a hierarchikus ANOVA (szárny jellegek) eredményei. BR: régiók közötti variancia komponens; WR: a régióon belül, a populációk közötti variancia komponens; WS: a mintákon belüli variancia komponens.

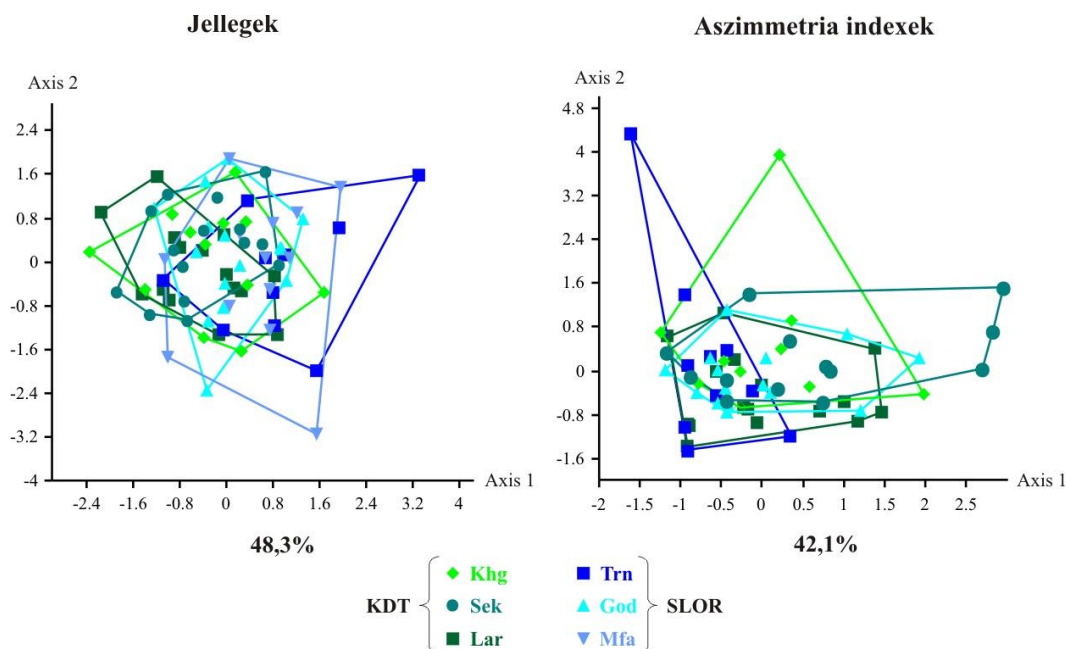


E.3.2.5. ábra: A kiugró differenciálódást mutató lokuszok analízisének eredménye az *E. aurinia* nyugati populációiban (SLOR és KDT régiók). Szürke pontok és folytonos vonal (P 0,99): a szimulált fixációs index értékek 99%-os konfidencia intervalluma; Fekete rombuszok (obs.): a tapasztalt F_{ST} értékek; H: a „populációk” (klaszter régiók) közötti heterozigotás mértéke. A vártól szignifikánsan magasabb differenciálódást mutató lokuszok ki vannak emelve. A három, fekete betűvel jelölt lokusz mind az öt párhuzamos futásban a 99%-os konfidencia limitnél magasabb F_{ST} értéket mutatott.

A nyugati populációk genetikai struktúráját tekintve azt találtuk a legmeglepőbbnek, hogy a földrajzilag közeli SLOR és KDT régiók genetikai állománya mennyire különböző volt. Ezzel párhuzamosan, a populációk közötti földrajzi távolságok nem korreláltak szignifikánsan a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokkal ($R=-0,1$; $P=0,472$), vagyis a

távolsággal arányos izoláció modellje nem érvényesült ezekben a populációkban. Ezért megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a neutrális folyamatokon túlmenően szerepet játszik-e a diverzifikáló szelekció a differenciálódás kialakításában, vagyis kiugró differenciálódást mutató lokuszokat kerestünk ebben a két régióban. Az adatokat úgy hoztuk létre, hogy összeömlesztettük a két régió populációit; a fixációs indexek random eloszlását pedig a LOSITAN program segítségével szimuláltuk a régiók közötti heterozigótaság függvényében. Három lokuszon (*Gpdh*, *Hk* és *LdhB*,) tapasztaltunk szignifikánsan nagyobb differenciálódást, mint az drift-migráció egyensúlyban várható lenne, következésképpen mind az öt párhuzamos futásban (E.3.2.5. ábra).

Az *E. aurinia* populációk fenotípusos variációjának a vizsgálata során először hierarchikus variancia analízist végeztünk, amelyben a hierarchia szintek ugyanazok voltak, mint az AMOVA-ban (a régiók közötti, az egyes régiókban belül a populációk közötti és a populációkon belüli variancia komponensek). A hierarchikus ANOVA eredményeként feltárt mintázat hasonló volt a genetikai differenciálódás mintázatához: a régiók között messze magasabb szintű fenotípusos differenciálódást tapasztaltunk, mint a régiókban belül (E.3.2.4. ábra: Szárny jellegek).

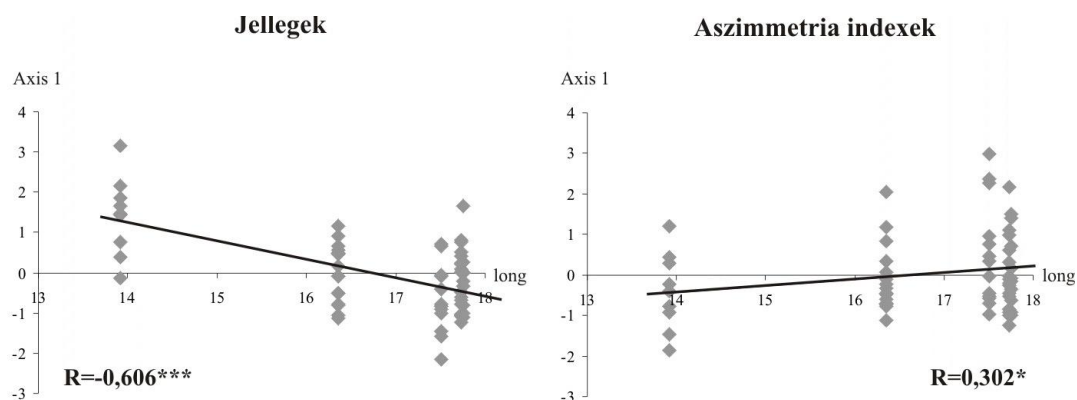


E.3.2.6. ábra: A PCA eredménye a vizsgált *E. aurinia* populációkban az egyedek mért jellegei, és standard aszimmetria indexei alapján. KDT: Közép-Dunántúl; SLOR: Szlovénia és az Őrség. A minták rövidítése ugyanaz, mint az E.3.2.1. ábrán.

A továbbiakban a fenotípusos változatosság szerkezetét a nyugati régiókban (KDT és SLOR) vizsgáltuk, amit az indokolt, hogy a KDT régió populációi a faj nyugat-európai elterjedési területének a keleti peremén helyezkednek el. Az első lépésben főkomponens analízist végeztünk az egyedeken mért adatok alapján. Bár a populációkat jelképező pontfelhők között nagy volt az átfedés, egyfajta eltolódást tapasztaltunk közöttük az első tengely mentén, ami párhuzamban állt kelet-nyugati elhelyezkedésükkel (E.3.2.6. ábra: Jellegek). Így a következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy van-e korreláció a populációk földrajzi hosszúsági foka, és az egyedek első tengely mentén kapott koordinátái között. A PCA első tengelye ugyanis a teljes fenotípusos variancia 48,3%-át magyarázta

meg. A korreláció mértéke szignifikáns volt, ami azt jelezte, hogy a PCA első tengelyét döntően meghatározó jellegek (az elülső és a hátulsó szárny mérete) egy klin mentén változnak kelet felé haladva (E.3.2.7. ábra: Jellegek). Nevezetesen, a szárny mérete csökkenő tendenciát mutatott az elterjedési terület pereme felé haladva.

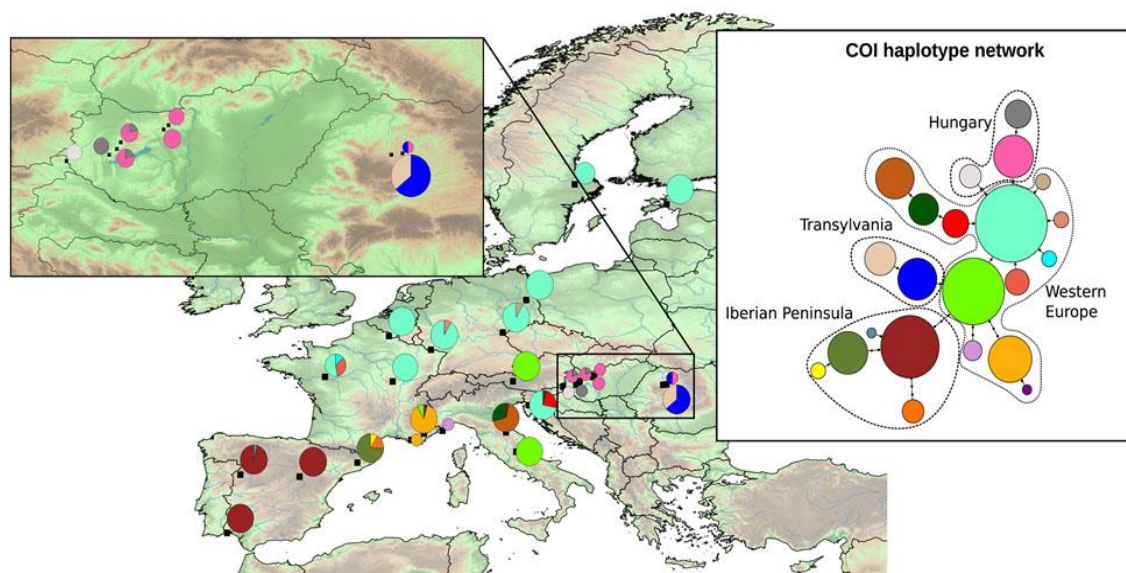
A morfometriai vizsgálatok következő lépésében az egyedek aszimmetriáját elemeztük 5 nyugati populációban (SLOR: Trn, God; KDT: Khg, Sek és Lar), 6 jellegen. Először a fluktuáló aszimmetria mértékét határoztuk meg a populációkban. A fluktuáló aszimmetria a 6 jelleg és az 5 populáció átlagában a fenotípusos varianciának mintegy 10%-át tette ki. A legaszimmetrikusabb jellegek az elülső és a hátulsó szárny tövi szögei voltak (13,4%), míg a legaszimmetrikusabb populáció a szlovén Trnovsky Gozd (Trn) volt (15,6%). A továbbiakban minden egyedre megállapítottuk az egyes jellegek standardizált aszimmetria indexeit, majd egy PCA analízisnek vetettük alá őket. A populációkat megtestesítő pontfelhők ebben az analízisben is átfedőek voltak, de a pontfelhők eltolódásának a trendjét itt is érzékeltük (E.3.2.6. ábra: Aszimmetria indexek). Ezért, a morfológiai jellegekhez hasonlóan, az aszimmetria indexek esetében is vizsgáltuk a korreláció mértékét az egyedek első tengely mentén számított koordinátái, és a populációk hosszúsági foka között. Az első tengely az aszimmetria indexek teljes varianciájának 42,1%-át magyarázta, és meghatározásában a hátulsó szárny hosszának volt döntő szerepe, valamint kisebb mértékben a hátulsó szárny tövi szögének. Ez a korreláció is szignifikánsnak bizonyult, jelezvén, hogy az elterjedési terület pereme felé haladva fokozódik a hátulsó szárny aszimmetriája (E.3.2.7. ábra: Aszimmetria indexek).



E.3.2.7. ábra: Korreláció az egyedeken mért jellegek, illetve azok standardizált aszimmetria indexei és a populációk hosszúsági foka között. Mind a jellegeket, mind pedig az aszimmetria indexeket a PCA első tengelye mentén kapott egyedi koordináták jellemezték (Axis 1). long: a populációk földrajzi hosszúsági foka; R: korrelációs koefficiens. Szignifikancia szint: *** $0,001 > P$; * $0,05 > P > 0,01$.

A mtDNS COI szekvencia analízisének első lépésében illesztettük a vizsgált egyedekből kapott és az NCBI adatbázisból nyert szekvenciákat. Illesztés után egy 616 bp hosszúságú, folytonos COI szekvencia állt a rendelkezésünkre. Ezen a szakaszon 29 variábilis pozíció jelent meg az egyedekben, melyek közül 26 bizonyult informatívnak. A Kárpát-medencében 5 specifikus haplotípust detektáltunk, melyek Európa többi részén nem voltak megtalálhatók (E.3.2.8. ábra). Erdélyben 2, míg a dunántúli populációkban 3 specifikus haplotípus fordult elő, melyek viszonylag távoli leszármazási kapcsolatban álltak egymással. A Kárpát-medence keleti és nyugati populációiban csak egyetlen közös haplotípust tudtunk kimutatni.

Ez a haplotípus volt a leggyakoribb a KDT régióban, míg Erdélyben egyetlen egyedben jelent meg (E.3.2.8. ábra). A mtDNS COI szekvenciájának analízise alátámasztotta tehát azt az előzetes várakozásunkat, hogy a Kárpát-medence nyugati és keleti populációi erősen differenciálódtak egymástól. Ugyanakkor nem voltak közös haplotípusok a nyugat- és a közép-dunántúli mintákban (E.3.2.8. ábra), ami azt jelezte, hogy a két dunántúli régió a COI szekvencia vonatkozásában is differenciálódott egymástól. A *Wolbachia* fertőzöttség átlagos mértéke 72,2% volt a Kárpát-medencében, ami 20% és 100% között változott a vizsgált populációkban. Minden egyedben ugyanazt a törzset (WSP=575) mutattuk ki.



E.3.2.8. ábra: A mtDNS COI haplotípus hálózata és az egyes haplotípusok megoszlása az *E. aurinia* európai populációiban. A kinagyított térkép részlet a Kárpát-medence populációinak a haplotípus megoszlását mutatja.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a lápi tarkalepke populációkban átlagos szintű enzimpolimorfizmust tapasztaltunk ($n_A=2,17$; $H_o=0,133$), ami jó egyezésben van más tanulmányok eredményeivel. Junker *et al.* (2015) például 46 európai populációban átlagosan 2,3 allélt találtak 17 enzim lokuszon, míg Joyce & Pullin (2003) 2,1 allélt detektáltak 13 angol populációban 7 polimorf lokuszon.

Az *E. aurinia* Kárpát-medencei populációinak genetikai struktúrája első megközelítésben a várakozásunknak megfelelő kelet-nyugat irányú differenciálódást mutatta. Mind az enzimpolimorfizmus, mind pedig a COI szekvencia adatok alapján végzett analízisekben alapvetően azt tapasztaltuk, hogy az erdélyi populáció elkülönült a nyugatiaktól. Ugyanakkor az eredmények mindkét marker esetében arra is rámutattak, hogy a nyugati populációkat további strukturáltság jellemzi, nevezetesen két világosan differenciálódott régiót alkotnak (SLOR és KDT). Junker *et al.* (2015) európai skálán vizsgálták az *E. aurinia* enzimpolimorfizmusát, valamint a mtDNS COI szekvencia változatosságát. Eredményeik alapján megállapították, hogy a lápi tarkalepke európai populációi erősen strukturáltak. Arra nézve is állítottak fel hipotéziseket, hogy hol lehettek a faj refúgium területei az utolsó eljegesedés során, valamint hogy ezekből a refúgiumokból milyen útvonalon kolonizálta a faj Európát. Elképzeléseik szerint a Kárpát-medence nyugati területei perialpin refúgiumokból népesülhettek be, míg Erdélyben egy önálló refúgiumot valószínűsítettek.

Eredményeink nem támasztják alá a dunántúli populációk perialpin eredetét, mivel az itt detektált haplotípusok specifikusak, más európai területen, így az Alpok peremén sem jelennek meg. Úgy tűnik tehát, hogy a Kárpát-medence nyugati területei vagy maguk is önálló refúgiumok (esetleg két kisebb refugiális terület) lehettek az utolsó eljegesedés során, vagy pedig a Balkán felől népesültek be. Ezt a kérdést akkor lehet korrekt módon megválaszolni, ha megfelelő adatokkal rendelkezünk a balkáni területeken előforduló COI haplotípusokról. Adataink alapján viszont bizonyos, hogy a Kárpát-medence nyugati és keleti populációi más refúgiumokból és/vagy más útvonalon érték el jelenlegi elterjedésüket.

A két marker által feltárt genetikai struktúra annak ellenére is hasonló volt, hogy a rájuk ható evolúciós erők idősíkjá eltérő. A Balkán északnyugati területeiről származó COI szekvenciák hiányában jelenleg nem tudjuk megállapítani a két dunántúli régió eredetét, és így differenciálódásuk történeti háttérét sem. Az enzim lokuszokon tapasztalt regionális mintázatot viszont értelmezni tudjuk a diverzifikáló szelekció feltételezésével, amit egyértelműen jeleztek a kiugró differenciálódást mutató lokuszok a két régió között. A lokális adaptáció azonban csak akkor valószínűsíthető, ha a különböző populációk eltérő környezeti hatásoknak vannak kitéve. A SLOR régió klímája kissé hűvösebb, és humidabb, mint a KDT régióé. Az *E. aurinia* szárazabb és üde nedves réteken egyaránt előfordul (pl. Saarinen, Jantunen, & Valtonen, 2005; Betzholtz *et al.*, 2007). Úgy tűnik tehát, hogy az eltérő klimatikus sajátságok különböző adaptív stratégiák kialakulásához vezettek a két régióban.

A fenotípusos változatosság elemzése során, azonban eltérő mintázatot tapasztaltunk, ami elsősorban a nyugati populációkban (SLOR és KDT) mutatkozott meg. Szemben a molekuláris markerek vizsgálata során tapasztalt regionális mintázattal, a dunántúli és a szlovén populációkban egy földrajzi klint sikerült kimutatni, vagyis a faj nyugati elterjedési területének keleti pereme felé haladva egyre csökkent az egyedek szárnymérete. Az elterjedési terület peremén élő populációk két ellentétes hatásnak vannak kitéve: aszimmetrikus génáramlás a centrumból a perem felé, és klinálisan változó szelekció (García-Ramos & Kirkpatrick, 1997; Kirkpatrick & Barton, 1997). A genetikai adatok alapján a centrumból a perem felé történő aszimmetrikus génáramlás kevésbé valószínű a két régió között. Mivel a szárnyméret fokozatos csökkenésével párhuzamosan, egyre nőtt az egyedek hátulsó szárnyának az aszimmetriája, ezért inkább a klinálisan változó szelekció hatását tételezhetjük fel. A perem helyzetű populációkban a faj számára kedvezőtlen környezeti tényezők sztochasztikus változása erősebb, mint a centrumban lévőké, ami lényegében egyre intenzívebb környezeti stresszt eredményez ezekben, a periférikus populációkban. A környezeti stressz pedig fokozza a fluktuáló aszimmetria megjelenését az egyedeken (pl. Leary & Allendorf, 1989; Lens, Van Dongen, & Matthysen, 2002; Jentzsch, Köhler, & Schumacher, 2003).

E.4. Konzervációgenetikai egységek

A konzervációgenetikai kutatások eredményei sok tekintetben biztosítanak elméleti háttérrel a mindennapi természetvédelmi munkához. Elsősorban azok az eredmények, amelyek a populációk genetikai variabilitásának a szerkezetét tárják fel. A genetikai differenciálódás mintázata alapján ugyanis megállapítható, hogy egy veszélyeztetett faj milyen konzervációgenetikai szempontból jelentős egységekből épül fel. Az evolúciósan szignifikáns egységek (ESU) ökológiai és genetikai értelemben jól elkülönült monofiletikus taxonok, amelyek gyakran rendelkeznek önálló áréával (Moritz, 1994; Crandall *et al.*,

2000). Az ESU-k elkülönülése tehát nagyobb földrajzi léptékben például európai skálán figyelhető meg. Ugyanakkor az ESU-kon belül lehetnek olyan populációk, amelyek kiemelt fontosságúak egy ESU genetikai variabilitásának a megőrzése szempontjából (Palsbøll *et al.*, 2007), ezek a funkcionális konzervációs egységek (FCU). Az FCU-k tehát egy földrajzilag kisebb skálán is elkülönülhetnek egymástól, például a Kárpát-medencén belül.

E.4.1. Evolúciósan szignifikáns egység (ESU)

E.4.1.1. *Maculinea* fajok

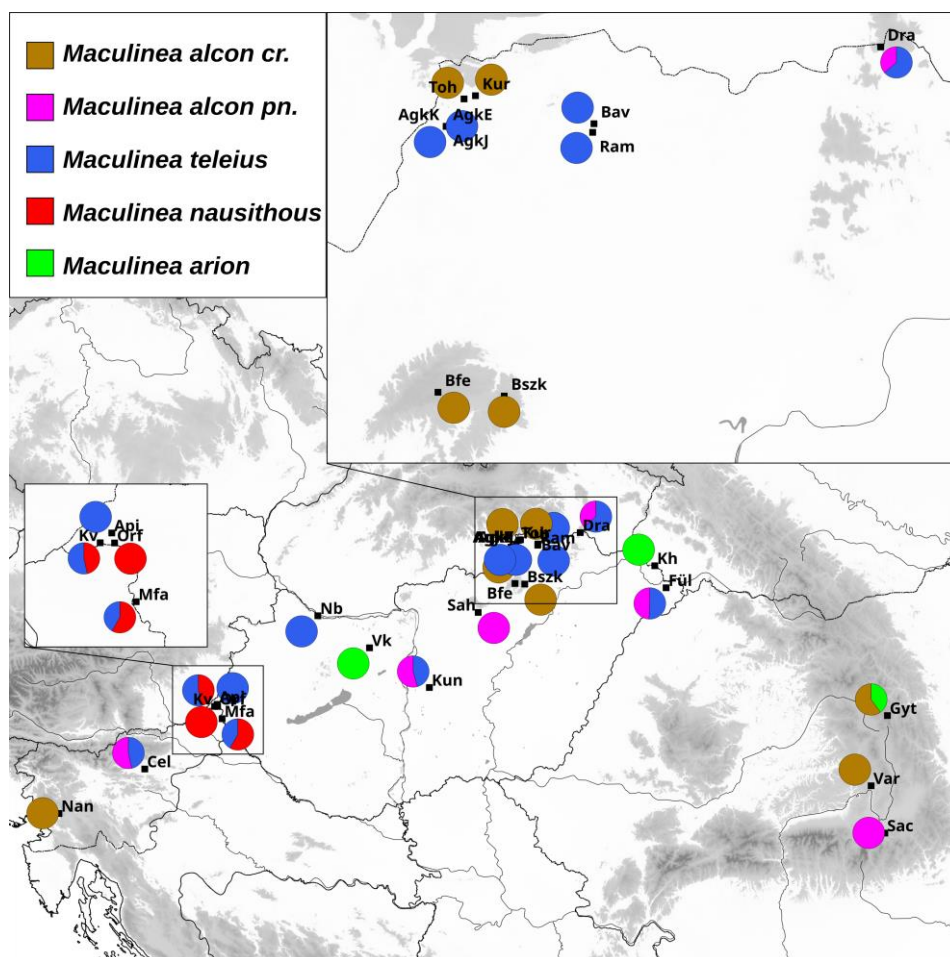
A 4.1.1. fejezet alapvetően a következő cikk alapján készült:

Pecsenye, K., Bereczki, J., Tihanyi, B., Tóth, A., Peregovits, L. and Varga, Z. 2007. Genetic differentiation among the *Maculinea* species (Lepidoptera, Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 11-21. (IF: 2,445)

Elméleti háttér

A korábbi közleményekben Európában öt *Maculinea* fajt különítettek el elsősorban ökológiai jellemzőik, illetve fenotípusos megjelenésük alapján: *M.alcon*, *M.rebeli* (helyesen *M.alcon* f. *xerophila*), *M.arion*, *M.nausithous* és *M.teleius* (lásd Anyagok és módszerek 1.3. fejezet) (Elmes & Thomas, 1987; Thomas *et al.*, 1989; Elmes *et al.*, 1994). Az ökológiai különbségek lényegében a hangyaboglárka fajok sajátos életmenetének eltéréseiből adódtak. A hangyaboglárkák két specifikus forrást hasznosítanak egyedfejlődésük során: az első három lárv stádiumban a tápnövényt, majd a IV stádiumban a hangyagazdát. Az öt feltételezett faj esetében a két forrás különböző kombinációban jelenik meg (részleteiben lásd az Anyagok és módszerek 1.3. fejezetében). A *M.alcon* tápnövénye a *Gentiana pneumonanthe* (Fürst & Nash, 2010; Czekes *et al.*, 2014), és elsődlegesen a *Myrmica scabrinodis*, valamint a *My.ruginodis* fészkeket parazitálja (Thomas *et al.*, 1989; Gadeberg & Boomsma, 1997), bár területenként lehetnek eltérések a hangyagazda fajok tekintetében (Tartally *et al.*, 2008). A továbbiakban ezt a taxont *M.alcon* pneumonanthe típus néven említem. A korábbi közleményekben *M.rebeli*-ként aposztrofált *M.alcon* f. *xerophila* tápnövénye a *G.cruciata* (Árnyas *et al.*, 2006, 2009), fő hangyagazdája pedig a *My.schenki* (Steiner *et al.*, 2003; Tartally & Csősz, 2004). Ez a taxon a továbbiakban a *M.alcon* cruciata típus néven szerepel. A *M.teleius* tápnövénye a *Sanguisorba officinalis* (Thomas, 1984; Thomas & Wardlaw, 1992; Thomas & Elmes, 2001; Nowicki *et al.*, 2007), míg hangyagazdaként több *Myrmica* fajt is használ, de főleg a *My.scabrinodis*-t illetve a *My.rubra*-t (Stankiewicz & Sielezniew, 2002; Tartally & Varga, 2008; Witek *et al.*, 2010). A *M.nausithous* tápnövénye szintén a *Sanguisorba officinalis* (Thomas, 1984; Thomas & Wardlaw, 1992; Thomas & Elmes, 2001; Nowicki *et al.*, 2007), és hangyagazdája szinte kizárólagosan a *My.rubra* (Thomas, 1984; Thomas *et al.*, 1989; Tartally *et al.*, 2008). A *M.arion* *Thymus* és *Origanum* fajokra petézik, míg hangyagazdaként szinte csak a *My.sabuleti*-t használja (Tartally *et al.*, 2008), bár Észak-Lengyelországban más hangyagazdát is kimutattak, mint például a *My.rugulosa* és a *My.hellenica* (Sielezniew & Stankiewicz, 2008), vagy a *My.lobicornis* (Sielezniew, Dziekańska, & Stankiewicz-Fiedurek, 2010). A két forrás kombinációiból adódóan a feltételezett öt faj különböző habitatokban fordul elő. A *M.alcon* (pneumonanthé típus), a *M.nausithous* és a *M.teleius* üde réteken, akár együtt is megtalálható, míg a *M.alcon* f. *xerophila* (cruciata típus) és a *M.arion* szárazabb habitatokban él.

A molekuláris technikák alkalmazásának eredményei azonban megkérdőjelezték a *Maculinea* fajok taxonómiai helyzetét. Als *et al.* (2004) két mtDNS (COI és COII) és egy nukleáris (EF1- α) szekvencia analízise során azt tapasztalták, hogy a *Maculinea* genuszon belül 4 taxon különül el a filogenetikai törzsfán, vagyis a *M. alcon* (pneumonanthé típus) és a *M. alcon* f. *xerophila* (cruciata típus) egyedek azonos ágba klasztereződtek. Az enzimpolimorfizmus vizsgálata során Bereczki *et al.* (2005) is a két faj közötti genetikai differenciálódás hiányát tapasztalta a közép-európai populációkban.



E.4.1.1. ábra: A *Maculinea* fajok mintái a Kárpát-medencében és Szlovéniában.

A *M. alcon* pneumonanthé típusának mintahelyei (barna): Drahos-rét (Dra), Fülesd (Fül), Sárhegy (Sar), Kunpeszér (Kun), Celje (Cel) és Sacele (Sac).

A *M. alcon* cruciata típusának mintahelyei (magenta): Tohonya-völgy (Toh), Kuriszlán (Kur), Bükk-fennsík (Bfe), Bükkszentkereszt (Bszk), Nanos (Nan), Gyilkos-tó (Gyt) és Vargyas (Var).

A *M. teleius* mintahelyei (kék): Drahos-rét (Dra), Aggtelek (Agk), Barakonyi-völgy (Bar), Rakacsmeszes (Ram), Fülesd (Fül), Kunpeszér (Kun), Nagybjacs (Nb), Apátistvánfalva (Api), Kétvölgy (Kv), Magyarszombatfa (Mfa) és Celje (Cel).

A *M. nausithous* mintahelyei (piros): Kétvölgy (Kv), Magyarszombatfa (Mfa) és Orfalu (Orf).

A *M. arion* mintahelyei (zöld): Kaszonyi-hegy (Kh), Vérteskozms (Vk) és Gyilkos-tó (Gyt).

Célkitűzések

Munkánk célkitűzése az volt, hogy megállapítsuk a genetikailag differenciálódott, kölcsönösen monofiletikus taxonok, vagyis az ESU-k számát a *Maculinea* genuszon belül.

Az előzetes eredmények alapján azt vártuk, hogy a mi vizsgálataink is 4 *Maculinea* faj genetikai elkülönülését igazolják, vagyis nem találunk majd világos genetikai differenciálódást a *M. alcon* pneumonanthe és cruciata típusának populációi között. Hipotézisünk tesztelésére az öt feltételezett faj 32 közép-európai populációjából gyűjtöttünk mintákat. A taxonok közötti differenciálódás mértékét az enzimpolimorfizmus vizsgálata révén állapítottuk meg.

Minták

A *Maculinea* fajok mintáit 25 helyről gyűjtöttük a Kárpát-medencében és Szlovéniában. A *M. alcon* pneumonanthe típusából 6, a cruciata típusból 7, a *M. teleius*-ból 13, a *M. nausithous*-ból 3 és a *M. arion*-ból szintén 3 minta állt a rendelkezésünkre. Mivel a minták összes száma (32) meghaladja a mintahelyeket, így egyértelmű, hogy néhány esetben ugyanarról a mintahelyről 2 faj gyűjtése is történt (E.4.1.1. ábra, E.4.1.1. függelék). Így a *M. alcon* pneumonanthe típusát és a *M. teleius*-t 4 (Fül, Dra, Kun, Cel); a *M. teleius*-t és a *M. nausithous*-t 2 (Kv, Mfa); míg a *M. alcon* cruciata típusát és a *M. arion*-t 1 (Gyt) mintahelyen gyűjtöttük párhuzamosan. Valamennyi mintát 2002-ben gyűjtöttük. A *M. alcon* pneumonanthe típusának mintáiban 169, a cruciata típus mintáiban 172, a *M. teleius* mintákban 322, a *M. nausithous* mintáiban 57, míg a *M. arion* mintákban 44 egyed enzimpolimorfizmusát elemeztük 16 lokuszon.

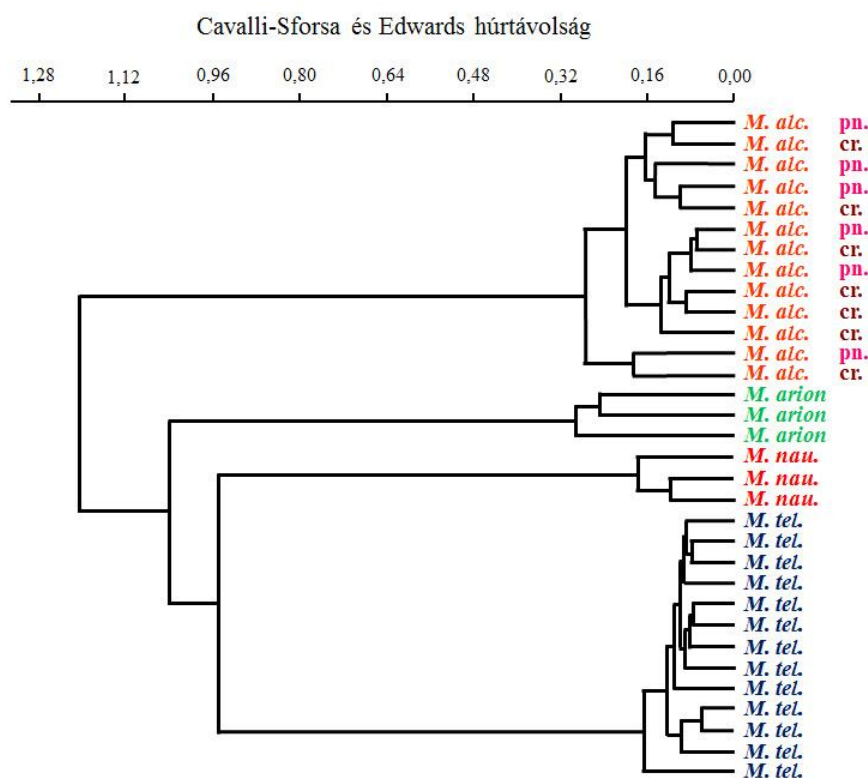
Eredmények és értékelésük

A *Maculinea* fajok variabilitása meglehetősen alacsonynak bizonyult, a lokuszonkénti átlagos allélszám 1,40 és 1,71 között változott az egyes fajokban, míg a heterozigóták átlagos gyakorisága 0,080 és 0,194 közé esett. A legvariábilisabb fajnak a *M. arion* bizonyult. A vizsgálatok következő lépésében diagnosztikus allélokat kerestünk az egyes fajokban. Lényegében mind a 4 faj esetében találtunk fajspecifikus allélokat: a *M. alcon* cruciata és pneumonanthe típusának közös egyedi alléljai (3) az Aox lokuszon jelentek meg; a *M. arion* több lokuszon is rendelkezett specifikus allélokkal (*Gdh*: 1, α *Gpdh*: 1, *Hk*: 2, *Mdh*: 1); a *M. teleius* populációkban összesen 5 diagnosztikus allélt detektáltunk (*Aox*: 1, *Gdh*: 1, *G6pdh*: 1, α *Gpdh*: 2); míg a *M. nausithous* egyedekben 1-et (*Me*).

A fajok genetikai struktúrájának analizésében az első lépés a Wright-féle F-statisztika indexeinek meghatározása volt. Az F_{ST} értékeket különböző adathalmazokon számítottuk ki. Amikor a differenciálódást a 4, illetve az 5 faj között vizsgáltuk, az egyes fajok populációinak adatainak összeomlesztettük. Az F_{ST} értéke 0,837 (4 faj) és 0,816 (5 faj) volt (E.4.1.1. táblázat). Mindkét analizisben 8 olyan lokuszt találtunk (*Gdh*, *GotB*, *G6pdh*, α *Gpdh*, *Hk*, *Mdh*, *Me* és *Pgi*), melyeken az F_{ST} értéke 0,9 fölött volt, ami gyakorlatilag komplett differenciálódásra utalt a fajok között. A 8 lokusz közül 6-on azonosítottunk diagnosztikus (fajspecifikus) allélokat. A továbbiakban az F-statisztika indexeit az egyes fajok populációira külön-külön számítottuk ki. Ezek az F_{ST} értékek jóval alacsonyabb differenciálódást mutattak a fajokon belül, mint akár a 4, akár az 5 faj között (E.4.1.1. táblázat). Meg kell azonban jegyezni, hogy a legmagasabb F_{ST} értékeket a *M. alcon* populációk között tapasztaltuk akár az összes populációt együtt elemeztük, akár a két típust külön-külön (E.4.1.1. táblázat). Amikor azonban a *M. alcon* két típusának populációit ömlesztettük össze, és közöttük határoztuk meg a differenciálódás mértékét, akkor alacsonyabb F_{ST} értéket kaptunk, mint bármelyik, a *M. alcon* populációkat érintő analizisben (E.4.1.1. táblázat). A differenciálódás másik két mutatója is hasonló mintázatot tárt fel a 4 *Maculinea* faj, illetve a *M. alcon* két ökotípusa között (E.4.1.1. táblázat).

E.4.1.1. táblázat: A differenciálódás mérőszámai a *Maculinea* fajokon belül és azok között. *M.alcon* pop.: a *M.alcon* összes vizsgált populációja; *M. a. pneu.*: a *M.alcon* pneumonanthe típusú populációi; *M. a. cruci.*: a *M.alcon* cruciata típusú populációi; *M.alcon* (2 ökotípus): a *M.alcon* populációk két ökotípusának mintáit összevontuk a mérőszámok számítása során; Totál (4 faj), illetve Totál (5 faj): a fajok populációinak összevont adatai alapján megállapított mérőszámok. Np/faj: a populációk száma a fajokban; F_{ST} : fixációs index; D: a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlaga; Nm: a migránsok effektív száma. Szignifikancia szint: ** 0,05>P>0,01.

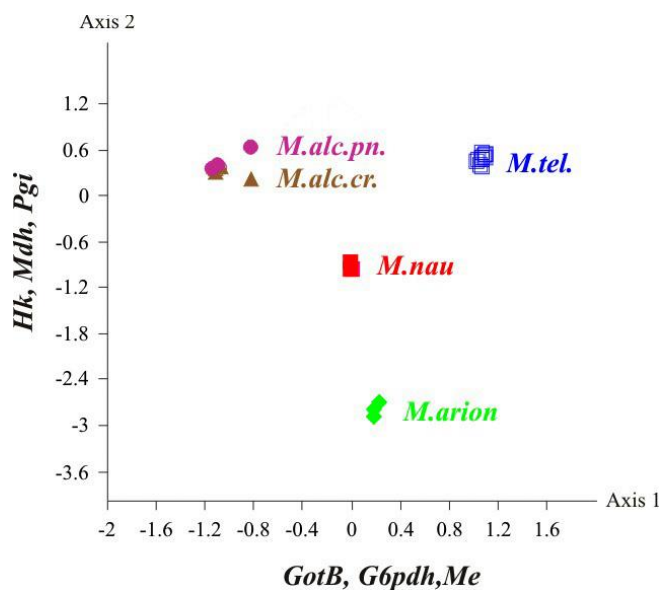
Species	Np/faj	F_{ST}	D	Nm
<i>M.alcon</i> pop.	13	0,138**	0,199	1,35
<i>M. a. pneu.</i>	6	0,182**	0,220	0,68
<i>M. a. cruci.</i>	7	0,110**	0,193	1,59
<i>M.alcon</i> (2 ökotípus)	2	0,012**	0,064	2,48
<i>M. teleius</i>	13	0,038**	0,119	5,65
<i>M. nausithous</i>	3	0,067**	0,160	0,59
<i>M. arion</i>	3	0,097**	0,279	1,69
Totál (4 faj)	4	0,837**	1,062	0,05
Totál (5 faj)	5	0,816**	0,983	0,08



E.4.1.2. ábra: A vizsgált *Maculinea* populációkban tapasztalt Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogram. *M. alc. pn.*: a *M.alcon* pneumonanthe típusa; *M. alc. cr.*: a *M.alcon* cruciata típusa; *M. tel.*: *M. teleius*; *M. nau.*: *M. nausithous*.

A *Maculinea* fajok genetikai struktúrájának elemzése során a következő lépés egy UPGMA dendrogram szerkesztése volt a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján. A dendrogram minden vonatkozásban alátámasztotta a Wright-féle F-statisztika eredményeit. A dendrogramon 4 fő ág különült el, a 4 fajnak megfelelően (E.4.1.2. ábra). A *M. alcon* két ökotípusának populációi még az *alcon* fő ágon belül sem különültek el önálló alágakban (E.4.1.2. ábra).

A populációk allélfrekvencia adatai alapján végzett PCA eredménye megerősítette az F-statisztika eredményét és a dendrogramot. Egyértelműen 4 pontthalmaz különült el a változók redukált terében, a 4 fajnak megfelelően (E.4.1.3. ábra).



E.4.1.3. ábra: A populációk allélfrekvencia adatai alapján végzett PCA analízis eredménye a *Maculinea* fajokban. *M. alc. cr.*: *M. alcon* cruciata típus; *M. alc. pn.*: *M. alcon* pneumonanthe típus; *M. tel.*: *M. teleius*; *M. nau.*: *M. nausithous*. A tengelyeket elsődlegesen meghatározó lokuszok fel vannak tüntetve a tengelyek mentén.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a Kárpát-medencében található *Maculinea* fajok enzimpolimorfizmusa jelentősen alacsonyabb, mint a Polyommatinae alcsalád eddig tanulmányozott fajainak átlaga. Vizsgálatainkban a 4 faj átlagos allélszáma $n_A=1,57$ volt, szemben a Polyommatinae fajokra jellemző átlaggal $n_A=1,94$. Ugyanakkor ez a relatív alacsony allélszám jó egyezésben van más, a *Maculinea* fajok populációiban tapasztalt értékkel ($n_A=1,58$). Hasonló tendenciát mutatott a heterozigóták átlagos gyakorisága is, ahol a Kárpát-medencei *Maculinea* populációkban $H=0,094$ volt, míg a Polyommatinae átlag $H=0,149$. Ugyanakkor a többi, *Maculinea* populációk enzimpolimorfizmusát vizsgáló tanulmány alapján az átlagos heterozigótaság szintén alacsony volt, mértéke $H=0,102$.

A populációk differenciálódását tanulmányozva, minden analízis eredménye azt mutatta, hogy a *Maculinea* genuszon belül 4 fajt különíthetünk el a Kárpát-medencében. Vizsgálataink tehát alátámasztották azokat a korábbi eredményeket, melyeket DNS szekvencia (Als *et al.*, 2004), illetve morfometriai és ökológiai (Pech *et al.*, 2004) adatok elemzése alapján kaptak a kutatók. A dendrogramon ugyanakkor az is egyértelmű, hogy a legkorábban a kakukk-stratégiájú *M. alcon* elválása történt a többi, ragadozó életmódú

fajtól, majd ezt követték a különböző ragadozó fajok egymás utáni elkülönülései. Ez, az enzim lokuszok felhasználásával megállapított divergencia sorrend jó egyezésben van a mtDNS és nukleáris DNS szekvencia adatok alapján szerkesztett fán leolvasható sorrenddel (Als *et al.*, 2004).

A genetikai differenciálódás alapján megállapíthatjuk tehát, hogy a Kárpát-medencében a *Maculinea* fajok 4 ESU-t képviselnek, a 4 fajnak megfelelően. A *M.alcon* két ökotípusa között azonban csak ökológiai divergencia figyelhető meg, melyet még nem követett genetikai differenciálódás. Így nem tekinthetők önálló ESU-nak.

E.4.2. Funkcionális konzervációs egység (FCU)

E.4.2.1. A *Maculinea nausithous* kelet-közép-európai populációi: ESU, vagy FCU?

A 4.2.1. fejezet az alábbi cikkek alapján készült:

Hollós, A. Pecsenye, K., Bereczki, J., Bátori, E. and Varga, Z. 2012. Pattern of genetic and morphometric differentiation in *Maculinea nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **58**: 87-103. (IF: 0,474)

Pecsenye K., Bátori E., Bereczki J. és Varga Z. 2014. Evolúciós és konzervációs szempontból szignifikáns egységek (ESU és CU): Esettanulmányok Kárpát-medencei lepkefajokon. *Magyar Tudomány* **4**: 405-413.

Elméleti háttér

A *Maculinea nausithous* euroszibériai faj, melynek populációi egy viszonylag keskeny sávban Mongóliától Kelet- és Közép-Európán át egészen Kelet-Franciaországig fordulnak elő (Lukhtanov & Lukhtanov, 1994; Tuzov, 1997; Wynhoff, 1998; Munguira & Martin, 1999; Rákossy *et al.*, 2010). Így tehát a faj egyaránt hiányzik Dél-, és Észak-Európából is. Korábbi ismereteink szerint Kárpát-medencei elterjedése a Dunántúl északi és nyugati dombvidékére korlátozódott, és teljesen hiányzott az Alföldről. Sőt a régebbi erdélyi előfordulási adatok is hosszú időn keresztül megerősítetlenek maradtak. Így a Balatontól keletre a következő ismert előfordulása Bukovinában volt. Az utóbbi néhány évtizedben azonban találtak Kolozsvár közelében néhány elszigetelt *M. nausithous* populációt, melyeknek külső megjelenése és ökológiája is eltér a dunántúli populációkétól, mivel sztyeppe élőhelyek nedvesebb foltjain fordulnak elő (Rákossy *et al.*, 2010). Úgy tűnik, hogy az erdélyi populációk sokkal inkább a keleti, bukovinai, valamint az ukrainai és dél-oroszországi populációkkal mutatnak hasonlóságot, ami a morfológia mellett mindenekelőtt a hangyagazda-használatban nyilvánul meg. Mindezek alapján Rákossy *et al.* (2010) az erdélyi populációkat a *M. nausithous kijeensis* (Sheljuzhko, 1928) alfajhoz sorolta.

Az ESU és az FCU, mint a konzervációbiológia két alapvető egysége egymással hierarchikus kapcsolatban áll: egy ESU-en belül akár több FCU is elkülöníthető (Vila *et al.*, 2006; Funk *et al.*, 2012). Sőt az FCU fogalma éppen ez alapján a hierarchikus kapcsolat alapján válik érthetővé: genetikailag differenciálódott és demográfiai szempontból független populációk csoportja egy ESU-en belül (Maes *et al.*, 2004; Allendorf & Luikart, 2009).

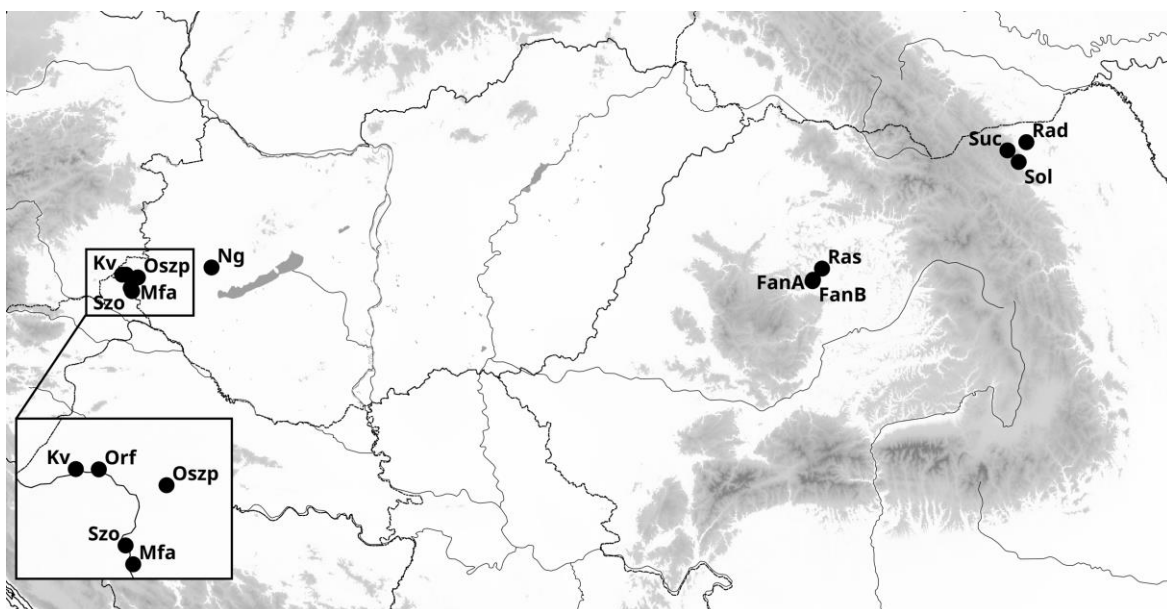
Célkitűzések

Vizsgálataink célja az volt, hogy meghatározzuk a fenotípusos és a genetikai differenciálódás mértékét a *M. nausithous* dunántúli, erdélyi és bukovinai populációi között. Ezek alapján azt szándékoztuk megállapítani, hogy:

- (a) a genetikai differenciálódás mintázata alátámasztja-e azt a feltevést, hogy Erdélyben a dunántúli és a közép-európai populációktól eltérő *nausithous* populáció, feltehetően a *M. nausithous kijevensis* jelenik meg;
- (b) a genetikai differenciálódás mértéke alapján milyen konzervációs egységnek (ESU, vagy FCU) tekinthető a három régió.

Abból kiindulva, hogy az erdélyi és a dunántúli populációk feltehetően a *M. nausithous* két különböző alfajához tartoznak azt tételeztük fel, hogy egyértelmű genetikai, esetleg fenotípusos differenciálódást tapasztalunk majd közöttük. Ugyanakkor a bukovinai és az erdélyi populációk között viszonylag alacsonyabb szintű differenciálódást vártunk, hiszen Rákosy *et al.* (2010) munkája nyomán ezek lényegében ugyanannak az alfajnak különböző földrajzi régiókban élő populációi.

Céljaink megvalósítása érdekében mintákat gyűjtöttünk a Kárpát-medencéből és Bukovinából. Az összes begyűjtött egyed esetében vizsgáltuk az enzimpolimorfizmus mértékét 17 enzim lokuszon. A morfometriai vizsgálatokhoz azonban csak 5 minta (2 erdélyi, 2 őrségi, és 1 bukovinai) 112 hím egyedét használtuk. Minden egyed szárnyán 8 jelleget mértünk, melyek közül 4 a szárny méretét, míg a 4 szög a szárny alakját jellemezte.



E.4.2.1. ábra: A *M. nausithous* minták a Kárpát-medencében és Bukovinában.

Nyugat-Dunántúl (NYDT): Nagygörbő (Ng), Orfalu (Orf), Szomoróc (Szo), Óriszentpéter (Oszp), Magyarszombatfa (Mfa), Kétyölgy (Kv).

Erdély (TRY): Fanatele A (Szénafüvek: FanA), Fanatele B (FanB), Rascruți (Válaszút: Ras).

Bukovina (BUK): Radauti (Rad), Solca (Sol), Sucevita (Suc).

Minták

A *M. nausithous* minták a Kárpát-medence 2 régiójából (Nyugat-Dunántúl: NYDT, és Erdély: TRY), valamint a Kárpátoktól keletre fekvő Bukovinából (BUK) származtak (E.4.2.1. ábra és E.4.2.1. függelék). Összesen 12 populációból gyűjtöttünk mintákat: a Nyugat-Dunántúlról 6, Erdélyből 3 és Bukovinából szintén 3 minta állt a rendelkezésünkre. A mintákat 2002 és 2009 között gyűjtöttük, a vizsgált egyedek összes száma 463 volt.

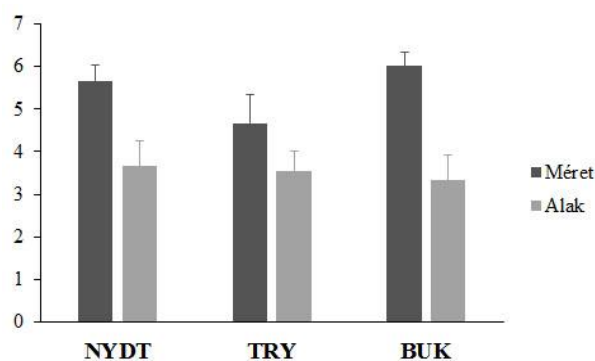
Eredmények és azok értékelése

Az enzimpolimorfizmus mértéke viszonylag alacsony volt a vizsgált *M. nausithous* populációkban. Az átlagos allélszám $n_A=1,79$, míg a heterozigóták átlagos gyakorisága $H_o=0,116$ volt (E.4.2.1. táblázat és E.4.2.2. függelék). A variabilitás mértéke egyik mutató esetében sem különbözött szignifikánsan a három régió populációiban (E.4.2.1. táblázat).

E.4.2.1. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói a *M. nausithous* régióiban. NYDT: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina. Np/r: a populációk száma a régióon belül; N/s: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság ($N=6$); H_o : tapasztalt heterozigóta gyakoriság; %Fix: a fixálódott allélok aránya; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ANOVA: a három régió mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség.

Régió	Np/r	N/s	n_A	Ar	%Fix	H_o	P_{95}
NYDT	6	34.4	1.94	1.42	0.395	0.095	0.412
TRY	3	54.9	1.88	1.64	0.166	0.173	0.588
BUK	3	27.4	1.65	1.41	0.322	0.099	0.471
Totál	12	37.8	1.79	1.48	0.319	0.116	0.461
ANOVA	$F_{2,10}$	-	0.39	0.40	1.94	0.26	0.15
	P	-	0.687	0.683	0.194	0.776	0.864

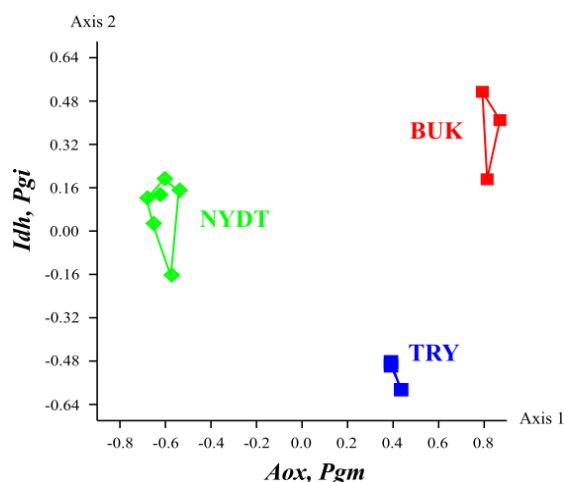
A szárny jellegek variabilitását a variációs koefficiensekkel jellemeztük, amelyek jelentős különbséget mutattak a szárny méretét és alakját meghatározó jellegek esetében. A szárny méretét leíró 4 jelleg varianciája átlagosan több mint 50%-kal volt magasabb, mint a szárny alakját jellemző szögek varianciája (E.4.2.2. ábra). Mi több, a szögek varianciáját reprezentáló átlagos CV értékek alapvetően hasonlóak voltak a három régióban, míg a méret jellegekre számított átlagos CV értékek a TRY régió populációiban alacsonyabb variabilitást tükröztek (E.4.2.2. ábra).



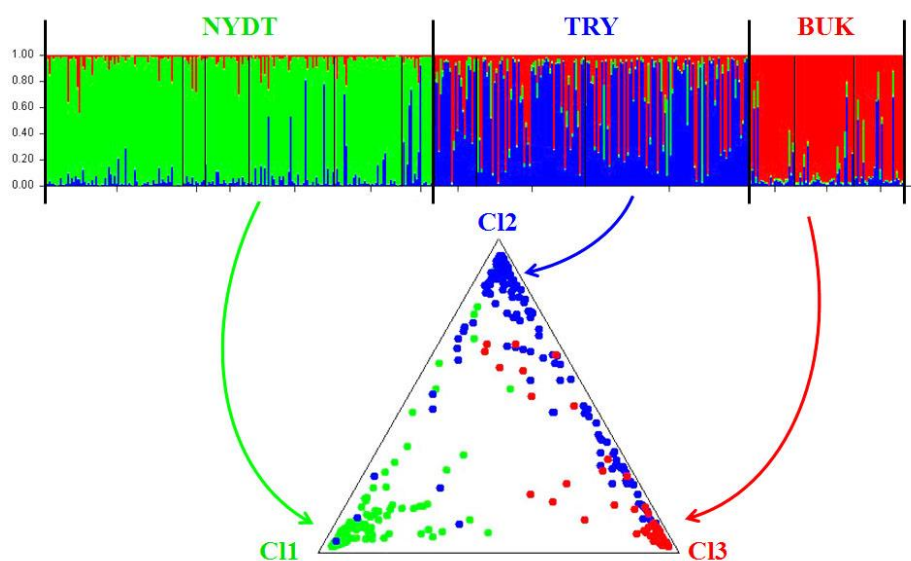
E.4.2.2. ábra: A fenotípusos variancia mértéke (CV) a *M. nausithous* populációkban. Méret: a variációs koefficiens (CV) átlaga a szárny méretét meghatározó 4 jelleg esetében; Alak: a CV átlaga és szórása a szárny alakját meghatározó 4 szögre nézve. NYDT: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina.

A *M. nausithous* populációk genetikai struktúrájának elemzése során elsőként PCA-t végeztünk a populációk allélfrekvencia adatai alapján. A populációkat reprezentáló pontok három világosan elkülönült felhőt alkottak a változók redukált terében (E.4.2.3. ábra). Az

első tengely mentén, ami a variancia 66,8%-át magyarázta meg, a dunántúli populációk különültek el a másik két régiótól, míg a második tengely mentén, ami a totális varianciához mindössze 19,5%-kal járult hozzá, a bukovinai és az erdélyi populációk váltak el egymástól (E.4.2.3. ábra).



E.4.2.3. ábra: A PCA eredménye a *M. nausithous* populációkban. NYTD: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina. A tengelyek kialakításában elsődleges szerepet játszó lokuszok a tengelyek mentén fel vannak tüntetve.

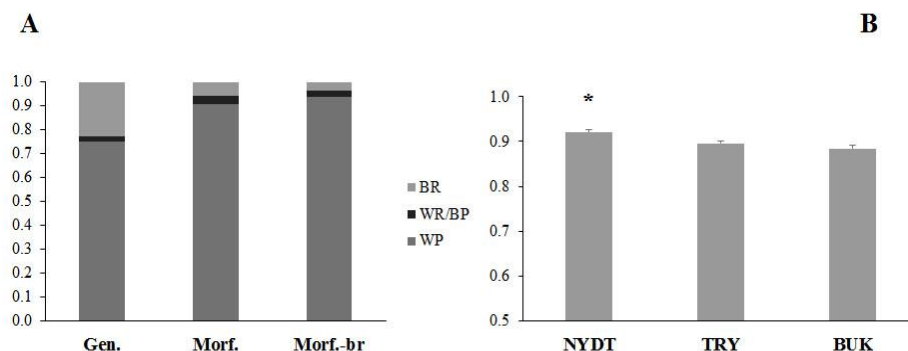


E.4.2.4. ábra: A Bayes-féle klaszteranalízis eredménye a *M. nausithous* populációkban ($K=3$). NYTD: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina; C11, C12 és C13 a feltételezett klaszterek. Az oszlopok (felső ábra) és a pontok (alsó ábra) az egyedek klaszterbe sorolásának valószínűségei.

A következő lépésben Bayes-féle klaszteranalízist végeztünk az egyedek sok lokuszos genotípusait felhasználva. A klaszterek legvalószínűbb száma $K=2$ volt (E.4.2.3. függelék). Az egyedek klaszterbe sorolásának valószínűségeit vizsgálva azonban azt állapítottuk meg, hogy $K=2$ esetén csak a nyugati (NYDT) és a keleti (TRY+BUK) régiók populációi különülnek el. Ezért megvizsgáltuk a klaszterek megoszlását az egyedekben $K=3$ esetében

is (E.4.2.3. függelék). Három klasztert feltételezve, a PCA eredményével megegyezően, 3 régióba csoportosultak az egyedek. Ebből adódóan a $K=3$ klaszter számot fogadtuk el a *M. nausithous* populációk genetikai struktúrájának a jellemzésére. A 3 klaszter becsült allélfrekvencia adatait összehasonlítva megállapítottuk, hogy klaszter 1-ben (*Pgi2*) de különösen klaszter 3-ban (*G6pdh4*, *AcphB12*, *Aox4* és *Aox5*) klaszter specifikus allélok jelentek meg, míg klaszter 2-ben nem. A klaszterek megoszlása az egyedekben egyértelmű regionális struktúrát mutatott; a három régiót 1-1 specifikus klaszter dominanciája jellemezte (E.4.2.4. ábra). Az egyes klaszterek megoszlását az egyedekben legvilágosabban az mutatja, hogyan helyezkednek el egy egységnyi, egyenlő oldalú háromszögben. Egy ilyen háromszög sarkai a három klasztert jelképezik. A nyugat-dunántúli egyedek legnagyobb része a háromszög klaszter 1-nek megfelelő sarkában csoportosult, és csak néhány egyed szóródott a klaszter 2-t reprezentáló sarok irányába. Ez azt jelzi, hogy a dunántúli régió populációi viszonylag erősebben izolálódtak a másik két régiótól, főleg a bukovinai populációktól (E.4.2.4. ábra). Az erdélyi és a bukovinai egyedek is elsősorban a klaszter 2-nek, illetve klaszter 3-nak megfelelő sarkokban voltak megfigyelhetők, de különösen az erdélyiek, jelentős mértékben szóródtak a két klasztert reprezentáló sarok között (E.4.2.4. ábra). Ez arra utal, hogy a két régió között relatíve intenzív lehet a génáramlás.

A *M. nausithous* populációk genetikai struktúráját AMOVA segítségével is elemeztük, ahol a populációk totális variációját felbontottuk régiók közötti, a régiókon belüli populációk közötti, és populációkon belüli komponensekre. Az eredmények jelentős mértékű differenciálódást mutattak a régiók között ($F_{CT}=0,230$; $P<0,001$), ami messze felülmúlta a régiókon belülit ($F_{CT}=0,024$; $P<0,001$) (E.4.2.5. ábra: A).



E.4.2.5. ábra: A *M. nausithous* populációkra végzett variancia analízisek eredményei.

A: Az AMOVA (Gen.) és a hierarchikus ANOVA (Morf. és Morf.-br) eredményei. Morf.: Az összes vizsgált jelleg szerepelt az analízisben; Morf.-br: Az elülső szárny csúcsi szöge (br) nem szerepelt az analízisben. BR: Régiók közötti variancia; WR/BP: a régiókon belüli populációk közötti variancia komponens; WP: a populációkon belüli variancia komponens.

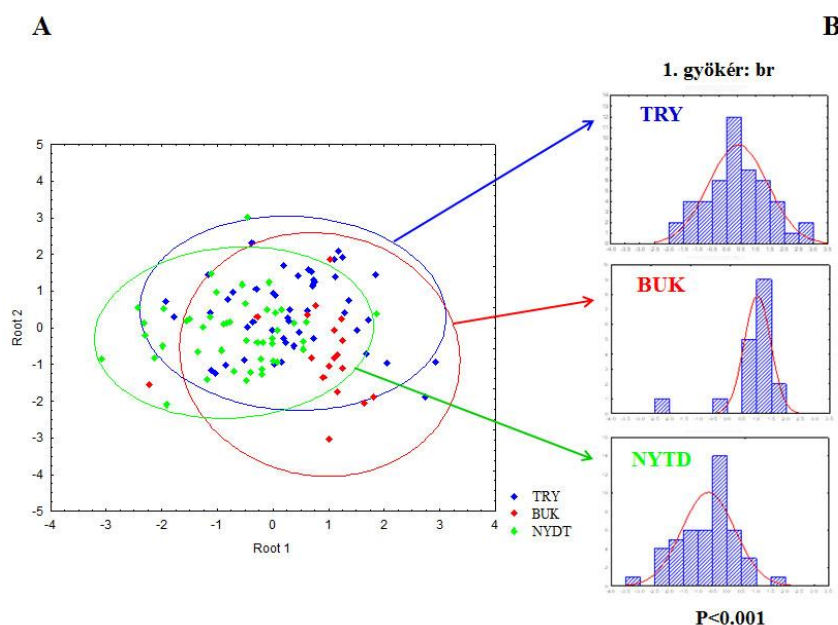
B: Az elülső szárny csúcsi szögének (br) az átlaga és szórása a három régióban. *: az átlag szignifikánsan magasabb a NYDT régióban, mint a másik kettőben.

Végül, összehasonlítottuk a régiók közötti és a régiókon belüli differenciálódás mértékét. Ebben az analízisben a populációk adatainak csoportosítása kétféle módon történt: egyrészt külön-külön kezeltük a 3 régió populációit, illetve a teljes adathalmazban összeolvastuk az azonos régióba tartozó populációkat. A differenciálódás jellemzésére három paramétert alkalmaztunk: a fixációs indexet (F_{ST}), a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlagát (D), és az egyedi allélok alapján becsült effektív migráns számot (N_m). Az eredmények,

különösen az F_{ST} és az átlagos D értékek, egyértelműen alátámasztották a *M. nausithous* populációk differenciálódásának regionális mintázatát (E.4.2.2. táblázat).

E.4.2.2. táblázat: A genetikai differenciálódás mutatói a *M. nausithous* földrajzi régióin belül és azok között. NYDT: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina. Np/r : a populációk száma a régióon belül; F_{ST} : fixációs index; D : a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlaga; Nm : a migránsok effektív száma. Szignifikancia szintek a Bonferroni korrekció után: * $0,01 < P < 0,05$.

	Np/r	F_{ST}	D	Nm
NYDT	6	0.034*	0.126	2.3
TRY	3	0.017*	0.114	10.2
BUK	3	0.040*	0.124	3.5
<i>M. nau.</i>	3	0.236*	0.322	1.2



E.4.2.6. ábra: A diszkriminancia analízis eredménye a *M. nausithous* vizsgált populációiban.

A. A pontok a három régió egyedeit jelképezik az első két gyökét mentén.

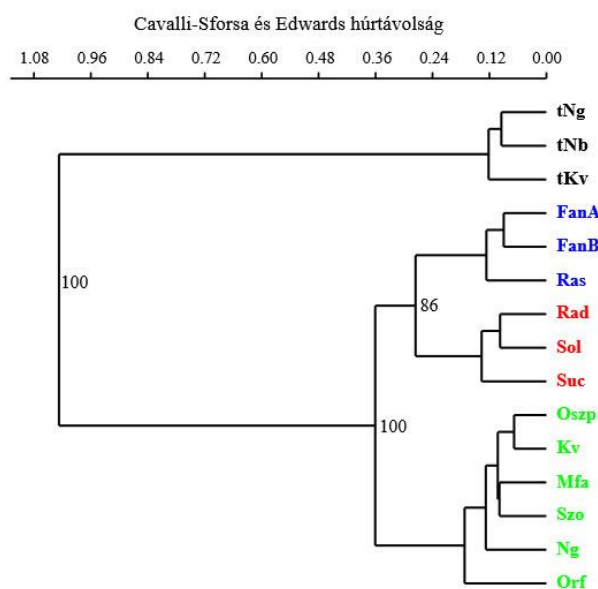
B. A kanonikus változók megoszlása az 1. gyökér mentén a három régióban.

A fenotípusos változatosság szerkezetének tanulmányozása során elsőként hierarchikus ANOVA-t végeztünk minden jellegre külön-külön, majd az egyes szinteken kapott értékeket átlagoltuk a különböző jellegek között. Ebben az analízisben is ugyanazokon a hierarchia szinteken vizsgáltuk a variancia megoszlását, mint az AMOVA-ban: régiók között; régiókon belül, a populációk között; populációkon belül. A fenotípusos variancia komponenseinek a megoszlása némileg különbözött a genetikai variancia komponenseitől. A morfológiai jellegek esetében ugyanis a régiók közötti komponens (5,7%) csak kissé volt magasabb a régiókon belülinél (3,6%) (E.4.2.5. ábra: A). Az egyetlen jelleg, ami szignifikánsan különbözött a régiók között az elülső szárny csúcsi szöge volt (E.4.2.5. ábra: B), vagyis az erdélyi és a bukovinai populációkban az egyedek elülső szárnya hegyesebb volt, mint a dunántúliakban. Ennél a jellegnél a régiók közötti variancia komponens 19,7% volt. Ha a

variancia komponensek átlagolásánál eltekintettünk ettől a jellegtől, akkor a régiók közötti átlagos variancia 3,7%-ra csökkent, ami nagyon közel állt a régiókon belüli értékhez (2,7%) (E.4.2.5. ábra: A).

A fenotípusos variancia tanulmányozásának a következő lépésében diszkriminancia analízist végeztünk az egyedeken mért adatok alapján. Az eredmények azt mutatták, hogy a régiók szignifikánsan elkülönültek egymástól az első gyökér mentén ($\chi^2=49,7$; $DF=20$; $P<0,001$). Ennek a gyökérnek a kialakításában az elülső szárny csúcsi szöge (br) játszott a döntő szerepet. A kanonikus változók megoszlása egyértelműen mutatta a dunántúli egyedek elkülönülését a másik két régió egyedeitől (E.4.2.6. ábra).

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a *M. nausithous* vizsgált populációi a *Maculinea* fajoknál általánosan tapasztalt alacsony szintű variabilitással jellemezhetők. A *M. nausithous* populációkban az átlagos allélszám $n_A=1,79$ (*Maculinea* átlag $n_A=1,58$), míg az átlagos heterozigóta gyakoriság $H_o=0,116$ (*Maculinea* átlag $H_o=0,112$) volt. Az alacsony szintű enzimpolimorfizmussal párhuzamosan intenzív differenciálódást tapasztaltunk a populációk között, a fixációs index minden populációra számított értéke $F_{ST}=0,195^{**}$ volt, ami nagyon közel esik a Figurny-Puchalska *et al.* (2000) által, a lengyel populációkra megállapított értékhez ($F_{ST}=0,153^{**}$).



E.4.2.7. ábra: A Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogram, amelyen a vizsgált *M. nausithous* populációk mellett három *M. teleius* populáció (külső csoport) szerepel. A fő elágazásoknál feltüntetett értékek a bootstrap támogatottságot mutatják. Fekete betűk: *M. teleius* populációk; színes betűk: *M. nausithous* populációk; kék: TRY; piros: BUK; zöld: NYDT.

A genetikai differenciálódás világos regionális mintázatot mutatott minden analízisben. Ugyanakkor a legintenzívebb differenciálódást a keleti (TRY és BUK) és a nyugati (NYDT) populációk között figyeltük meg. Ezt támasztotta alá a PCA és a Bayes-féle klaszteranalízis, vagy a diszkriminancia analízis eredménye. Rákossy *et al.* (2010) az erdélyi populációkat a már korábban leírt *M. nausithous kijeensis* (Sheljuzhko, 1928) alfajhoz sorolta részben külső morfológiájuk, részben pedig ökológiai sajátásaik alapján. Amikor a dendrogram

szerkesztése során egy másik, lápréteken előforduló predátor *Maculinea* fajt (*M. teleius*) alkalmaztunk külsőportként, akkor az eredmények azt mutatták, hogy a keleti populációk (TRY és BUK) és a nyugati populációk kölcsönösen monofiletikusak, és közöttük jelentős mértékű differenciálódás alakult ki, ami alátámasztja alfaji szintű elkülönülésüket (E.4.2.7. ábra). Ez egyúttal azt is jelzi, hogy az erdélyi és a dunántúli populációk önálló ESU-kat képviselnek a Kárpát-medencében (Moritz, 1994; Crandall *et al.*, 2000).

Ezzel párhuzamosan eredményeink alapján azt is megállapíthatjuk, hogy a keleti régiók (TRY és BUK) populációinak genetikai és ökológiai differenciálódása nem éri el azt a szintet, hogy indokolt legyen önálló ESU-ként kezelni őket (a PCA, vagy a diszkriminancia analízis eredményei). Ugyanakkor egyértelmű genetikai differenciálódást tapasztaltunk közöttük (lásd E.4.2.3., E.4.2.4. és E.4.2.7. ábrák), ami azt mutatja, hogy genetikai állományuk bizonyos mértékig egyedinek tekinthető. Funk *et al.* (2012) úgy definiálták a funkcionális konzervációs egységeket (FCU), mint sajátos genetikai összetétellel jellemezhető populációkat, vagy populáció csoportokat, amelyek tehát szignifikánsan hozzájárulnak egy ESU genetikai diverzitásához. Mindezek alapján az erdélyi és a bukovinai populációkat önálló FCU-ként kezelhetjük a keleti ESU-n (feltehetően a *M. nausithous kijeensis* alfajon) belül.

Meg kell azonban jegyezni, hogy Ritter *et al.* (2013) meglehetősen magas szintű differenciálódást mutattak ki az európai *M. nausithous* populációk között mind a mtDNS COI szekvenciája, mind pedig mikroszatellitek alapján. Eredményeik alátámasztják a kelet- és közép-európai populációk közötti intenzív differenciálódást. Vizsgálataik alapján az erdélyi minták egyértelműen a Kelet-Európára jellemző ázsiai genetikai állományt hordozzák. Ugyanakkor tanulmányukban az is világosan kiderül, hogy a nyugat-európai populációk genetikai összetétele sem egységes, alapvetően két genetikai vonalból állnak, melyek földrajzilag is többé-kevésbé egyértelműen elkülöníthetők egymástól.

E.4.2.2. Az *Euphydryas maturna* Kárpát-medencei populációi

A 4.2.2. fejezet az alábbi cikk alapján készült:

Pecsenye, K., Tóth, A., Tóth, J.P., Bereczki, J., Varga, Z. 2017. Regional pattern of genetic variation in the Eastern Central European populations of *Euphydryas maturna* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Conservation* **21**(2): 171-181. (IF: 1.431)

Elméleti háttér

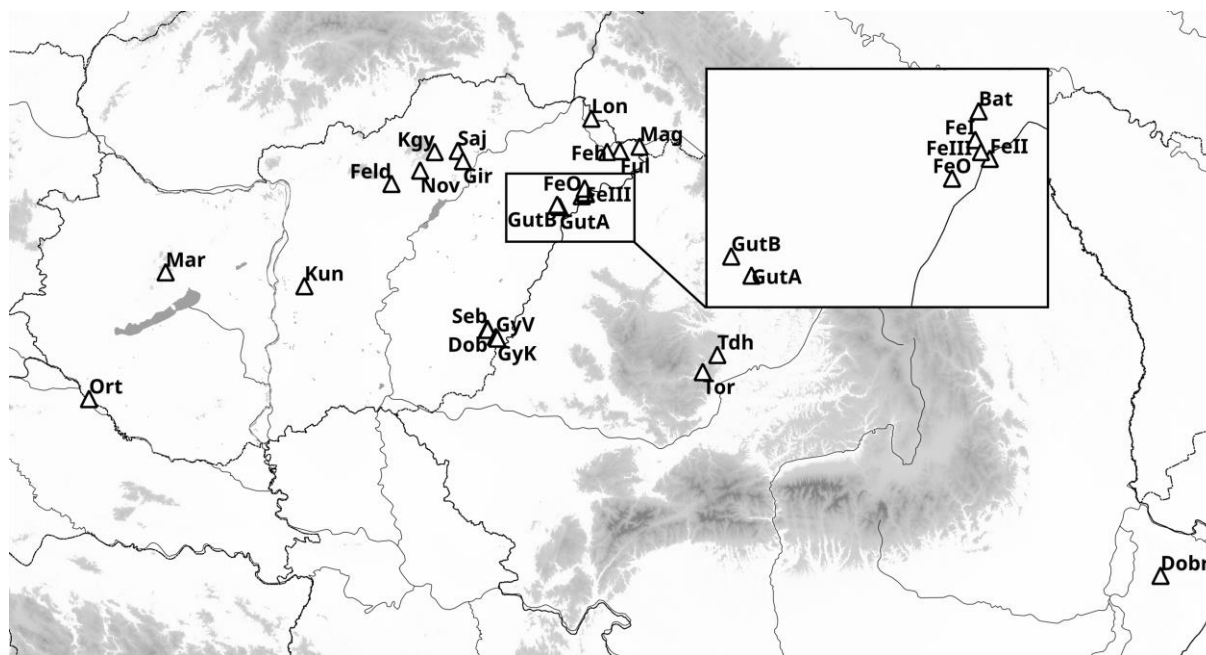
A díszes tarkalepkének (*E. maturna*) Európában egykor nagy volt az elterjedési területe. Mára azonban populációi Csehországban, Szlovákiában, Ausztriában, Németországban, Franciaországban és a Balkánon is erősen visszaszorultak. A faj teljesen kipusztult Belgiumban és Luxemburgban (Haslett, 1996; van Swaay & Warren, 1999). A populációk hanyatlásának a háttérben elsősorban az erdőművelésben bekövetkezett változások állnak, aminek következtében jelentősen lecsökkent a faj számára megfelelő habitatok száma és nagysága (van Swaay, Warren, & Löis, 2006). Így a fennmaradt populációk mérete megcsappant, ráadásul ezek erősen izolálódtak egymástól. Ezért az *E. maturna* Európa-szerte az egyik legkritikusabban veszélyeztetett lepkefaj, és szerepel az Élőhelyvédelmi Irányelvek (Habitat Directive) II-IV mellékletében (Annex II-IV) (van Swaay *et al.*, 2010).

A díszes tarkalepke populációk sebezhetősége két tényezőre vezethető vissza. Egyrészt speciális a faj habitat igénye, amennyiben lárvális tápnövényei (Közép-Európában főleg *Fraxinus* és *Ligustrum* fajok) a keményfa-ligeterdők és kontinentális tölgyesek állományalkotói, illetve szegélyeik cserje fajai; míg az adultok nektárforrásai a szegélyben,

esetleg a tisztásokon előforduló más cserjék (pl. *Cornus sanguinea*, *Acer tataricum* stb.), vagy magas termetű ertyősvirágzatú növények (Weidemann, 1985; Vrabec *et al.*, 2002; Freese *et al.*, 2006; Dolek *et al.*, 2007; Rákossy *et al.*, 2012). Másrészt viszont a faj speciális életmenete (lásd 1.2.1. fejezet) azt eredményezi, hogy populációi erősen ki vannak téve sztochasztikus hatásoknak, és ezért méretük akár jelentős mértékben is ingadozhat (Konvička *et al.*, 2005). Az intenzív drift hatás következtében a populációk variabilitása várhatóan alacsony, miközben az allélfrekvencia ingadozása generációról generációra jelentékeny, és a populációk közötti differenciálódás magas.

Célkitűzések

Bár hazánkban az *E. maturna*-nak még vannak stabil, nagy populációi, az erdők szerkezetének gyors változása, különösen a folyó menti galériaerdők visszaszorulása nálunk is szükségessé teszi egy korrekt fajvédelmi program kidolgozását. Ennek első lépése pedig a funkcionális konzervációs egységek (FCU) kijelölése a Kárpát-medencében. Ezért munkánk célkitűzése az volt, hogy a díszes tarkalepke populációk genetikai struktúrájának tanulmányozása alapján meghatározzuk a Kárpát-medencében (tágabb értelemben Kelet-Közép-Európában) elkülönülő FCU-k számát. Tekintettel az intenzív genetikai sodródás következtében várható erős genetikai differenciálódásra, munkahipotézisünk az volt, hogy a genetikai variabilitás szerkezetében nem tapasztalunk majd regionális mintázatot. Vagyis



E.4.2.7. ábra: Az *E. maturna* minták a Kárpát-medencében és Dobrudzsában.

NYÍR: Fényi-erdő Ömböly (FeO), Fényi-erdő tisztás (FeI), Fényi-erdő határszél (FeII), Fényi-erdő erdőszél (FeIII), Gutyi-erdő A (GutA), Gutyi-erdő B (GutB) és Bátorliget (Bat);

BER: Lónyai-erdő (Lon), Magosliget (Mag), Fehérgyarmat (Feh) és Fülesd (Fül);

KÖR: Sebesfoki-erdő (Seb), Dobozi-erdő (Dob), Gyula-Városerdő (GyV) és Gyula-Körisedő (GyK); ÉMO: Sajólad (Saj), Girincs (Gir), Feldebrő (Feld), Noszvaj (Nov) és Kisgyőr (Kgy);

KUN: Kunpeszér (Kun); BAK: Markó (Mar); DRA: Órtilos (Ort);

TRY: Torockó (Tor) és Tordai-hasadék (Tdh); DOB: Dobrogea (Dobr).

azt tételeztük fel, hogy nem találunk majd genetikailag differenciálódott konzervációs egységeket a Kárpát-medencében. Ugyanakkor az *E. matura* dobrudzsai populációját Rákosy *et al.* (2012) alfajaként különítette el és *E. matura opulenta* név alatt írta le. Ezért azt vártuk, ez a populáció egyértelműen differenciálódott a faj Kárpát-medencei populációitól.

Hipotézisünk tesztelésére 26 populáció mintájában tanulmányoztuk az enzimpolimorfizmus mértékét 18 enzim lokuszon. A minták túlnyomó többsége (25) a Kárpát-medencéből származott, de egy mintát azon kívül (Dobruzsza) gyűjtöttünk.

Minták

Az *E. matura* minták döntő többsége a Kárpát-medence 8 régiójából (Nyírség: NYÍR, Szatmár-Beregi-sík: BER, Körösök vidéke: KÖR, Észak-Magyarország: ÉMO, Kiskunság: KUN, Bakony: BAK, Dráva-sík: DRA és Erdély: TRY) származott. Egy mintát azonban a Kárpát-medencétől keletre, Dobruzsában gyűjtöttünk (DOB) (E.4.2.7. ábra és E.4.2.4. Függelék). Összesen 26 populáció mintájában elemeztük az enzimpolimorfizmust, 769 egyedben. Ezeket a mintákat 2002 és 2012 között gyűjtöttük.

Eredmények és értékelésük

A vizsgált díszes tarkalepke populációkban viszonylag alacsony szintű enzimpolimorfizmust tapasztaltunk, az átlagos allélszám $n_A=1,8$ a heterozigóták átlagos gyakorisága pedig $H_o=0,127$ volt (E.4.2.3. táblázat és E.4.2.5. függelék). A földrajzi régiók variabilitásának a szintje nem különbözött szignifikánsan (E.4.2.3. táblázat: A). Ugyanakkor

E.4.2.3. táblázat: Az enzimpolimorfizmus átlagos mutatói az *E. matura* Kárpát-medencei régióiban és Dobruzsában. N/s: az átlagos mintaszám; Np/r: a populációk száma a régióon belül; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság ($N=7$); H_o : tapasztalt heterozigóta gyakoriság; %Fix: a fixálódott allélok aránya; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ANOVA: a régiók mutatóinak összehasonlítása; P: valószínűség.

A. Földrajzi régiók: Nyírség (NYÍR), Szatmár-Beregi-sík (BER), Körösök vidéke (KÖR), Észak-Magyarország (ÉMO), Kiskunság (KUN), Bakony (BAK), Dráva-sík (DRA), Erdély (TRY) és Dobruzsza (DOB).

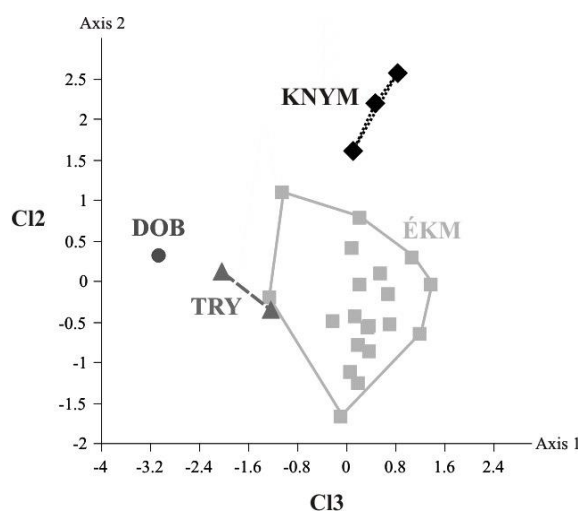
Fölldr.Reg.	N/s	Np/r	n_A	Ar	%Fix	P_{95}	H_o
NYÍR	37.3	7	1.89	1.52	0.202	0.611	0.112
BER	19.3	4	1.74	1.52	0.299	0.486	0.121
KÖR	29.4	4	1.76	1.46	0.290	0.500	0.114
ÉMO	28.9	5	1.70	1.47	0.303	0.489	0.111
KUN	43.0	1	2.06	1.65	0.189	0.611	0.151
BAK	31.0	1	1.83	1.67	0.182	0.667	0.197
DRA	22.0	1	1.78	1.63	0.219	0.611	0.184
TRY	24.1	2	1.78	1.61	0.301	0.472	0.135
DOB	19.0	1	1.94	1.86	0.200	0.611	0.228
Totál	29.4	26	1.80	1.64	0.243	0.543	0.127
ANOVA							
F _{8,18}	-	-	1.49	1.32	2.03	1.36	0.65
P	-	-	0.2277	0.2937	0.1012	0.2790	0.7286

B. A genetikai analízisek alapján megállapított klaszter régiók: Észak- és Kelet-Magyarország (ÉKM), Közép- és Nyugat-Magyarország (KNYM), Erdély (TRY) és Dobrudzsa (DOB). A kövér betűk szignifikáns különbségeket jeleznek.

Gen. Reg.	N/p	Np	n _A	Ar	%Fix	P ₉₅	Ho
ÉKM	30.0	20	1.79	1.50	0.264	0.533	0.114
KNYM	32.0	3	1.89	1.65	0.197	0.630	0.177
TRY	24.1	2	1.78	1.61	0.301	0.472	0.135
DOB	19.0	1	1.94	1.86	0.200	0.611	0.228
Totál	29.4	26	1.80	1.64	0.240	0.543	0.127
ANOVA							
F _{3,23}	-	-	14.40	12.63	15.38	13.32	6.96
P	-	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017

a későbbi analízisekben definiált klaszter régiók között a polimorfizmus minden paramétere szignifikáns különbséget mutatott (E.4.2.3. táblázat: B). Nevezetesen, az allélgazdagság és a heterozigótaság mértéke az észak- és kelet-magyarországi klaszter régióban (ÉKM) volt a legalacsonyabb, míg a fixálódott allélok aránya az erdélyiben volt a legmagasabb (TRY).

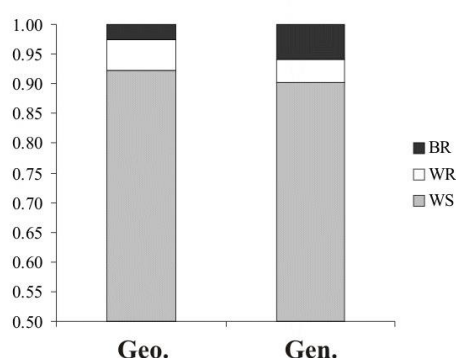
Az *E. matura* populációk genetikai struktúrájának az elemzése során az első lépésben Bayes-féle klaszteranalízist végeztünk az egyedek sok lokuszos genotípusa alapján. A ΔK értékek segítségével megállapítottuk a klaszterek legvalószínűbb számát, ami a vizsgált populációkban $K=4$ volt (E.4.2.6. függelék). A továbbiakban összehasonlítottuk a klasztereket becsült allélfrekvencia értékeik alapján. Két klaszter rendelkezett klaszter specifikus allélokkal, az *Acon2* és a *6Pgdh5* Cl2-ben, míg az *EstA2* és az *EstB2* allélok Cl3-ban voltak kizárólagosan jelen. Cl1-ben és Cl4-ben azonban nem voltak egyedi allélok.



E.4.2.8. ábra: A PCA eredménye az *E. matura* populációkban. A tengelyeket meghatározó klaszterek a kérdéses tengely mentén láthatók. ÉKM: Észak- és Kelet-Magyarország; KNYM: Közép- és Nyugat-Magyarország; TRY: Erdély; DOB: Dobrudzsa.

A következőkben megvizsgáltuk az egyedek klaszterbe sorolásának a valószínűségét, illetve ennek eloszlását a populációkban, majd az átlagos klasztereloszlások alapján egy PCA-t végeztünk. A populációkat jelképező pontok 4 többé-kevésbé elkülönült pontfelhőt alkottak a változók redukált terében (E.4.2.8. ábra). A dobudzsai populáció egyértelműen

elvált a többitől az első tengely mentén (E.4.2.8. ábra), ami a variancia 49,7%-át magyarázta meg. Hasonlóan világos elkülönülést tapasztaltunk a második tengely mentén, ahol a kiskunsági, a bakonyi, és a dráva-síki populációk alkottak egy, a többi populációtól független kompakt felhőt (Közép és Nyugat-Magyarország: KNYM) (E.4.2.8. ábra). A PCA eredménye tehát azt jelezte, hogy ezek, az egyébként földrajzilag távol eső populációk genetikai összetételükben kifejezett hasonlóságot mutatnak. Így a továbbiakban egy klaszter régióba soroltuk ezt a három populációt. Ugyanakkor a két erdélyi (TRY) valamint az észak- és kelet-magyarországi (ÉKM) populációk az első tengely mentén csak részlegesen különültek el egymástól (E.4.2.8. ábra). A legdiffúzabb pontfelhőt a Nyírség (NYÍR), a Szatmár-Beregi-sík (BER), a Körösök vidéke (KÖR) és az Észak-Magyarország (ÉMO) földrajzi régiók populációi alkották. A populációk klaszter megoszlása alapján tehát 3 klaszter régiót tudunk elkülöníteni a Kárpát-medencében, míg az ettől keletre fekvő dobudzsai populáció egy önálló klaszter régiót képviselt.



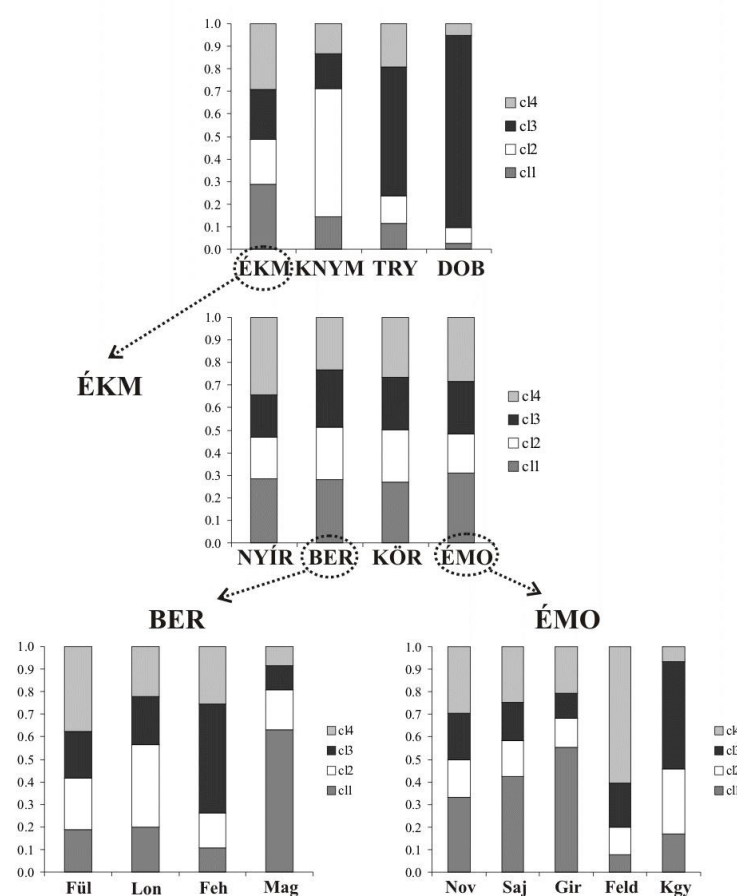
E.4.2.9. ábra: Az AMOVA eredménye az *E. matura* populációkban. Geo.: a populációk a 9 földrajzi régió szerint lettek csoportosítva; Gen.: a populációk a 4 klaszter régió alapján lettek csoportosítva. BR: régiók közötti variancia; WR: a régiókon belül, a populációk közötti variancia; WS: a populációkon belüli variancia.

E.4.2.4. táblázat: A genetikai differenciálódás mutatói az *E. matura* populációkban. NYÍR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; KÖR: Körösök vidéke; ÉMO: Észak-Magyarország; ÉKM klaszt. reg.: Észak- és Kelet-Magyarország földrajzi régiói között; KNYM: Közép- és Nyugat-Magyarország régióon belül; TRY klaszt. reg.: az erdélyi régióon belül; Tot. klaszt. reg.: a 4 klaszter régió között. Np/r: a populációk száma a régióon belül; F_{ST} Érték: Wright-féle fixációs index; N*I: a szignifikánsan differenciáló lokuszok száma; Nm: a migránsok effektív száma.

Régiók	Np/r	F_{ST}		Nm
		Érték	N*I	
NYÍR	7	0.036**	3	1.36
BER	4	0.106**	3	4.55
KÖR	4	0.020*	1	8.73
ÉMO	5	0.109**	5	2.84
ÉKM klaszt. reg.	4	0.024**	10	5.26
KNYM klaszt. reg.	3	0.052**	11	1.2
TRY klaszt. reg.	2	0.023**	1	1.85
Tot. klaszt. reg.	4	0.071**	16	0.61

A Bayes-féle klaszteranalízis eredményeként kapott négy régió meglétének alátámasztására két további analízist hajtottunk végre. Először AMOVA-t végeztünk, ahol a populációkat kétféle módon csoportosítottuk: 9 földrajzi régió, illetve 4 klaszter régió. A 4 klaszter régió közötti differenciálódás ($F_{CT}=0,039$; $P<0,001$) mintegy másfélszer akkora volt, mint a 9 földrajzi régió közötti ($F_{CT}=0,026$; $P<0,001$) (E.4.2.9. ábra). Ugyanakkor a régiókon belüli variancia komponens a földrajzi régiók esetében mutatkozott magasabbnak.

A második lépésben pedig összehasonlítottuk a régiókon belüli és a régiók közötti differenciálódás mértékét. Ebben az analízisben kétféle módon csoportosítottuk a populációkat: először a régiókat külön-külön elemeztük, majd a teljes adathalmazban összeolvastottuk a régiók populációit. A differenciálódás mértékét két mutatóval jellemeztük: a Wright-féle F_{ST} értékkel és a szignifikánsan differenciáló lokuszok számával, valamint az egyedi allélok alapján számított effektív migráns számmal (N_m). Mindkét mutató, de különösen az N_m értékek, alacsonyabb differenciálódást jeleztek a klaszter régiókon belül, mint azok között (E.4.2.4. táblázat).



E.4.2.10. ábra: A régiók átlagos klaszter megoszlásioefficiensei az *E. matura* esetében. C1, C2, C3 és C4: a 4 klaszter.

Felső ábra: A klaszterek megoszlása a klaszter régiókban. ÉKM: Észak- és Kelet-Magyarország; KNYM: Közép- és Nyugat-Magyarország; TRY: Erdély; DOB: Dobruzsza.

Középső ábra: A klaszterek megoszlása az ÉKM földrajzi régióiban. NYÍR: Nyírség, BER: Szatmár-Beregi-sík, KÖR: Körösök-vidéke, ÉMO: Észak-Magyarország.

Az alsó két ábra: A klaszterek megoszlása az ÉKM két földrajzi régiójának (BER és ÉMO) a populációiban.

Az analízisek utolsó lépésében az észak- és kelet-magyarországi klaszter régió (ÉKM) belül tanulmányoztuk a differenciálódás mintázatát. Ez a régió meglehetősen diffúz pontfelhőként jelent meg a populációk átlagos klasztermegoszlása alapján végzett PCA során (E.4.2.8. ábra), ami nem meglepő, hiszen több földrajzi régió populációit foglalta magába; ugyanakkor ezek között a régiók között meglehetősen alacsony F_{ST} értéket tapasztaltunk, ami viszonylag homogén genetikai állományt jelzett (E.4.2.4. táblázat). A differenciálódási mintázat elemzésében két megközelítést alkalmaztunk: összehasonlítottuk az átlagos klaszterösszetételt a hierarchia különböző szintjein (ÉKM klaszter régió, földrajzi régiók, populációk a földrajzi régiókon belül), illetve kiszámítottuk a differenciálódás mutatóit az ÉKM földrajzi régióin belül és azok között. Az átlagos klaszterösszetételt először a klaszter régiók között hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy CI3 egyértelműen dominált a dobrudzsai populációban (DOB), és kisebb mértékig az erdélyiekben (TRY) is (E.4.2.10. ábra). Bár ez a nyilvánvalóan látszó különbség nem mutatkozott szignifikánsnak az ANOVA-ban ($F_{3,23}=2,78$; $P=0,063$), a dobrudzsai populáció klaszterösszetétele *post hoc* tesztekben szignifikánsan különbözött mind az ÉKM ($P=0,043$), mind pedig a KNYM ($P=0,048$) klaszter régióktól. A KNYM régióban CI2 volt jelen szignifikánsan nagyobb arányban ($F_{3,23} = 17,4$; $P = 0,0$), mint a többi régióban (E.4.2.10. ábra). Ugyanakkor az ÉKM régióban a négy klaszter aránya hasonló volt.

Az ÉKM klaszter régióba tartozó földrajzi régiók klaszter összetételét összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy ezek meglepően hasonlóak, mind a négy földrajzi régióban egyenletes a 4 klaszter megoszlása (E.4.2.10. ábra). Ha azonban a klaszterek megoszlását a földrajzi régiókon belüli populációk között hasonlítjuk össze, akkor nem várt különbségeket tapasztalunk a populációk között (E.4.2.10. ábra).

Hasonló eredményre jutunk akkor is, ha a differenciálódás mutatóit hasonlítjuk össze az észak- és kelet-magyarországi klaszter régió földrajzi régiói között, és azokon belül. A földrajzi régiókon belül, a populációk között legalább olyan mértékű a genetikai differenciálódás, mint a régiók között (E.4.2.4. táblázat). Sőt a NYÍR és az ÉMO régiókon belül messze magasabb szintű differenciálódást tapasztaltunk, mint a régiók között mind az F_{ST} , mind pedig az N_m értékek alapján (E.4.2.4. táblázat).

Eredményeink összegzéseként megállapíthatjuk, hogy az *E. maturna* kelet-közép-európai populációinak a variabilitása viszonylag alacsony az *Euphydryas* genusz többi fájához képest, ami összhangban van azzal, amire a díszes tarkalepke speciális szaporodási stratégiája alapján számítottunk. Vizsgálatainkban az átlagos allélszám $n_A=1,8$ (*Euphydryas* átlag 2,16), míg a heterozigóták átlagos gyakorisága $H_o=0,127$ (*Euphydryas* átlag 0,155) volt. Meg kell azonban jegyezni, hogy a genusz fajai meglehetősen változatosak az enzimpolimorfizmus szintjét tekintve. A szűkebb értelemben vett *Euphydryas* alnem észak-amerikai fajai magasabb szintű variabilitással jellemezhetők pl. *E. editha*: $n_A=2,3-3,2$ (McKechnie, Ehrlich, & White, 1975); *E. chalcedona*: $n_A \approx 3$ (Britten & Brussard, 1993), míg a *Hypodryas* alnem fajainak variabilitása jelentősen alacsonyabb pl. *E. maturna*: jelen vizsgálat; *E. gilettii*: $n_A=1,3-1,5$ (Britten & Brussard, 1993; Debinski, 1994).

Az intenzív genetikai sodródás következményeként várt alacsony genetikai variabilitás egy viszonylag magas szintű differenciálódással párosult; a 26 populáció között számított fixációs index $F_{ST}=0,081$, míg a migránsok effektív száma $N_m=1,15$ volt. Az *Euphydryas* genusz fajai a genetikai differenciálódás szintjét tekintve is meglehetősen változatosak. Az *Euphydryas* alnem nagy variabilitású, észak-amerikai fajainak populációi között meglepően intenzív génáramlást írtak le, pl. az *E. editha* populációkban $N_m > 50$ (McKechnie *et al.*,

1975), míg az alacsony variabilitású *Hypodryas* alnem fajainál a differenciálódás viszonylag magas volt, pl. az *E. gilettii* populációk esetében annak a valószínűsége, hogy a vizsgált populációk ugyanabból a genetikai állományból származtak $P=0$ volt (Debinski, 1994).

Ugyanakkor a differenciálódás mintázatára vonatkozó eredményeink csak részben feleltek meg előzetes várakozásunknak. Azt feltételeztük ugyanis, hogy az intenzív differenciálódás következményeként nem tapasztalunk majd földrajzi mintázatot a díszes tarkalepke Kárpát-medencei populációinak genetikai struktúrájában. Az eredmények viszont azt mutatták, hogy többé-kevésbé egyértelmű regionális tagolódás jelent meg a vizsgált populációk genetikai variabilitásának a szerkezetében. A várakozásnak megfelelően, a dobudzsai populáció világosan elkülönült az összes Kárpát-medenceitől. Ez nem meglepő, hiszen ezt a populációt Rákossy *et al.* (2012) alfajaként kezelte. Feltételezésünkkel ellentétben azonban a közép- és nyugat-magyarországi populációk genetikai állománya is egyértelműen differenciálódott a medence többi populációjától, és önálló klaszter régiót alkotott (KNYM). Az *E. maturna* dél-dunántúli populációit Varga & Sántha (1973) szintén alfaji szinten különítette el és *E. maturna idunides* Fruhstorfer, 1917 név alatt közölte. Az észak- és kelet-magyarországi (ÉKM), valamint az erdélyi (TRY) klaszter régió populációi között azonban nem volt egyértelmű az elkülönülés. Ez az eredmény alátámasztani látszik azt a korábbi feltételezést, hogy ezek a populációk egy alfajhoz tartoznak, amit Varga & Sántha (1973) *E. maturna partiensis* néven írt le. A jelenlegi vizsgálatok eredményei nem alkalmasak arra, hogy feltárják azokat a folyamatokat, amik szerepet játszottak a három, esetleg négy genetikai vonal elkülönülésében. A regionális mintázat egyik lehetséges magyarázata ugyanis a populációk eltérő történeti múltja, vagyis különböző származása a refúgium területek, vagy a kolonizációs útvonalak vonatkozásában. Az *E. maturna* filogeográfiai analízise azonban még nem történt meg.

Munkahipotézisünket tulajdonképpen a 4 földrajzi régiót magába foglaló ÉKM klaszter régió támasztotta alá, ahol a 20 ide tartozó populáció genetikai struktúrája nem mutatott földrajzi mintázatot. A PCA analízisben egy diffúz pontthalmazként jelentek meg, néhány esetben pedig a régiókon belüli differenciálódás jelentősen magasabb volt, mint a régiók közötti. Ennek a jelenségnek a hátterében több ok is állhat. Egyrészt alapfeltételezésünk is az volt, hogy a speciális életmenet következtében fellépő sztochasztikus folyamatok, intenzív differenciálódást eredményeznek, ami elfedheti a genetikai variabilitás földrajzi mintázatát. Másrészt viszont a genetikai struktúra kialakításában az is fontos szerepet játszhat, hogy ezeknek a populációknak a habitatjai olyan galériaerdők, melyek a Tisza vízrendszeréhez tartoznak, és a folyók szabályozását megelőzően összefüggő rendszert alkottak. Ezen, a nagykiterjedésű folytonos területen a migráció messze intenzívebb lehetett, mint a jelenlegi izolált populációk között.

Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy a kelet-közép-európai *E. maturna* populációk legalább 3 (esetleg 4) genetikai vonalat képviselnek, melyek akár alfaji szinten is elkülönülhetnek egymástól, bár ennek bizonyítása további genetikai vizsgálatokat igényel. Eredményeink azonban elegendőek arra, hogy kijelöljük az *E. maturna* funkcionális konzervációs egységeit a vizsgált területen. Megállapíthatjuk, hogy hazánkban, a klaszter régióknak megfelelően, két FCU-t különíthetünk el: Észak- és Kelet-Magyarországot, illetve Közép- és Nyugat-Magyarországot. A két FCU közül az utóbbi (KNYM) igényel nagyobb figyelmet a gyakorlati természetvédelmi munkában, amennyiben ezen a területen kevés populáció található, és ezek nagymértékben izolálódtak egymástól.

Következtetések

Disszertáciomban a konzervációgenetika néhány kulcsfontosságú területét vizsgáltam kiválasztott Lepidoptera fajokon. A 10 esettanulmány mindegyikének egy-egy konkrét kérdés megválaszolása volt a célkitűzése. Ezek a kérdések azonban különbözőek voltak abban a tekintetben, hogy problémafelvetésük mennyire tekinthető eredetinek. Ebből a szempontból két csoportra lehet bontani a disszertációban összefoglalt tanulmányokat:

Olyan tanulmányok, amelyekben eredeti kérdéseket fogalmaztam meg, vagy szokatlan szemszögből vizsgáltam egy problémát. Vannak azonban olyan esettanulmányaim is, amelyeket én „reproduktív kutatásnak” tekintek. Ez utóbbi alatt azt értem, hogy magát a problémát már több kutató is elemezte, de vagy elméleti szempontból közelítette meg a kérdést, vagy más fajokon vizsgálta. Természetesen azokat a tanulmányokat tartom a legértékesebbnek, amelyekben a célkitűzések eredetiek, vagy a felvetett kérdések újszerűek.

Eredetinek tartom például azt a megközelítést, hogy egy faj genetikai struktúráját sok tényező mellett *intrinsic* faktorok is befolyásolhatják. Nevezetesen a sztochasztikus hatások felerősödhetnek abból adódóan is, hogy milyen a kérdéses faj szaporodási stratégiája vagy életmenete. Ebből a szempontból elemeztem két fajpárt, melyeknek sok tekintetben hasonló az ökológiai igénye, ezért bizonyos habitatokban együttesen (szüntopikusan) is megjelennek, miközben a szaporodási stratégiájuk vagy az életmenetük jelentős különbséget mutat. A *Parnassius mnemosyne* és az *Euphydryas maturna* szaporodási stratégiája olyan mértékig tér el egymástól, hogy az előbbi az r-K kontinuumban relatív K-, míg az utóbbi egyértelműen r-stratégista fajnak tekinthető. A szaporodási stratégiájukban meglévő jelentős különbségekre vezethető vissza, hogy Kárpát-medencei populációik genetikai struktúrájában egyértelműen kimutatható a sztochasztikus hatások erősségének a különbsége: az r-stratégista *E. maturna* populációkban alacsonyabb szintű variabilitást detektáltunk, ami párosult a differenciálódás földrajzi mintázatának a hiányával.

Tulajdonképpen hasonló eredményeket tapasztaltunk a másik fajpár esetében is (*Aricia artaxerxes issekutzii* és a *Maculinea alcon* cruciata ökotípusa), miközben a köztük lévő különbségek egészen más jellegűek voltak, nevezetesen az *A. artaxerxes* fakultatív, míg a *M. alcon* obligát mirmekofil faj. Az obligát mirmekofília jelentős kockázattal járó speciális életmenet, ami nagyon felerősíti a populációkban a sztochasztikus hatásokat. Ennek a genetikai következményeit tapasztaltuk a *M. alcon* észak-magyarországi populációiban: a variabilitás alacsony szintje mellett nem találtunk regionális mintázatot a genetikai differenciálódásban.

Ezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a különböző fajok nem egyformán érzékenyek a környezeti tényezők kedvezőtlen alakulására (pl. habitatok beszűkülése és leromlása, habitat fragmentáció stb.), melyek sok esetben éppen a sztochasztikus folyamatok felerősödésén keresztül fejtik ki a hatásukat. Az olyan fajok, mint az *E. maturna* vagy a *M. alcon* sokkal sérülékenyebbek, mint mások (pl. *P. mnemosyne* vagy az *A. artaxerxes*), mert szaporodási stratégiájuk, vagy életmenetük következtében a véletlen hatások eleve intenzívebben érvényesülnek populációikban. Talán nem véletlen, hogy ezek a fajok messze erőteljesebb hanyatlást mutatnak Európa-szerte, mint a többi Lepidoptera faj (van Swaay *et al.*, 2010). Ezek után az sem meglepő, hogy minkét faj úgynevezett ernyő fajnak tekinthető, melynek a védelme egyúttal sok más, rövidfűvű gyepten, vagy éppen laza szerkezetű erdőben élő rovar faj számára is védelmet biztosít (pl. Maes & Dyck, 2005; Spitzer *et al.*, 2009; Spitzer, 2012; Schmitt & Rákossy, 2007).

A beltenyészet genetikai következményeinek az elemzése sok konzervációgenetikai tanulmány célkitűzése. Ezeknek a tanulmányoknak a többsége a beltenyészetet kiváltó külső tényezőkkel (pl. Ellstrand & Elam, 1993; Madsen, Stille, & Shine, 1996 stb.), vagy a beltenyésztéses leromlással (pl. Hedrick & Kalinowski, 2000; Keller & Waller, 2002 stb.), esetleg éppen annak csökkentési lehetőségeivel foglalkozik (pl. Newman & Tallmon, 2001; Szulkin & Sheldon, 2008 stb.). Úgy tűnik azonban, hogy a kutatók kevés figyelmet fordítottak arra, hogy milyen belső tényezők (a faj biológiai jellemzői) vezethetnek a beltenyészet kialakulásához. Az *E. matura* előző vizsgálatának eredményei késztettek arra, hogy részletesebben is elemezzem az ok-okozati összefüggést a populációk jelentős méretbeli ingadozása, a magas szintű beltenyészet, és az alacsony effektív populációméret között. Már korábban is sejtettem, hogy a háttérváltozó a szaporodási stratégia lehet, de az összefüggések akkor tárultak fel számomra egyértelműen, amikor megtaláltam a módszert (gamétafázis meghatározása) a családstruktúra kimutatására. Így kapcsolódtak össze a fajra korábban leírt ökológiai jellemzők (mindenekelőtt a hernyófészkek túlélésének jelentős variáciája (Dolek *et al.* 2007)) a populációk általunk detektált család struktúrájával. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy az elsődleges ok a speciális szaporodási stratégia, aminek eredményeként a populációk jelentős hányadát mindössze néhány nőstény utódai alkotják. Ez vezet a populációk genetikai összetételében mutatkozó véletlen változásokra, és a magas szintű beltenyészetre is, aminek viszont egyértelmű következménye a populáció egyedszámának fluktuációja.

A látásmód egyediségét talán a *Maculinea alcon* pneumonanthe ökotípusának és a *M. teleius* populációknak az összehasonlító elemzésében a legnehezebb felfedezni. A *Maculinea* fajok speciális életmódja ugyanis már az 1980-as évektől vonzó téma volt az ökológusok számára. Majd a molekuláris taxonómiai vizsgálatok kiterjedtek a *M. alcon* és *M. rebeli* (helyesen *M. alcon* f. *xerophila*) faji státuszának a tisztázására (lásd a M.1.4. fejezetet), illetve arra, hogy a *Maculinea* genusz monofiletikus, vagy részét képezi a *Phengaris* genusznak (pl. Fric *et al.*, 2007 versus Ugelvig *et al.*, 2011). A *Maculinea* genusz fajainak ökológiai, filogenetikai és filogeográfiai vizsgálata azonban még ma is izgalmas téma („hot topic”) a szakirodalomban (pl. Fürst & Nash, 2010; Ritter *et al.*, 2013; Bereczki *et al.*, 2014). Az én kérdésfelvetésem azonban kicsit eltérő volt a korábban megjelent munkákhoz képest. Az első két tanulmányhoz hasonlóan ebben az esetben is azt kerestem, hogy a genetikai struktúra visszatükrözi-e a két faj életmenetében mutatkozó különbségeket, és ha igen, akkor hogyan. Vajon a peték eloszlásának különbségéből következő random hatások, vagy a lárvák közötti ökológiai különbségek lenyomatai a meghatározók? Eredményeim azt mutatták, hogy a szelekciós hatások annak ellenére is dominánsak a *Maculinea alcon* differenciálódási mintázatának a kialakításában, hogy a *Maculinea* fajok obligát mirmekofil életmenetének a következtében a genusz fajainak populációi intenzív genetikai sodródásnak vannak kitéve. A drift és a szelekció, mint a két leghatékonyabb evolúciós erő, közötti kölcsönhatás mindig is érdekes volt az evolúcióbiológusok számára (pl. a fenotípusos jellegek kapcsán: Lande, 1976; Orr, 1998; vagy a szigeteken zajló evolúciós folyamatokban: Barton & Mallet, 1996; sőt még a humán evolúció kapcsán is: Weaver, Roseman, & Stringer, 2007 stb.). A két *Maculinea* faj vizsgálatának az eredményei arra világítottak rá, hogy a diverzifikáló szelekció következtében fellépő lokális adaptáció messze jelentősebb lehet, mint a genetikai sodródás.

Mind a filogeográfiai, mind pedig a konzervációgenetikai szakirodalomban elterjedtek az úgynevezett „multilevel studies”, melyek több markert alkalmaznak egy faj

populációstruktúrájának a leírása során (pl. Gottelli *et al.*, 1994; Allendorf & Seeb, 2000; Ritter *et al.*, 2013 stb.). A legtöbb ilyen tanulmányban azonban a kutatók nem fordítanak kellő figyelmet arra, hogy a nukleáris markerek allélfrekvencia, esetleg genotípus adatai, illetve a mtDNS szekvencia adatok alapján kapott eredmények párhuzamos, vagy éppen ellentmondó jellege mit árul el a kérdéses faj genetikai struktúrájának a kialakulásáról. Így a *Parnassius mnemosyne*, illetve az *Euphydryas aurinia* Kárpát-medencei populációinak a vizsgálatát nem azért tartom újszerűnek, mert párhuzamosan több markert használtunk az elemzések során, hanem abból a szempontból, ahogy az eredményeket értékeltük. Nevezetesen összehasonlítottuk, a mtDNS haplotípusok megoszlása alapján feltárt (történeti múlt), illetve az enzimpolimorfizmus adatainak elemzése révén feltételezett (közeleli múlt) folyamatokat. A két eltérő idősíkon zajló változások, a glaciális ciklusokhoz kötődő área beszűkülések és expanziók, illetve a szüntelenül zajló genetikai sodródás és szelekció, vezethetnek hasonló vagy éppen ellentmondó eredményre a populációk recens struktúrájának a kialakításában.

A mtDNS haplotípusok és az enzim lokuszok genotípus megoszlása például eltérő genetikai struktúrát mutatott a Kárpát-medence keleti területeinek *P. mnemosyne* populációiban. Ezeket az ellenmondó eredményeket sikerült értelmezni azáltal, hogy elválasztottuk és párhuzamos idősíkon kezeltük a két markerrel feltárt képet. A mtDNS haplotípusok megoszlása alapján valószínűsítettük a populációk közös származását: a balkáni refúgiumból a kelet-balkáni kolonizációs útvonalon érkeztek a Kárpát-medence keleti területeire. Az enzim lokuszok segítségével pedig arra derítettünk fényt, hogy a keleti populációk regionális szerkezetének a kialakulásában fontos szerepet játszott a diverzifikáló szelekció.

Ugyanakkor az *E. aurinia* populációk esetében a két marker hasonló genetikai struktúrát sugallt, jelezvén, hogy mind a történeti, mind pedig a közeli múlt eseményei hozzájárultak a genetikai differenciálódás határozott regionális mintázatának a kialakításához. Ebben a tanulmányban a genetikai mellett a fenotípusos variabilitás szerkezetét is elemeztük (egy harmadik idősíki). Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a genetikai és a fenotípusos differenciálódás mintázata eltérő a Kárpát-medence nyugati részén, amennyiben a fenotípusos jellegek egy világos földrajzi klin mentén változnak ezekben a populációkban.

A disszertációban szereplő többi tanulmány azonban, magát a kérdésfeltevést illetően, nem tekinthető speciálisan eredetinek, lényegében a szakirodalomban már korábban is felvetett problémákat elemzi különböző Lepidoptera fajok populációiban. Ezeknek a tanulmányoknak az újszerűségét a legtöbb esetben a vizsgálati objektum adja.

A palacknyak hatás genetikai következményeinek a detektálása például számos faj esetében történt meg az E.1.1.3. fejezetben felhasznált statisztikai eszközök segítségével (pl. a grönlandi bálua esetében Rooney *et al.*, 1999; a nagy prérityúk wisconsini populációiban Bellinger *et al.*, 2003; egy mexikói cikász fajnál Cabrera-Toledo, González-Astorga, & Vovides, 2008 stb.). Nekünk szintén sikerült az *Aricia artaxerxes issekutzi* néhány bükki populációjában az allélok eloszlásának megváltozását és a heterozigóta többlet tendenciáját kimutatni. Ezzel egyúttal felhívtuk a figyelmet a kis, izolált bükki populációk veszélyeztetett voltára a nagy, stabil karszti populációkhoz képest. Egy szempontból azonban ez az esettanulmány is különös jelentőségű. A palacknyak kimutatásának az alapja ugyanis az, hogy hatására megváltozik az allélok eloszlása a populációban. Az alléloszlás megváltozásának az elemzésére azonban olyan markerek alkalmasak, melyeknek megfelelő szintű a variabilitása (pl. a mikroszatellitek: Whitehouse & Harley, 2001; Waldick *et al.*,

2002 stb.). Az a tény, hogy a palacknyak hatás genetikai következményeit az *A. artaxerxes issekutzi* esetében enzim lokuszokon sikerült detektálni, alátámasztja kutatómunkám alapvető feltételezését, hogy az *enzimpolimorfizmus szintje kellően magas a Lepidoptera fajokban ahhoz, hogy tükrözze a populációikban zajló evolúciós folyamatok genetikai következményeit.*

A konzervációgenetika alapvető egységeinek (ESU és FCU) a lehatárolása szintén számos publikációnak volt a célkitűzése (pl. ausztrál növényfajok esetében Coates, 2000; a *Maculinea alcon* belga populációinál Maes *et al.*, 2004; tengeri teknősöknél Wallace *et al.*, 2010 stb.). Így a disszertáció 3 utolsó tanulmánya bizonyos szempontból szintén reprodukzív kutatásnak tekinthető. Különösen igaz ez azzal a fejezettel kapcsolatban (E.4.1. fejezet), ahol a cél az ESU-k számának meghatározása volt a *Maculinea* fajok esetében. Ez a kérdés ugyanis szoros kapcsolatban áll azzal a korábban már említett taxonómiai problémával, hogy a *M. alcon* és a *M. rebeli* (helyesen *M. alcon* f. *xerophila*) önálló fajnak tekinthető-e. Mint azt korábban kifejtettem, számos publikáció foglalkozott ezzel a problémával (lásd a M.1.4. fejezetet, és az E.4.1. fejezetben az Elméleti háttér alfejezetet), aminek a megoldásához mi is hozzájárultunk az enzimpolimorfizmus vizsgálata során kapott eredményeinkkel. Kimutattuk, hogy a Kárpát-medencében 4 egyértelműen differenciálódott *Maculinea* faj található, vagyis a *M. alcon* és a *M. rebeli* (helyesen *M. alcon* f. *xerophila*) populációk között nem figyelhető meg világos genetikai elkülönülés.

A három tanulmány közül azonban kiemelném a *Maculinea nausithous* Kárpát-medencei populációinak a vizsgálatát. A konzervációs egységek fogalmának a használata ugyanis közel sem egyértelmű a konzervációgenetikai szakirodalomban. Még az ESU meghatározása is nagyon széles skálán mozog a jól definiált taxonoktól kezdve a genetikailag differenciálódott populációkig (a *Maculinea* fajok esetében pl. Als *et al.*, 2004; Sielezniew *et al.*, 2012; Casacci, Barbero, & Balletto, 2014 stb.). Mivel a vizsgált *M. nausithous* populációk között eltérő differenciálódási szinteket tapasztaltunk, ezért lehetőségünk volt arra, hogy egy tanulmányon belül ESU-t és FCU-t is kijelöljünk. Ennek két szempontból is ki kell emelni a jelentőségét. Egyrészt a két különböző konzervációs egység csak elvétve szerepel együtt a különböző esettanulmányokban. Ez a tény jelentősen hozzájárulhatott ahhoz a bizonytalansághoz, amit az ESU és az FCU alkalmazása kapcsán tapasztalhatunk a szakirodalomban. Másrészt viszont eredményeink egyértelműen illusztrálták a két egység közötti hierarchikus kapcsolatot (Maes *et al.*, 2004). *Valószínűleg éppen ez a hierarchikus kapcsolat a kulcsa annak, hogy konszenzus alakuljon ki az ESU és az FCU fogalmának a definíciójával kapcsolatban.*

Az *Euphydryas maturna* kelet-közép-európai populációinak a vizsgálata annak ellenére is jelentősnek tekinthető, hogy lényegében ez is egy „reprodukatív kutatás”, mert maga a vizsgálati objektum természetvédelmi szempontból rendkívül fontos. A díszes tarkalepke az egyik legveszélyeztetettebb Lepidoptera faj Európában (van Swaay *et al.*, 2010). Számos publikációban foglalkoznak a faj ökológiai és demográfiai elemzésével (lásd az E.1.1.1., és E.1.2.1. fejezetekben az Elméleti háttér alfejezeteket), genetikai vizsgálatokat azonban még semmilyen markerrel nem végeztek más kutató csoportok az *E. maturna* populációkban. Így eredményeink teljesen újak ennek a fajnak a vonatkozásában. Munkánk során sikerült kimutatni, hogy a faj kelet-közép-európai populációit alapvetően 3 genetikai vonal építi fel, ami összhangban van azzal, hogy a korábbi taxonómiai elemzésekben 3 alfajt írtak le (Varga & Sántha, 1973; Rákossy *et al.*, 2012). Ez alapján 3 FCU-t lehet elkülöníteni az *E. maturna* kelet-közép-európai populációiban, melyekből kettő fordul elő Magyarországon.

Köszönetnyilvánítás

Egész munkásságom során Dr. Varga Zoltán volt a szakmai vezetőm, és a rovarpopulációk genetikai struktúráját elemző publikációimnak az állandó társszerzője. A disszertáció keretei nem teszik lehetővé, hogy részletezzem azt a sokoldalú szakmai és olykor emberi támogatást és a sok tanácsot, amit a több mint 40 éves közös munka során Tőle kaptam. Köszönöm.

A másik tanácsadóm és kritikusom Dr. Papp László volt. A mintegy 40 éves ismeretségünk alatt sokszor tisztelt meg a véleményével és részesülhettem a támogatásában. Köszönöm.

Köszönettel tartozom továbbá valamennyi társszerzőmnek, akikkel közösen dolgoztunk egy-egy téma sikeres kidolgozásán. Mindenekelőtt Dr. Meglécz Emesének és Dr. Bereczki Juditnak, akiket legalább is „fele részben” a tanítványaimnak tekinthetek, valamint Hollós Amátának, Katona Gergelynek, Rácz Ritának, Szolnoki Noéminek, Dr. Tóth János Pálnak és Tóth Andreának. A társszerzők között külön szeretném Peregovits Lászlónak megköszönni a gondolatébresztő vitákat és megbeszéléseket, amik nemcsak a kéziratok születésekor zajlottak, hanem a kutatás tervezésétől kezdve folyamatosan a munka során.

A populációk genetikai struktúrájának a tanulmányozása rendkívül szerteágazó terület. Mindjárt az első részfeladat a minták begyűjtése. Ebben, a társszerzőkön túlmenően, sok hazai és külföldi kolléga vett részt, akiknek hálás vagyok a segítségért: A. Crisan, Dr. Ilonczay Zoltán, Korompai Tamás, Kozma Péter, Dr. Rákossy László, F. Rebousek, Dr. Sipos Júlia, Dr. Szabó Sándor, és Dr. Rudi Verovnik.

A megbízható laboratóriumi munka szintén alapvető feltétele annak, hogy jó eredmények szülessenek. Ebben pedig az elismerés elévülhetetlenül Mester Valériáé, akivel már több mint 30 éve dolgozom együtt a populációgenetikai laboratóriumban. Nagyon hálás vagyok neki alapos és lelkiismeretes munkájáért.

Az eredmények publikációvá való érésében szintén többen segítettek. A szakmai konzultációkban elsősorban Prof. Thomas Schmittet szeretném kiemelni, aki számos kézirat előzetes korrektúráját végezte el. A kéziratok angol nyelvi lektorálásában pedig Dr. Gareth Dyke és Dr. Végvári Zsolt munkáját kell megköszönnöm.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Barta Zoltánnak, az Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék vezetőjének, és a tanszék valamennyi munkatársának a támogatásukért. Közülük is külön kiemelném Nagyné Kapczár Emesét aki mindig készségesen segített az adminisztrációban.

A disszertációban szereplő tanulmányok nem jöhettek volna létre a különböző pályázatok támogatása nélkül. Elsősorban két nagy pályázatot szeretnék kiemelni, amelyekben kutatócsoportunk konzorciumi tagként vett részt: az EU MacMan projektet (EESD-ENV-2002-NAS); valamint az NKFP-3 projektet (B/023/2004 OM-00221/2004). Ezeken az összegükben is jelentős támogatásokon kívül két OTKA pályázat (OTKA T030528 és OTKA K84071), valamint egy FKFP pályázat (OM FKFP 0473/2000) biztosított anyagi fedezetet a munkánkhoz.

Természetvédelmi szempontból jelentős lepke fajok kutatásáról lévén szó, a munka alapfeltétele volt, hogy a természetvédelmi hatóságok engedélyezzék a megfelelő minták begyűjtését. Ebben elsősorban a magyar természetvédelmi hatóságoknak (a korábbi Természetvédelmi Hivatalnak, jelenleg pedig az Országos Környezetvédelmi és

Természetvédelmi Főfelügyelőségnek), valamint az Aggteleki és a Bükki Nemzeti Parkok vezetésének köszönöm a támogatását.

És nem utolsó sorban a családomnak, Édesanyámnak és lányomnak, valamint a barátaimnak tartozom köszönettel a türelemért, a biztatásért és a támogatásért, amit egész munkásságom alatt nyújtottak.

Irodalomjegyzék

Aagaard K, Hindar K, Pullin AS, et al. 2002. Phylogenetic relationships in brown argus butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae: Aricia) from northwestern Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **75**: 27–37.

Allendorf FW, Hohenlohe PA & Luikart G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* **11**: 697–709.

Allendorf FW & Luikart G. 2009. *Conservation and the Genetics of Populations*. John Wiley & Sons.

Allendorf FW & Seeb LW. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear dna, and mitochondrial dna markers. *Evolution* **54**: 640–651.

Als TD, Nash DR & Boomsma JJ. 2002. Geographical variation in host–ant specificity of the parasitic butterfly *Maculinea alcon* in Denmark. *Ecological Entomology* **27**: 403–414.

Als TD, Vila R, Kandul NP, et al. 2004. The evolution of alternative parasitic life histories in large blue butterflies. *Nature* **432**: 386–390.

Amos W & Balmford A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**: 257–265.

Andrén H. 1994. Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat: A Review. *Oikos* **71**: 355–366.

Andreone F, Cadle JE, Cox N, et al. 2005. Species Review of Amphibian Extinction Risks in Madagascar: Conclusions from the Global Amphibian Assessment. *Conservation Biology* **19**: 1790–1802.

Antao T, Lopes A, Lopes RJ, et al. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a F(st)-outlier method. *BMC Bioinformatics* **9**: 323.

Anthes N, Fartmann T, Hermann G, et al. 2003. Combining larval habitat quality and metapopulation structure – the key for successful management of pre-alpine *Euphydryas aurinia* colonies. *Journal of Insect Conservation* **7**: 175–185.

Árnyas E, Bereczki J, Tóth A, et al. 2006. Egg-laying preferences of the xerophilous ecotype of *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Aggtelek National Park. *European Journal of Entomology* **103**: 587–595.

Árnyas E, Bereczki J, Tóth A, et al. 2009. Oviposition preferences of *Maculinea alcon* as influenced by aphid (*Aphis gentianae*) and fungal (*Puccinia gentianae*) infestation of larval host plants. *Ecological Entomology* **34**: 90–97.

Avise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Springer Science & Business Media.

Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.

Avise JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.

- Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, et al. 2006.** Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7098–7110.
- Ballard JWO & Whitlock MC. 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**: 729–744.
- Barbero F, Thomas JA, Bonelli S, et al. 2009.** Queen Ants Make Distinctive Sounds That Are Mimicked by a Butterfly Social Parasite. *Science* **323**: 782–785.
- Barton NH & Mallet J. 1996.** Natural Selection and Random Genetic Drift as Causes of Evolution on Islands [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **351**: 785–795.
- Bearzi G, Holcer D & Notarbartolo di Sciara G. 2004.** The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **14**: 363–379.
- Beaumont M, Barratt EM, Gottelli D, et al. 2001.** Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology* **10**: 319–336.
- Beaumont MA & Nichols RA. 1996.** Evaluating Loci for Use in the Genetic Analysis of Population Structure. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **263**: 1619–1626.
- Bellinger MR, Johnson JA, Toepfer J, et al. 2003.** Loss of Genetic Variation in Greater Prairie Chickens Following a Population Bottleneck in Wisconsin, U.S.A. *Conservation Biology* **17**: 717–724.
- Berezcki J, Pecsénye K, Peregovits L, et al. 2005.** Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **43**: 157–165.
- Berezcki J, Pecsénye K & Varga Z. 2006.** Geographical versus food plant differentiation in populations of *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in Northern Hungary. *European Journal of Entomology* **103**: 725–732.
- Berezcki J, Tóth JP, Sramkó G, et al. 2014.** Multilevel studies on the two phenological forms of Large Blue (*Maculinea arion*) (Lepidoptera: Lycaenidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **52**: 32–43.
- Berezcki J, Tóth JP, Tóth A, et al. 2011.** The genetic structure of phenologically differentiated Large Blue (*Maculinea arion*) populations (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Carpathian Basin. *European Journal of Entomology* **108**: 519–527.
- Besold J, Schmitt T, Tammaru T, et al. 2008.** Strong genetic impoverishment from the centre of distribution in southern Europe to peripheral Baltic and isolated Scandinavian populations of the pearly heath butterfly. *Journal of Biogeography* **35**: 2090–2101.
- Betzholtz PE, Ehrig A, Lindeborg M, et al. 2007.** Food plant density, patch isolation and vegetation height determine occurrence in a Swedish metapopulation of the marsh fritillary *Euphydryas aurinia* (Rottemburg, 1775) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Journal of Insect Conservation* **11**: 343–350.
- Beuret H. 1954.** *Die Lycaeniden der Schweiz. Teil II.* Basel.
- Blackman RL. 1980.** Chromosome numbers in the Aphididae and their taxonomic significance. *Systematic Entomology* **5**: 7–25.
- Britten HB & Brussard PF. 1993.** Isozyme Data and the Taxonomy of Checkerspot Butterflies (*Euphydryas*). *Journal of Research on the Lepidoptera* **32**: 124–134.

- Brown WM. 1981.** Mechanisms of Evolution in Animal Mitochondrial DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* **361**: 119–132.
- Bruford MW & Wayne RK. 1993.** Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development* **3**: 939–943.
- Buckley J, Butlin RK & Bridle JR. 2012.** Evidence for evolutionary change associated with the recent range expansion of the British butterfly, *Aricia agestis*, in response to climate change. *Molecular Ecology* **21**: 267–280.
- Bulman CR, Wilson RJ, Holt AR, et al. 2007.** Minimum Viable Metapopulation Size, Extinction Debt, and the Conservation of a Declining Species. *Ecological Applications* **17**: 1460–1473.
- Burbrink FT, Lawson R & Slowinski JB. 2000.** Mitochondrial dna phylogeography of the polytypic north american rat snake (*elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* **54**: 2107–2118.
- Cabrera-Toledo D, González-Astorga J & Vovides AP. 2008.** Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society* **158**: 436–447.
- Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW. 2000.** B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **355**: 163–178.
- Casacci LP, Barbero F & Balletto E. 2014.** The ‘Evolutionarily Significant Unit’ concept and its applicability in biological conservation. *Italian Journal of Zoology* **81**: 182–193.
- Cavalli-Sforza LL & Edwards AWF. 1967.** Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**: 233–257.
- Chen J, Zheng H, Bei JX, et al. 2009.** Genetic Structure of the Han Chinese Population Revealed by Genome-wide SNP Variation. *The American Journal of Human Genetics* **85**: 775–785.
- Coates DJ. 2000.** Defining conservation units in a rich and fragmented flora: implications for the management of genetic resources and evolutionary processes in south-west Australian plants. *Australian Journal of Botany* **48**: 329–339.
- Colosimo PF, Hosemann KE, Balabhadra S, et al. 2005.** Widespread Parallel Evolution in Sticklebacks by Repeated Fixation of Ectodysplasin Alleles. *Science* **307**: 1928–1933.
- Cornuet JM & Luikart G. 1997.** Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics* **144**: 2001–2014.
- Courchamp F, Angulo E, Rivalan P, et al. 2006.** Rarity Value and Species Extinction: The Anthropogenic Allee Effect. *PLOS Biology* **4**: e415.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, et al. 2000.** Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 290–295.
- Cronin MA, Cánovas A, Bannasch DL, et al. 2015.** Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Variation of Wolves (*Canis lupus*) in Southeast Alaska and Comparison with Wolves, Dogs, and Coyotes in North America. *Journal of Heredity* **106**: 26–36.
- Cronin MA, Rincon G, Meredith RW, et al. 2014.** Molecular Phylogeny and SNP Variation of Polar Bears (*Ursus maritimus*), Brown Bears (*U. arctos*), and Black Bears (*U. americanus*) Derived from Genome Sequences. *Journal of Heredity* **105**: 312–323.
- Cushman SA. 2006.** Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* **128**: 231–240.

- Czekes Z, Markó B, Nash DR, et al. 2014.** Differences in oviposition strategies between two ecotypes of the endangered myrmecophilous butterfly *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) under unique syntopic conditions. *Insect Conservation and Diversity* **7**: 122–131.
- Deagle BE, Jones FC, Chan YF, et al. 2011.** Population genomics of parallel phenotypic evolution in stickleback across stream–lake ecological transitions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*: rspb20111552.
- Debinski DM. 1994.** Genetic diversity assessment in a metapopulation of the butterfly *Euphydryas gillettii*. *Biological Conservation* **70**: 25–31.
- van Delden W. 1982.** The Alcohol Dehydrogenase Polymorphism in *Drosophila melanogaster*. In: Hecht MK, Wallace B, Prance GT, eds. *Evolutionary Biology*. Springer US, 187–222.
- DeSalle R & Amato G. 2004.** The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**: 702–712.
- DeWayne Shoemaker D, Keller G & Ross KG. 2003.** Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. *Molecular Ecology* **12**: 1757–1771.
- DeWitt TJ & Scheiner SM. 2004.** *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*. Oxford University Press.
- Dobzhansky T. 1955.** A review of some fundamental concepts and problems of population genetics. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **20**: 1–10.
- Dolek M, Freese-Hager A, Cizek O, et al. 2007.** Mortality of early instars in the highly endangered butterfly *Euphydryas maturna* (Linnaeus, 1758) (Nymphalidae). *Nota lepidopterologica* **29**: 221–224.
- Dolek M, Freese-Hager A, Geyer A, et al. 2012.** Multiple oviposition and larval feeding strategies in *Euphydryas maturna* (Linné, 1758) (Nymphalidae) at two disjoint European sites. *Journal of Insect Conservation* **17**: 357–366.
- Dyck H van, Oostermeijer JGB, Talloen W, et al. 2000.** Does the presence of ant nests matter for oviposition to a specialized myrmecophilous *Maculinea* butterfly? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **267**: 861–866.
- Dykhuizen DE, Dean AM & Hartl DL. 1987.** Metabolic Flux and Fitness. *Genetics* **115**: 25–31.
- Eanes WF. 1999.** Analysis of Selection on Enzyme Polymorphisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**: 301–326.
- Earl DA & vonHoldt BM. 2011.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.
- Ebert G & Rennwald E. 1991.** *Die Schmetterlinge Baden-Württembergs. Band 1, Tagfalter I*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Egan SP, Nosil P & Funk DJ. 2008.** Selection and Genomic Differentiation During Ecological Speciation: Isolating the Contributions of Host Association Via a Comparative Genome Scan of *Neochlamisus Bebbianae* Leaf Beetles. *Evolution* **62**: 1162–1181.
- Eliasson CU & Shaw MR. 2003.** Prolonged life cycles, oviposition sites, foodplants and *Cotesia* parasitoids of Melitaeini butterflies in Sweden. *Oedippus* **21**: 1–52.
- Ellstrand NC & Elam DR. 1993.** Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 217–242.

- Elmes GW, Hammersted O, Martin J, et al. 1994.** Differences in host-ant specificity between Spanish, Dutch and Swedish populations of the endangered butterfly, *Maculinea alcon* (DENIS at SHIFF>)(Lepidoptera). *Memorabilia zoologica* **48**: 55–98.
- Elmes GW & Thomas JA. 1987.** Die Gattung *Maculinea*. In: *Schweizerische Bund für Naturschutz: Tagfalter und ihre Lebensräume: Arten, Gefährdung, Schutz*. Zurich: Fororotar AG.
- Elmes GW & Thomas JA. 1992.** Complexity of species conservation in managed habitats: interaction between *Maculinea* butterflies and their ant hosts. *Biodiversity & Conservation* **1**: 155–169.
- Elmes GW, Thomas JA & Wardlaw JC. 1991.** Larvae of *Maculinea rebeli*, a large-blue butterfly, and their *Myrmica* host ants: wild adoption and behaviour in ant-nests. *Journal of Zoology* **223**: 447–460.
- Elmes GW, Wardlaw JC & Thomas JA. 1991.** Larvae of *Maculinea rebeli*, a large-blue butterfly and their *Myrmica* host ants: patterns of caterpillar growth and survival. *Journal of Zoology* **224**: 79–92.
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G & Balding D. 2003.** Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Human Genomics* **1**: 7.
- Excoffier L & Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564–567.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.
- Falconer DS. 1989.** *Introduction to quantitative genetics*. Longman, Scientific & Technical.
- Fiedler K. 1991.** *Systematic, evolutionary, and ecological implications of myrmecophily within the Lycaenidae (Insecta:Lepidoptera:Papilionoidea)*. Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig.
- Fiedler K. 2001.** Ants that associate with Lycaeninae butterfly larvae: diversity, ecology and biogeography. *Diversity and Distributions* **7**: 45–60.
- Figurny E & Woyciechowski M. 1998.** Flowerhead selection for oviposition by females of the sympatric butterfly species *Maculinea teleius* and *M. nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Entomologia generalis* **23**: 215–222.
- Figurny-Puchalska E, Gadeberg RME & Boomsma JJ. 2000.** Comparison of genetic population structure of the large blue butterflies *Maculinea nausithous* and *M. teleius*. *Biodiversity & Conservation* **9**: 419–432.
- Filipi K, Marková S, Searle JB, et al. 2015.** Mitogenomic phylogenetics of the bank vole *Clethrionomys glareolus*, a model system for studying end-glacial colonization of Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **82, Part A**: 245–257.
- Francis B, Green M & Payne C. 1994.** *GLIM 4. The statistical system for generalised linear interactive modelling*. New York: Oxford University Press.
- Frankham R. 1995.** Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect. *Conservation Biology* **9**: 792–799.

- Frankham R. 2010a.** Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* **143**: 1919–1927.
- Frankham R. 2010b.** Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics* **11**: 661–663.
- Frankham R, Briscoe DA & Ballou JD. 2002.** *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Freese A, Benes J, Bolz R, et al. 2006.** Habitat use of the endangered butterfly *Euphydryas maturna* and forestry in Central Europe. *Animal Conservation* **9**: 388–397.
- Fric Z, Wahlberg N, Pech P, et al. 2007.** Phylogeny and classification of the Phengaris–Maculinea clade (Lepidoptera: Lycaenidae): total evidence and phylogenetic species concepts. *Systematic Entomology* **32**: 558–567.
- Funk DJ. 2010.** Does strong selection promote host specialisation and ecological speciation in insect herbivores? Evidence from *Neochlamisus* leaf beetles. *Ecological Entomology* **35**: 41–53.
- Funk WC, McKay JK, Hohenlohe PA, et al. 2012.** Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 489–496.
- Fürst MA & Nash DR. 2010.** Host ant independent oviposition in the parasitic butterfly *Maculinea alcon*. *Biology Letters* **6**: 174–176.
- Futuyma DJ. 2005.** *Evolution*. Sunderland: Sinauer Assoc. Inc.
- Futuyma DJ. 2006.** *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates.
- Gadeberg RME & Boomsma JJ. 1997.** Genetic population structure of the large blue butterfly *Maculinea alcon* in Denmark. *Journal of Insect Conservation* **1**: 99–111.
- Ganal MW, Altmann T & Röder MS. 2009.** SNP identification in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 211–217.
- García-Ramos G & Kirkpatrick M. 1997.** Genetic Models of Adaptation and Gene Flow in Peripheral Populations. *Evolution* **51**: 21–28.
- Geer BW, Heinstra PWH & McKechnie SW. 1993.** The biological basis of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **105**: 203–229.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al. 1980.** Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**: 6715–6719.
- Gilpin ME & Soulé ME. 1986.** Minimum viable populations: processes of species extinction. In: *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sunderland: Sinauer Associates, 19–34.
- Gómez Cano AR, Cantalapiedra JL, Mesa A, et al. 2013.** Global climate changes drive ecological specialization of mammal faunas: trends in rodent assemblages from the Iberian Plio-Pleistocene. *BMC Evolutionary Biology* **13**: 94.
- Gompert Z, Forister ML, Fordyce JA, et al. 2008.** Widespread mito-nuclear discordance with evidence for introgressive hybridization and selective sweeps in *Lycaeides*. *Molecular Ecology* **17**: 5231–5244.
- Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, et al. 1994.** Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology* **3**: 301–312.
- Goudet J. 1995.** FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485–486.

- Gratton P, Konopiński MK & Sbordoni V. 2008.** Pleistocene evolutionary history of the Clouded Apollo (*Parnassius mnemosyne*): genetic signatures of climate cycles and a 'time-dependent' mitochondrial substitution rate. *Molecular Ecology* **17**: 4248–4262.
- Gratton P & Sbordoni V. 2005.** Conservation Genetics and Phylogeography of *Parnassius mnemosyne*. In: *Studies on the ecology and conservation of butterflies in Europe. 1. General concepts and case studies*. Sofia, Moscow: Pensoft Publishers, 41–44.
- Haag CR, Saastamoinen M, Marden JH, et al. 2005.** A candidate locus for variation in dispersal rate in a butterfly metapopulation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **272**: 2449–2456.
- Habel JC, Rödder D, Schmitt T, et al. 2011.** Global warming will affect the genetic diversity and uniqueness of *Lycaena helle* populations. *Global Change Biology* **17**: 194–205.
- Habel JC & Schmitt T. 2009.** The genetic consequences of different dispersal behaviours in Lycaenid butterfly species. *Bulletin of Entomological Research* **99**: 513–523.
- Habel JC & Schmitt T. 2012.** The burden of genetic diversity. *Biological Conservation* **147**: 270–274.
- Habel JC, Schmitt T & Müller P. 2005.** The fourth paradigm pattern of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the Marbled White butterfly (Satyrinae, Lepidoptera). *Journal of Biogeography* **32**: 1489–1497.
- Hammer Ø, Harper DAT & Ryan PD. 2001.** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9.
- Hartl DL. 1988.** *A primer of population genetics*. Sunderland: Sinauer Assoc. Inc.
- Hartl DL, Dykhuizen DE & Dean AM. 1985.** Limits of Adaptation: The Evolution of Selective Neutrality. *Genetics* **111**: 655–674.
- Haslett JR. 1996.** *Hypodryas maturna*. In: *Background information on invertebrates of the Habitats Directive and the Bern Convention. Part I – Crustacea, Coleoptera and Lepidoptera*. Strasbourg: Council of Europe, Nature and Environment, 140–144.
- Hedrick PW. 1985.** *Genetics of Populations*. Jones & Bartlett Learning.
- Hedrick PW. 2011.** *Genetics of Populations*. Jones & Bartlett Learning.
- Hedrick PW & Kalinowski ST. 2000.** Inbreeding Depression in Conservation Biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **31**: 139–162.
- Henle K, Alard D, Clitherow J, et al. 2008.** Identifying and managing the conflicts between agriculture and biodiversity conservation in Europe—A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **124**: 60–71.
- Hereford J. 2009.** A Quantitative Survey of Local Adaptation and Fitness Trade- Offs. *The American Naturalist* **173**: 579–588.
- Hewitt GM. 2001.** Speciation, hybrid zones and phylogeography — or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: 537–549.
- Hewitt GM. 2004.** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **359**: 183–195.
- Hewitt GM. 2011.** Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* **139**: 617–638.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, et al. 2010.** Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 291–301.

- Hillis DM & Moritz C. 1990.** *Molecular Systematics*. W.H. Freeman.
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, et al. 2005.** Whole-Genome Patterns of Common DNA Variation in Three Human Populations. *Science* **307**: 1072–1079.
- Hochberg ME, Clarke RT, Elmes GW, et al. 1994.** Population Dynamic Consequences of Direct and Indirect Interactions Involving a Large Blue Butterfly and its Plant and Red Ant Hosts. *Journal of Animal Ecology* **63**: 375–391.
- Hoegh-Guldberg O. 1966.** North European groups of *Aricia* allous G-Hb. Their variability and Relationship to *A. agestis* Schiff. *Natura Jutlandica* **13**: 1–184.
- Hoegh-Guldberg O. 1968.** Evolutionary trends in the genus *Aricia*. *Natura Jutlandica* **14**: 1–76.
- Hoegh-Guldberg O & Jarvis FVL. 1969.** Central and North European *Ariciae* (Lep.). Relationships, Heredity, Evolution. *Natura Jutlandica* **15**: 1–106.
- Hoelzel AR, Natoli A, Dahlheim ME, et al. 2002.** Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**: 1467–1473.
- Hollós A, Pecsénye K, Bereczki J, et al. 2012.** Pattern of genetic and morphometric differentiation in *Maculinea nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Carpathian Basin. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **58**: 87–103.
- Hottinger H, Schlick-Steiner BC & Steiner PM (University of AS). 2003.** The Alcon blue *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in eastern Austria: status and conservation measures. *International journal for ecological problems of the biosphere*.
- Hula V, Konvicka M, Pavlicko A, et al. 2004.** Marsh Fritillary (*Euphydryas aurinia*) in the Czech Republic: monitoring, metapopulation structure, and conservation of an endangered butterfly. *Entomologica Fennica* **15**: 231–241.
- Hurlbert SH. 1971.** The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. *Ecology* **52**: 577–586.
- Hurst GDD & Jiggins FM. 2005.** Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **272**: 1525–1534.
- Hutchison DW & Templeton AR. 1999.** Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution* **53**: 1898–1914.
- Jarne P & Lagoda PJJL. 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 424–429.
- Jentzsch A, Köhler G & Schumacher J. 2003.** Environmental stress and fluctuating asymmetry in the grasshopper *Chorthippus parallelus* (Acrididae: Gomphocerinae). *Zoology* **106**: 117–125.
- Jiggins FM. 2003.** Male-Killing *Wolbachia* and Mitochondrial DNA: Selective Sweeps, Hybrid Introgression and Parasite Population Dynamics. *Genetics* **164**: 5–12.
- Jones N & Houben A. 2003.** B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science* **8**: 417–423.
- Jones GP, McCormick MI, Srinivasan M, et al. 2004.** Coral decline threatens fish biodiversity in marine reserves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8251–8253.

- Joyce DA & Pullin AS. 2001.** Phylogeography of the Marsh Fritillary *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in the UK. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**: 129–141.
- Joyce DA & Pullin AS. 2003.** Conservation implications of the distribution of genetic diversity at different scales: a case study using the marsh fritillary butterfly (*Euphydryas aurinia*). *Biological Conservation* **114**: 453–461.
- Junker M, Zimmermann M, Ramos AA, et al. 2015.** Three in One—Multiple Faunal Elements within an Endangered European Butterfly Species. *PLOS ONE* **10**: e0142282.
- Kaaber S & Hoegh-Guldberg O. 1961.** *Aricia allous* Hb. ssp. *vandalica* nov. *Flora og Fauna. Meddelse fra Naturhistorisk Museum Aarhus* **67**: 122–128.
- Kalinowski ST, Wagner AP & Taper ML. 2006.** ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* **6**: 576–579.
- Kames P. 1969.** *Aricia artaxerxes* spp. nova *hercynica*. *Natura Jutlandica* **15**: 107–119.
- Kawecki TJ & Ebert D. 2004.** Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**: 1225–1241.
- Keller LF & Waller DM. 2002.** Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 230–241.
- Kéry M, Matthies D & Fischer M. 2001.** The effect of plant population size on the interactions between the rare plant *Gentiana cruciata* and its specialized herbivore *Maculinea rebeli*. *Journal of Ecology* **89**: 418–427.
- Kijas JW, Townley D, Dalrymple BP, et al. 2009.** A Genome Wide Survey of SNP Variation Reveals the Genetic Structure of Sheep Breeds. *PLOS ONE* **4**: e4668.
- Kim S & Misra A. 2007.** SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**: 289–320.
- King TL, Kalinowski ST, Schill WB, et al. 2001.** Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. *Molecular Ecology* **10**: 807–821.
- Kirkpatrick M & Barton NH. 1997.** Evolution of a Species' Range. *The American Naturalist* **150**: 1–23.
- Kizic M & Borovac M. 2001.** ImageJ: Image Processing and Analysis in Java. <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/pdfs/imagej-gui.pdf>.
- Kodandaramaiah U, Simonsen TJ, Bromilow S, et al. 2013.** Deceptive single-locus taxonomy and phylogeography: Wolbachia-associated divergence in mitochondrial DNA is not reflected in morphology and nuclear markers in a butterfly species. *Ecology and Evolution* **3**: 5167–5176.
- Koehn RK, Milkman R & Mitton JB. 1976.** Population Genetics of Marine Pelecypods. IV. Selection, Migration and Genetic Differentiation in the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* **30**: 2–32.
- Koehn RK & Mitton JB. 1972.** Population Genetics of Marine Pelecypods. I. Ecological Heterogeneity and Evolutionary Strategy at an Enzyme Locus. *The American Naturalist* **106**: 47–56.
- Kohn MH, Murphy WJ, Ostrander EA, et al. 2006.** Genomics and conservation genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 629–637.
- Konvička M, Cížek, O., Filipová, L., et al. 2005.** For whom the bells toll: Demography of the last po...: Full Text Finder Results. *Biologia, Bratislava* **60**: 551–557.

- Konvicka M, Duchoslav M, Harastova M, et al. 2001.** Habitat utilization and behaviour of adult *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera: Papilionidae) in the Litovelské Pomoraví, Czech Republic. *Nota Lepidopterologica* **25**: 39–51.
- Konvicka M, Hula V & Fric Z. 2003.** Habitat of pre-hibernating larvae of the endangered butterfly *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae): What can be learned from vegetation composition and architecture? *European Journal of Entomology* **100**: 313–322.
- Konvička M & Kuras T. 1999.** Population Structure, Behaviour and Selection of Oviposition Sites of an Endangered Butterfly, *Parnassius Mnemosyne*, in Litovelské Pomoraví. Czech Republic. *Journal of Insect Conservation* **3**: 211–223.
- Kooyers NJ & Olsen KM. 2012.** Rapid evolution of an adaptive cyanogenesis cline in introduced North American white clover (*Trifolium repens* L.). *Molecular Ecology* **21**: 2455–2468.
- Kőrösi Á, Örvössy N, Batáry P, et al. 2008.** Restricted within-habitat movement and time-constrained egg laying of female *Maculinea rebeli* butterflies. *Oecologia* **156**: 455–464.
- Kotlík P, Deffontaine V, Mascheretti S, et al. 2006.** A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 14860–14864.
- Krauss J, Schmitt T, Seitz A, et al. 2004.** Effects of habitat fragmentation on the genetic structure of the monophagous butterfly *Polyommatus coridon* along its northern range margin. *Molecular Ecology* **13**: 311–320.
- Kudrna O. 2002.** The distribution atlas of European butterflies. *Oedippus* **20**: 1–343.
- Lacy RC. 1997.** Importance of Genetic Variation to the Viability of Mammalian Populations. *Journal of Mammalogy* **78**: 320–335.
- Lande R. 1976.** Natural Selection and Random Genetic Drift in Phenotypic Evolution. *Evolution* **30**: 314–334.
- Lande R. 1988.** Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241**: 1455–1460.
- Lande R & Barrowclough GF. 1987.** Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: *Viable populations for conservation*. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press, 87–125.
- Larson S, Jameson R, Etnier M, et al. 2002.** Loss of genetic diversity in sea otters (*Enhydra lutris*) associated with the fur trade of the 18th and 19th centuries. *Molecular Ecology* **11**: 1899–1903.
- Leary RF & Allendorf FW. 1989.** Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* **4**: 214–217.
- Leberg PL. 1996.** Applications of allozyme electrophoresis in conservation biology. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. New York: Oxford University Press, 87–103.
- Lenormand T. 2002.** Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 183–189.
- Lens L, Van Dongen S & Matthysen E. 2002.** Fluctuating Asymmetry as an Early Warning System in the Critically Endangered Taita Thrush. *Conservation Biology* **16**: 479–487.
- Levene H. 1960.** Robust testes for equality of variances. In: *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Palo Alto: Stanford University Press.
- Lewontin RC. 1974.** *The genetic basis of evolutionary change*. New York: Columbia University Press.

- Lewontin RC & Hubby JL. 1966.** A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. II. Amount of Variation and Degree of Heterozygosity in Natural Populations of *DROSOPHILA PSEUDOOBSCURA*. *Genetics* **54**: 595–609.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, et al. 2004.** Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 991–1007.
- Liu W, Wang Y & Xu R. 2006.** Habitat utilization by ovipositing females and larvae of the Marsh fritillary (*Euphydryas aurinia*) in a mosaic of meadows and croplands. *Journal of Insect Conservation* **10**: 351–360.
- Louy D, Habel JC, Schmitt T, et al. 2007.** Strongly diverging population genetic patterns of three skipper species: the role of habitat fragmentation and dispersal ability. *Conservation Genetics* **8**: 671–681.
- Louy D, Habel JC, Ulrich W, et al. 2013.** Out of the Alps: The Biogeography of a Disjunctly Distributed Mountain Butterfly, the Almond-Eyed Ringlet *Erebia alberganus* (Lepidoptera, Satyrinae). *Journal of Heredity*: est081.
- Lowe A, Harris S & Ashton P. 2009.** *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. John Wiley & Sons.
- Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O, et al. 2004.** Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 1064–1083.
- Luikart G & Cornuet JM. 1998.** Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottlenecked Populations from Allele Frequency Data. *Conservation Biology* **12**: 228–237.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM, et al. 1998.** Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* **7**: 963–974.
- Lukhtanov VA & Lukhtanov AG. 1994.** *Die Tagfalter Nordwestasiens (Lepidoptera, Diurna) (Herbipoliana: Buchreihe zur Lepidopterologie 3)*. Markleuthen: Verl. Dr. Ulf Eitschberger .,
- Lynch M & Walsh B. 1998.** *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer.
- MacArthur RH & Wilson EO. 1967.** *Theory of Island Biogeography. (MPB-1)*. Princeton University Press.
- Madsen T, Stille B & Shine R. 1996.** Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**: 113–118.
- Maes D & Dyck HV. 2005.** Habitat quality and biodiversity indicator performances of a threatened butterfly versus a multispecies group for wet heathlands in Belgium. *Biological Conservation* **123**: 177–187.
- Maes D, Vanreusel W, Talloen W, et al. 2004.** Functional conservation units for the endangered Alcon Blue butterfly *Maculinea alcon* in Belgium (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biological Conservation* **120**: 229–241.
- Magri D. 2008.** Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *Journal of Biogeography* **35**: 450–463.
- Magri D, Vendramin GG, Comps B, et al. 2006.** A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* **171**: 199–221.
- Mahalanobis PC. 1936.** On the generalized distance in statistics. *Proc. Nat. Inst. Sci. India* **2**: 49–55.

- Malicky H. 1969.** Übersicht über Präimaginalstadien, Bionomie und Ökologie der mitteleuropäischen Lycaenidae (Lepidoptera). *Mitteilungen der entomologischen Gesellschaft Basel* **19**: 25–91.
- Manchenko GP. 2002.** *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. CRC Press.
- Mantel N. 1967.** The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* **27**: 209–220.
- Martin RA & Pfennig DW. 2009.** Disruptive Selection in Natural Populations: The Roles of Ecological Specialization and Resource Competition. *The American Naturalist* **174**: 268–281.
- May B. 1992.** Starch gel electrophoresis of allozymes. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations*. Oxford: IRL Press.
- Maynard Smith J. 1989.** *Evolutionary genetics*. Oxford: Oxford University Press.
- Mayr E & Provine WB. 1981.** The Evolutionary Synthesis. *Bulletin of the American Academy of Arts and Sciences* **34**: 17–32.
- McKechnie SW, Ehrlich PR & White RR. 1975.** Population Genetics of Euphydryas Butterflies. I. Genetic Variation and the Neutrality Hypothesis. *Genetics* **81**: 571–594.
- McLaughlin JF, Hellmann JJ, Boggs CL, et al. 2002.** Climate change hastens population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 6070–6074.
- McNally KL, Childs KL, Bohnert R, et al. 2009.** Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 12273–12278.
- McPhail JD. 1984.** Ecology and evolution of sympatric sticklebacks (*Gasterosteus*): morphological and genetic evidence for a species pair in Enos Lake, British Columbia. *Canadian Journal of Zoology* **62**: 1402–1408.
- McVean GAT, Myers SR, Hunt S, et al. 2004.** The Fine-Scale Structure of Recombination Rate Variation in the Human Genome. *Science* **304**: 581–584.
- Megléczy E, Pecsénye K, Peregovits L, et al. 1997.** Allozyme variation in *Parnassius mnemosyne* (L.) (Lepidoptera) populations in North-East Hungary: variation within a subspecies group. *Genetica* **101**: 59–66.
- Meister H, Lindman L & Tammaru T. 2015.** Testing for local monophagy in the regionally oligophagous *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Conservation* **19**: 691–702.
- Mitton JB. 1997.** *Selection in Natural Populations*. Oxford University Press.
- Morin PA, Luikart G & Wayne RK. 2004.** SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 208–216.
- Moritz C. 1994.** Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**: 373–375.
- Munguira ML & Martin J. 1999.** *Action Plan for Maculinea Butterflies in Europe*. Council of Europe.
- Murphy RW, Sits JW, Buth UG, et al. 1990.** Proteins I. Isozyme electrophoresis. In: *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer Associates, 45–126.
- Narita S, Kato Y, Nomura M, et al. 2006.** Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: Evolutionary and biogeographical implications. *Molecular Ecology* **15**: 1095–1108.

- Nash DR, Als TD & Boomsma JJ. 2011.** Survival and growth of parasitic *Maculinea alcon* caterpillars (Lepidoptera, Lycaenidae) in laboratory nests of three *Myrmica* ant species. *Insectes Sociaux* **58**: 391–401.
- Nash DR, Als TD, Maile R, et al. 2008.** A Mosaic of Chemical Coevolution in a Large Blue Butterfly. *Science* **319**: 88–90.
- Navarro A & Barton NH. 2003.** Chromosomal Speciation and Molecular Divergence--Accelerated Evolution in Rearranged Chromosomes. *Science* **300**: 321–324.
- Nazari V & Sperling FAH. 2007.** Mitochondrial DNA divergence and phylogeography in western Palaearctic Parnassiinae (Lepidoptera: Papilionidae): How many species are there? *Insect Systematics & Evolution* **38**: 121–138.
- Nei M. 1978.** Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Neve G, Barascud B, Descimon H, et al. 2008.** Gene flow rise with habitat fragmentation in the bog fritillary butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae). *BMC Evolutionary Biology* **8**: 84.
- Nevo E. 1978.** Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theoretical Population Biology* **13**: 121–177.
- Nevo E. 2001.** Speciation: Chromosomal Mechanisms. In: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Nevo E, Beiles A & Ben-Shlomo R. 1984.** The Evolutionary Significance of Genetic Diversity: Ecological, Demographic and Life History Correlates. In: *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity*. Springer, Berlin, Heidelberg, 13–213.
- New TR. 1997.** Are Lepidoptera an effective ‘umbrella group’ for biodiversity conservation? *Journal of Insect Conservation* **1**: 5–12.
- Newman D & Tallmon DA. 2001.** Experimental Evidence for Beneficial Fitness Effects of Gene Flow in Recently Isolated Populations. *Conservation Biology* **15**: 1054–1063.
- Nice CC & Shapiro AM. 1999.** Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepidoptera: Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 936–950.
- Nosil P. 2007.** Divergent Host Plant Adaptation and Reproductive Isolation between Ecotypes of *Timema cristinae* Walking Sticks. *The American Naturalist* **169**: 151–162.
- Nosil P, Funk DJ & Ortiz-Barrientos D. 2009.** Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**: 375–402.
- Nowicki P, Pepkowska A, Kudlek J, et al. 2007.** From metapopulation theory to conservation recommendations: Lessons from spatial occurrence and abundance patterns of *Maculinea* butterflies. *Biological Conservation* **140**: 119–129.
- Nyström V, Angerbjörn A & Dalén L. 2006.** Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos* **114**: 84–94.
- Obraztsov S. 1935.** *Lycaena* (*Aricia*) *allous* Hb. und ihre östlichen Rassen. *Folia Zoologica et Hydrobiologica Riga* **8**: 141–150.
- Obraztsov S. 1936.** Weiteres über *Lycaena* (*Aricia*) *allous* Hb. *Folia Zoologica et Hydrobiologica Riga* **9**: 58–61.
- Orr HA. 1998.** Testing Natural Selection vs. Genetic Drift in Phenotypic Evolution Using Quantitative Trait Locus Data. *Genetics* **149**: 2099–2104.

- Orsini L, Wheat CW, Haag CR, et al. 2009.** Fitness differences associated with Pgi SNP genotypes in the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 367–375.
- Ouborg NJ, Pertoldi C, Loeschcke V, et al. 2010.** Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* **26**: 177–187.
- Palmer AR & Strobeck C. 1986.** Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 391–421.
- Palomares F, Godoy JA, López-Bao JV, et al. 2012.** Possible Extinction Vortex for a Population of Iberian Lynx on the Verge of Extirpation. *Conservation Biology* **26**: 689–697.
- Palsbøll PJ, Bérubé M & Allendorf FW. 2007.** Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 11–16.
- Paradis E. 2010.** pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* **26**: 419–420.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, et al. 1998.** What Molecules Can Tell Us About Populations: Choosing Andusing a Molecular Marker. *Ecology* **79**: 361–382.
- Peakall R & Smouse PE. 2006.** genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Pech P, Fric Z, Konvička M, et al. 2004.** Phylogeny of Maculinea blues (Lepidoptera: Lycaenidae) based on morphological and ecological characters: evolution of parasitic myrmecophily. *Cladistics* **20**: 362–375.
- Pecsenye K, Bereczki J, Juhász E, et al. 2015.** Contrasting genetic structure in cuckoo and predatory Maculinea butterflies. *Conservation Genetics* **16**: 939–954.
- Pecsenye K, Bereczki J, Szilágyi M, et al. 2007a.** High level of genetic variation in *Aricia artaxerxes issekutzi* (Lycaenidae) populations in Northern Hungary. *Nota lepidopterologica* **30**: 225–234.
- Pecsenye K, Bereczki J, Tihanyi B, et al. 2007b.** Genetic differentiation among the Maculinea species (Lepidoptera: Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 11–21.
- Pertoldi C, Hansen MM, Loeschcke V, et al. 2001.** Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assessment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **268**: 1775–1781.
- Pierce NE. 1989.** Butterfly-ant mutualisms. In: *Toward a More Exact Ecology*. Oxford: Blackwell Sci, 299–324.
- Pierce NE, Braby MF, Heath A, et al. 2002.** The Ecology and Evolution of Ant Association in the Lycaenidae (lepidoptera). *Annual Review of Entomology* **47**: 733–771.
- Podani J. 1997.** *Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe*. Budapest: Scientia Kiadó.
- Porter K. 1982.** Basking Behaviour in Larvae of the Butterfly *Euphydryas Aurinia*. *Oikos* **38**: 308–312.
- Powell JR. 1997.** *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model*. Oxford University Press.

- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Provine WB. 2001.** *The Origins of Theoretical Population Genetics: With a New Afterword.* University of Chicago Press.
- QGISDevelopmentTeam. 2014.** *Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.* <http://qgis.osgeo.org>.
- Queller DC & Goodnight KF. 1989.** Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258–275.
- Rácz R, Bereczki J, Sramkó G, et al. 2015.** Isolation and Characterisation of 15 Microsatellite Loci from *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae). *Annales Zoologici Fennici* **52**: 45–50.
- Rakonczay Z. 1990.** *Vörös Könyv. (Red Book).* Budapest: Akadémiai Kiadó.
- Rákósy L, Pecsénye, K., Mihali, C., et al. 2012.** Taxonomic review of *Euphydryas maturna* (Linnaeus, 1758)(Lepidoptera, Nymphalidae) with description of a new subspecies from Dobrogea (Romania) and notes on conservation biology. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **58**: 145–161.
- Rákósy L, Tartally A, Goia M, et al. 2010.** The Dusky Large Blue - *Maculinea nausithous kijeensis* (Sheljuzhko, 1928) in the Transylvanian basin: New data on taxonomy and ecology. *Nota Lepidopterologica* **33**: 31–37.
- Ravenscroft NOM & Warren MS. 1996.** *Species action plan northern brown argus (Aricia artaxerxes).* Dorset: Butterfly Conservation Warsham.
- Raymond M & Rousset F. 1995.** An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**: 1280–1283.
- Reusch TBH, Wegner KM & Kalbe M. 2001.** Rapid genetic divergence in postglacial populations of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): the role of habitat type, drainage and geographical proximity. *Molecular Ecology* **10**: 2435–2445.
- Richardson BJ, Baverstock PR & Adams M. 2012.** *Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies.* Academic Press.
- Ridley M. 2003.** *Evolution.* Wiley.
- Rieseberg LH. 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 351–358.
- Ritter S, Michalski SG, Settele J, et al. 2013.** Wolbachia Infections Mimic Cryptic Speciation in Two Parasitic Butterfly Species, *Phengaris teleius* and *P. nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae). *PLOS ONE* **8**: e78107.
- Rooney AP, Honeycutt RL, Davis SK, et al. 1999.** Evaluating a Putative Bottleneck in a Population of Bowhead Whales from Patterns of Microsatellite Diversity and Genetic Disequilibrium. *Journal of Molecular Evolution* **49**: 682–690.
- Ryder OA. 1986.** Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* **1**: 9–10.
- Saarinen K, Jantunen J & Valtonen A. 2005.** Resumed forest grazing restored a population of *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in SE Finland. *European Journal of Entomology* **102**: 683–690.

- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Höttinger H, et al. 2004.** A butterfly's chemical key to various ant forts: intersection-odour or aggregate-odour multi-host mimicry? *Naturwissenschaften* **91**: 209–214.
- Schlötterer C. 1998.** Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology* **8**: R132–R134.
- Schmitt T. 2007a.** Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* **4**: 11.
- Schmitt T. 2007b.** Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* **4**: 11.
- Schmitt T, Giessl A & Seitz A. 2003.** Did *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) have distinct glacial refugia in southern Europe? Evidence from population genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 529–538.
- Schmitt T, Habel JC, Zimmermann M, et al. 2006.** Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology* **15**: 1889–1901.
- Schmitt T & Haubrich K. 2008.** The genetic structure of the mountain forest butterfly *Erebia euryale* unravels the late Pleistocene and postglacial history of the mountain coniferous forest biome in Europe. *Molecular Ecology* **17**: 2194–2207.
- Schmitt T & Müller P. 2007.** Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly *Erebia medusa* (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **45**: 39–46.
- Schmitt T & Rákossy L. 2007.** Changes of traditional agrarian landscapes and their conservation implications: a case study of butterflies in Romania. *Diversity and Distributions* **13**: 855–862.
- Schmitt T, Rákossy L, Abadjiev S, et al. 2007.** Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography* **34**: 939–950.
- Schmitt T, Röber S & Seitz A. 2005.** Is the last glaciation the only relevant event for the present genetic population structure of the Meadow Brown butterfly *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Nymphalidae)? *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 419–431.
- Schmitt T & Seitz A. 2001.** Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography* **28**: 1129–1136.
- Schmitt T & Seitz A. 2002.** Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): implications for conservation. *Biological Conservation* **107**: 291–297.
- Schmitt T & Seitz A. 2008.** Intraspecific allozymatic differentiation reveals the glacial refugia and the postglacial expansions of European *Erebia medusa* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **74**: 429–458.
- Schmitt T & Varga Z n. 2012.** Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? *Frontiers in Zoology* **9**: 22–33.
- Schönrogge K, Wardlaw JC, Peters AJ, et al. 2004.** Changes in Chemical Signature and Host Specificity from Larval Retrieval to Full Social Integration in the Myrmecophilous Butterfly *Maculinea rebeli*. *Journal of Chemical Ecology* **30**: 91–107.

- Schtickzelle N, Choutt J, Goffart P, et al. 2005.** Metapopulation dynamics and conservation of the marsh fritillary butterfly: Population viability analysis and management options for a critically endangered species in Western Europe. *Biological Conservation* **126**: 569–581.
- Selander RK & Whittam TS. 1983.** Protein polymorphism and the genetic structure of populations. In: *Evolution of Genes and Protein*. Sunderland: Sinauer Associates, 89–114.
- Shaw CR & Prasad R. 1970.** Starch gel electrophoresis of enzymes—A compilation of recipes. *Biochemical Genetics* **4**: 297–320.
- Sibatani A, Saigusa T & Hirowatari T. 1994.** The genus *Maculinea* van Eecke, 1915 (Lepidoptera: Lycaenidae) from the East Palearctic Region. *Tyo to Ga* **44**: 157–220.
- Sielezniew M, Dziekańska I & Stankiewicz-Fiedurek AM. 2010.** Multiple host-ant use by the predatory social parasite *Phengaris* (=Maculinea) *arion* (Lepidoptera, Lycaenidae). *Journal of Insect Conservation* **14**: 141–149.
- Sielezniew M, Rutkowski R, Ponikwicka-Tyszko D, et al. 2012.** Differences in genetic variability between two ecotypes of the endangered myrmecophilous butterfly *Phengaris* (=Maculinea) *alcon*—the setting of conservation priorities. *Insect Conservation and Diversity* **5**: 223–236.
- Sielezniew M, Sielezniew M, Zoologii PANM i I, et al. 2002.** *Specyficzność pasożytniczego motyla Maculinea alcon (Den. & Schiff.) (Lepidoptera: Lycaenidae) względem mrówek-gospodarzy: pierwsze dane dla Polski i Europy Wschodniej*. Museum and Institute of Zoology, PAS.
- Sielezniew M & Stankiewicz AM. 2004.** First data on host-ant specificity of parasitic butterfly *Maculinea alcon* (Den. and Schiff.) (Lepidoptera: Lycaenidae) in Poland and eastern Europe. *European Journal of Entomology* **101**: 693–696.
- Sielezniew M & Stankiewicz A. 2008.** *Myrmica sabuleti* (Hymenoptera: Formicidae) not necessary for the survival of the population of *Phengaris* (Maculinea) *arion* (Lepidoptera: Lycaenidae) in eastern Poland: Lower host-ant specificity or evidence for geographical variation of an endangered social parasite? - ProQuest. *European Journal of Entomology* **105**: 637–641.
- Sigaard P, Pertoldi C, Madsen AB, et al. 2008.** Patterns of genetic variation in isolated Danish populations of the endangered butterfly *Euphydryas aurinia*. *Biological Journal of the Linnean Society* **95**: 677–687.
- Singh JS. 2002.** The biodiversity crisis: A multifaceted review. *Current Science* **82**: 638–647.
- Slatkin M. 1985.** Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* **39**: 53–65.
- Smee M, Smyth W, Tunmore M, et al. 2011.** Butterflies on the brink: habitat requirements for declining populations of the marsh fritillary (*Euphydryas aurinia*) in SW England. *Journal of Insect Conservation* **15**: 153–163.
- Smith TB & Wayne RK. 1996.** *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press.
- Sneath PH & Sokal RR. 1973.** *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Sobrino B, Brión M & Carracedo A. 2005.** SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* **154**: 181–194.
- Sokal RR & Rohlf FJ. 1981.** *Biometry*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Soulé ME. 1987.** *Viable Populations for Conservation*. Cambridge University Press.
- Spieß EB. 1977.** *Genes in populations*. New York: John Wiley & Sons.

- Spitzer K. 2012.** Insect Conservation Developments in Central Europe. In: New TR, ed. *Insect Conservation: Past, Present and Prospects*. Springer Netherlands, 303–315.
- Spitzer L, Benes J, Dandova J, et al. 2009.** The Large Blue butterfly, *Phengaris* [Maculinea] *arion*, as a conservation umbrella on a landscape scale: The case of the Czech Carpathians. *Ecological Indicators* **9**: 1056–1063.
- Stankiewicz A & Sielezniew M. 2002.** Host specificity of *Maculinea teleius* Bgstr. and *M. nausithous* Bgstr. (Lepidoptera: Lycaemidae). The new insight. *Annales Zoologici* **52**: 403–408.
- Stearns SC. 1976.** Life-History Tactics: A Review of the Ideas. *The Quarterly Review of Biology* **51**: 3–47.
- Stearns SC & Hoekstra RF. 2000.** *Evolution: An Introduction*. Oxford University Press.
- Steiner FM, Sielezniew M, Schlick-Steiner BC, et al. 2003.** Host specificity revisited: New data on *Myrmica* host ants of the lycaenid butterfly *Maculinea rebeli*. *Journal of Insect Conservation* **7**: 1–6.
- Stewart JR, Lister AM, Barnes I, et al. 2010.** Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **277**: 661–671.
- Stinchcombe JR & Hoekstra HE. 2007.** Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**: 158–170.
- van Swaay CM, Cuttelod A, Collins S, et al. 2010.** European red list of Butterflies. <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/1939351>.
- van Swaay C & Warren M. 1999.** *Red Data Book of European Butterflies (Rhopalocera)*. Council of Europe.
- van Swaay CM, Warren S & Löss G. 2006.** Biotope use and trends of European butterflies. *Journal of Insect Conservation* **10**: 189–209.
- Szulkin M & Sheldon BC. 2008.** Dispersal as a means of inbreeding avoidance in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **275**: 703–711.
- Taberlet P. 1996.** The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford University Press, USA, 125–142.
- Taberlet P & Bouvet J. 1994.** Mitochondrial DNA Polymorphism, Phylogeography, and Conservation Genetics of the Brown Bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **255**: 195–200.
- Taberlet, Fumagalli, Wust-Saucy, et al. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453–464.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725–2729.
- Tartally A & Csősz S. 2004.** Adatok a *Maculinea boglárkalepkék* (Lepidoptera: Lycaenidae) Kárpát-medencei hangyagazdairól. *Természetvédelmi közlemények* **11**: 309–317.
- Tartally A, Kelager A, Furst MA, et al. 2016.** Host plant use drives genetic differentiation in syntopic populations of *Maculinea alcon*. *PeerJ* **4**: e1865.
- Tartally A, Nash DR, Lengyel S, et al. 2008.** Patterns of host ant use by sympatric populations of *Maculinea alcon* and *M. 'rebeli'* in the Carpathian Basin. *Insectes Sociaux* **55**: 370–381.

- Tartally A & Varga Z. 2008.** Host ant use of *Maculinea teleius* in the Carpathian-Basin (Lepidoptera: Lycaenidae). *ACTA ZOOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE* **54**: 257–268.
- The 1000 Genomes Project Consortium. 2012.** An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**: 56–65.
- The Bovine HapMap Consortium. 2009.** Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. *Science* **324**: 528–532.
- Thomas JA. 1984.** The behaviour and habitat requirements of *Maculinea nausithous* (the dusky large blue butterfly) and *M. teleius* (the scarce large blue) in France. *Biological Conservation* **28**: 325–347.
- Thomas JA, Bourn N a. D, Clarke RT, et al. 2001.** The quality and isolation of habitat patches both determine where butterflies persist in fragmented landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **268**: 1791–1796.
- Thomas JA & Elmes GW. 1998.** Higher productivity at the cost of increased host-specificity when *Maculinea* butterfly larvae exploit ant colonies through trophallaxis rather than by predation. *Ecological Entomology* **23**: 457–464.
- Thomas JA & Elmes GW. 2001.** Food–plant niche selection rather than the presence of ant nests explains oviposition patterns in the myrmecophilous butterfly genus *Maculinea*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **268**: 471–477.
- Thomas JA, Elmes GW, Wardlaw JC, et al. 1989.** Host specificity among *Maculinea* butterflies in *Myrmica* ant nests. *Oecologia* **79**: 452–457.
- Thomas JA & Wardlaw JC. 1992.** The capacity of a *Myrmica* ant nest to support a predacious species of *Maculinea* butterfly. *Oecologia* **91**: 101–109.
- Thorpe JP & Solé-Cava AM. 1994.** The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta* **23**: 3–18.
- Toews DPL & Brelsford A. 2012.** The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* **21**: 3907–3930.
- Tolman T & Lewington R. 1997.** *Collins Field Guide - Butterflies of Britain and Europe*. London u.a.: Collins.
- Tshikolovets VV. 2003.** *Butterflies of Eastern Europe, Urals and Caucasus. An Illustrated Guide*. Kiev: Tshikolovets.
- Turner IM. 1996.** Species Loss in Fragments of Tropical Rain Forest: A Review of the Evidence. *Journal of Applied Ecology* **33**: 200–209.
- Tuzov VK. 1997.** *Guide to the butterflies of Russia and adjacent territories*. Pensoft.
- Ugelvig LV, Vila R, Pierce NE, et al. 2011.** A phylogenetic revision of the *Glaucopsyche* section (Lepidoptera: Lycaenidae), with special focus on the Phengaris–*Maculinea* clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **61**: 237–243.
- Ursenbacher S, Carlsson M, Helfer V, et al. 2006.** Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* **15**: 3425–3437.
- Valdiosera CE, García N, Anderung C, et al. 2007.** Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology* **16**: 5140–5148.

- Vályi Nagy M & Csósz S. 2007.** Host ant specificity of the Large Blue butterfly, *Maculinea alcon* (Denis & Schiffermüller, 1775), in the Carpathian Basin (Hymenoptera: Formicidae; Lepidoptera: Lycaenidae). *Myrmecological News* **10**: 124.
- Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield PM, et al. 2004a.** Phylogeography of *Aglaia urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 630–646.
- Vandewoestijne S, Martin T, Liegeois S, et al. 2004b.** Dispersal, landscape occupancy and population structure in the butterfly *Melanargia galathea*. *Basic and Applied Ecology* **5**: 581–591.
- Varga Z. 1961.** Zoogeographical survey of the Macrolepidoptera-fauna of the N-Hungarian Karst area (in Hung. with German summary). *Folia entomologica hungarica* **14**: 345–386.
- Varga Z. 1968.** Bemerkungen und Ergänzungen zur taxonomischen Beurteilung und Ökologie der im Karpatenbecken vorkommenden Populationen von *Aricia artaxerxes* Fabr. (= *A. allous* G.-Hb., *A. montensis* Vrtý., Lep. Lycaenidae). *Acta Biologica Debrecina* **6**: 171–185.
- Varga Z. 1995.** Biogeographical aspects of bio-indication and habitat conservation in European butterflies and moths. In: *Proceedings of the 9th Congress of EIS, Helsinki*. Helsinki, 21–29.
- Varga Z & Sántha G. 1973.** Verbreitung und taxonomische Gliederung der Art: *Euphydryas maturna* (Linnaeus, Lep.: Nymphalidae) in SO-Europa. *Acta Biologica Debrecina* **X–XI**: 213–231.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, et al. 2002.** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* **34**: 275–305.
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, et al. 1999.** Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* **8**: 2089–2103.
- Vila M, Lundhagen AC, Thuman KA, et al. 2006.** A new conservation unit in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae) as revealed by nuclear and mitochondrial markers. *Annales Zoologici Fennici* **43**: 72–79.
- Vrabec V, Čížek, O. & Beneš, J. 2002.** *Euphydryas maturna*. In: *Butterflies of Czech Republic: Distribution and Conservation*. Prague: SOM, 462–457.
- Vrabec V & Jindra Z. 1998.** The caterpillars of the rare butterfly *Euphydryas maturna* (Lepidoptera: Nymphalidae) as food for the predatory bug *Picromerus bidens* (Heteroptera: Pentatomidae). *Entomological Problems* **29**: 87–90.
- Wahlberg N. 2000.** Comparative descriptions of the immature stages and ecology of five Finnish melitaeine butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae). *Entomologica Fennica* **11**: 167–174.
- Wahlberg N. 1998.** The life history and ecology of *Euphydryas maturna* (Nymphalidae: Melitaeini) in Finland (PDF Download Available). *Nota lepidopterologica* **21**: 154–169.
- Wahlberg N. 2000.** Comparative descriptions of the immature stages and ecology of five Finnish melitaeine butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae). *Entomologica Fennica* **11**: 167–174.
- Wahlberg N. 2001.** On the status of the scarce fritillary *Euphydryas maturna* (Lepidoptera: Nymphalidae) in Finland. *Entomologica Fennica* **12**: 244–250.
- Wahlberg N & Saccheri I. 2007.** The effects of Pleistocene glaciations on the Phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* **104**: 675–684.
- Wahlberg N & Wheat CW. 2008.** Genomic Outposts Serve the Phylogenomic Pioneers: Designing Novel Nuclear Markers for Genomic DNA Extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology* **57**: 231–242.

- Waldick RC, Kraus S, Brown M, et al. 2002.** Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale. *Molecular Ecology* **11**: 2241–2249.
- Wallace BP, DiMatteo AD, Hurley BJ, et al. 2010.** Regional Management Units for Marine Turtles: A Novel Framework for Prioritizing Conservation and Research across Multiple Scales. *PLOS ONE* **5**: e15465.
- Waples RS. 1991.** Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of... *Marine Fisheries Review* **53**: 11.
- Warren MS. 1994.** The UK status and suspected metapopulation structure of a threatened European butterfly, the marsh fritillary *Eurodryas aurinia*. *Biological Conservation* **67**: 239–249.
- Warren MS & Key RS. 1991.** Woodlands: past, present and potential for insects. In: *The conservation of insects and their habitats*. London: Academic Press, 155–212.
- Watt WB. 1977.** Adaptation at Specific Loci. I. Natural Selection on Phosphoglucose Isomerase of *Colias* Butterflies: Biochemical and Population Aspects. *Genetics* **87**: 177–194.
- Watt WB. 1983.** Adaptation at Specific Loci. II. Demographic and Biochemical Elements in the Maintenance of the *Colias* Pgi Polymorphism. *Genetics* **103**: 691–724.
- Weaver TD, Roseman CC & Stringer CB. 2007.** Were neandertal and modern human cranial differences produced by natural selection or genetic drift? *Journal of Human Evolution* **53**: 135–145.
- Weidemann HJ. 1985.** Zum Einfluß veränderter Bewirtschaftungsweisen auf bestandsbedrohte Tagfalterarten. Maivogel (*Euphydryas maturna*) und Storchschnabelbläuling (*Eumedonia eumedon*) in Franken. *Berichte der naturforschenden Gesellschaft Bamberg*: 99–130.
- Weir BS. 1996.** *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sunderland: Sinauer Assoc. Inc.
- Werren JH, Baldo L & Clark ME. 2008.** Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 741–751.
- Werren JH & Windsor DM. 2000.** Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? | Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **267**: 1277–1285.
- Werren JH, Windsor D & Guo L. 1995.** Distribution of Wolbachia among Neotropical Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **262**: 197–204.
- White MJD. 1973.** *The Chromosomes*. Chapman and Hall, distributed by Halsted Press, New York.
- Whitehouse AM & Harley EH. 2001.** Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular Ecology* **10**: 2139–2149.
- Whitman D & Ananthakrishnan TN. 2009.** *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences*. Science Publishers.
- Wilding CS, Butlin RK & Grahame J. 2001.** Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 611–619.
- Witek M, Nowicki P, Śliwińska EB, et al. 2010.** Local host ant specificity of *Phengaris* (Maculeina) teleius butterfly, an obligatory social parasite of *Myrmica* ants. *Ecological Entomology* **35**: 557–564.
- Wright S. 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**: 97–159.

Wright S. 1978. *Variability within and among natural populations*. Chicago: The University of Chicago Press.

Wright ES. 2016. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*.

Wynhoff I. 1998. REVIEW: The recent distribution of the European Maculinea species. *Journal of Insect Conservation* **2**: 15–27.

Zimmermann M, Wahlberg N & Descimon H. 2000. Phylogeny of Euphydryas Checkerspot Butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) Based on Mitochondrial DNA Sequence Data. *Annals of the Entomological Society of America* **93**: 347–355.

Függelék

M.1. függelék: Az elektroforetikus vizsgálatokban alkalmazott puffer rendszerek és futási körülmények.

Puffer rendszerek	1	2a	2b	3	4a	4b
Gélpuffer	0.3 M Tris pH=8.9	0.02 M Tris 0.02M Hisztidin 0.0005 M EDTA pH=6.2	0.06 M Tris 0.06M Hisztidin 0.0015 M EDTA pH=6.2	0.0675 M Tris 0.0225 M Citromsav pH=7.1	0.2 M Tris 0.26 M Bórsav 0.0064 M EDTA pH=8.0	0.05 M Tris 0.095 M Bórsav 0.008 M EDTA pH=8.0
Elektrodpuffer	0.3 M Tris 0.38 M Glicin pH=8.3	0.14 M Tris 0.05 M Citromsav pH=7.0	0.14 M Tris 0.05 M Citromsav pH=7.0	0.09 M Tris 0.03 M Citromsav pH=7.1	0.05 M Tris 0.065 M Bórsav 0.0016 M EDTA pH=8.0	0.05 M Tris 0.065 M Bórsav 0.0016 M EDTA pH=8.0
Futási körülmények	240 V 90 mA 2.5 h	120 V 60 mA 6 h	120 V 60 mA 7 h	170 V 110 mA 5 h	200 V 90 mA 3.5 h	200 V 90 mA 3.5 h

M.2. függelék: Az enzimek vizsgálata során alkalmazott elektorforetikus rendszerek és festési eljárások.

Enzimek	Elfo. rendszer	Festési eljárás						
		0.5% agaróz	Pufferek	Ionok	Szubstrátok	Enzimek	Kofaktorok	Festékek
Acon	4a	+	0.1 M Tris pH=8.0	10 mM MgCl ₂	30 mM cisz-akotinsav	0.1 µg/ml IDH	1.3 mM NADP	0.5 mM MTT 0.1 mM PMS
Acph	4b	+	7 mM ecetsav pH=5.0	35 mM MgCl ₂	6 mM α-naftil- foszfát			4 mM Fast Blue B
Adh	1	+	0.15 M Tris pH=8.5 5 mM EDTA		6% ethanol 6% i-propanol		0.6 mM NAD	0.3 mM NBT 0.05 mM PMS
Aox	1	-	0.1.M Tris pH=8.5 2 mM EDTA	14 mM KCl	190 mM benzaldehid			0.15 mM NBT 0.02 mM PMS
Est	3	+	0.075 M Tris pH=7.0		4 mM α-naftil-acetát 4 mM β-naftil-acetát			3 mM Fast Blue RR
Gdh	1	+	0.15 M Tris pH=8.0		62 mM L-glutaminsav		0.6 mM NAD	0.4 mM NBT 0.04 mM PMS
Got	4a, 4b	+	0.15 M Tris pH=8.0		72 mM DL-aszparaginsav 12 mM α-ketoglutársav		0.7 mM piridoxál-5- foszfát	3 mM Fast Blue BB
G6pdh	2b, 3	+	0.18 M Tris pH=8.0 2 mM EDTA	10 mM MgCl ₂	6 mM D-glükóz-6-foszfát		0.25 mM NADP	0.25 mM NBT 0.05 mM PMS
Gpdh	4a	+	0.12 M Tris pH=7.0	8mM KCN	10 mM DL-α- glicerofoszfát		0.7 mM NAD	0.3 mM NBT 0.03 mM PMS

Folytatás

Enzimek	Elfo. rendszer	Festési eljárás						
		0.5% agaróz	Pufferek	Ionok	Szubstrátok	Enzimek	Kofaktorok	Festékek
Hk	1	+	0.05 M Tris pH=8.0 3 mM EDTA	16 mM MgCl ₂	22 mM D-glükóz 28 mM D-galaktóz	0.13 µg/ml G6PDH	3.6 mM ATP 0.9 mM NADP	0.6 mM NBT 0.16 mM PMS
Idh	2a, 2b, 3	+	0.15 M Tris pH=8.0	15 mM MgCl ₂	7 mM DL-izocitromsav		0.4 mM NADP	0.3 mM NBT 0.03 mM PMS
Lap	2a, 2b	+	0.15M NaOH 0.1 M Maleinsavanhidrid	32 Mm MnCl ₂	40mM L-leucin β- naftilamid			6 mM Black K Salt
Ldh	1, 3	+	0.3 M Tris pH=8.0		30 mM tejsav 0.05M Na ₂ CO ₃		0.6 mM NAD	0.3 mM NBT 0.1 mM PMS
Mdh	2a	+	0.17 M Tris pH=8.5 5 mM EDTA		31 mM DL_almasav		0.8 mM NAD	0.7 mM NBT 0.1 mM PMS
Me	3	+	0.17 M Tris pH=8.0	41 mM MgCl ₂	9 mM DL_almasav		0.4 mM NADP	0.4 mM NBT 0.08 mM PMS
6Pgdh	3	+	0.3 M Tris pH=8.0	15 mM MgCl ₂	13 mM 6-foszfoglukonát		0.4 mM NADP	0.3 mM NBT 0.03 mM PMS
Pgi	1	+	0.05 M Tris pH=8.0	16 mM MgCl ₂	4 mM D-fruktóz-6-foszfát	0.13 µg/ml G6PDH	0.8 mM NADP	0.4 mM NBT 0.04 mM PMS
Pgm-Sod	1	+	0.05 M Tris pH=8.0	16 mM MgCl ₂	33 mM α-D-glükóz-1- foszfát	0.1 µg/ml G6PDH	1.5 mM NADP	0.8 mM NBT 0.16 mM PMS

M.3. függelék: A különböző fajokban vizsgált enzimek. *Arícia artaxerxes*; *Euphydryas maturna*; *E. aurinia*; *Maculineaalcon*; *M. nausithous*; *M. teleius*; *Parnassius mnemosyne*.

Enzim	Lokusz	Testrész	<i>A.arx.</i>	<i>E.mat.</i>	<i>E.aur.</i>	<i>M.alc.</i>	<i>M.nau.</i>	<i>M.tel.</i>	<i>P.mne.</i>
Akonitáz	<i>Acon</i>	P	+	+	+	+	+	+	+
Savas foszfátáz	<i>AcphA</i>	P	+			+	+	+	
	<i>AcphB</i>	P	+						
Alkohol-dehidrogenáz	<i>Adh</i>	P	+						
Aldehyd-oxidáz	<i>Aox</i>	P	+	+	+	+	+	+	
Észteráz	<i>EstA</i>	P	+	+	+	+	+	+	+
	<i>EstB</i>	P		+	+				
Glutamát-dehidrogenáz	<i>Gdh</i>	P	+	+	+	+	+	+	
Glutamát-oxálacetát-transzamináz	<i>GotA</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
	<i>GotB</i>	T				+	+	+	
Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz	<i>G6pdh</i>	T	+			+	+	+	+
α -Glicerofoszfát-dehidrogenáz	<i>Gpdh</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
Hexokináz	<i>Hk</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
Izocitrát-dehidrogenáz	<i>IdhA</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
	<i>IdhB</i>	T					+		
Leucin-aminopeptidáz	<i>Lap</i>	P		+	+				+
Laktát-dehidrogenáz	<i>LdhA</i>	T	+	+					
	<i>LdhB</i>	T			+				
Malát-dehidrogenáz	<i>Mdh</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
Malik enzim	<i>Me</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
6-Foszfoglukonát-dehidrogenáz	<i>6Pgdh</i>	T		+	+				
Foszfo-glüko-izomeráz	<i>Pgi</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
Foszfo-glüko-mutáz	<i>Pgm</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
Szuperoxid-dizmutáz	<i>SodA</i>	T	+	+	+	+	+	+	+
	<i>SodB</i>	T	+	+	+				+

E.1.1.1. függelék: Az E.1.1.1. esettanulmányban elemzett *Euphydryas maturna* és *Parnassius mnemosyne* populációk gyűjtőhelyei és a minták mérete (N).

Faj	Régió	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N
<i>E. maturna</i>	NYÍR	Fényi-erdő: Ömböly	FeO	22.2410	47.7145	40
		Fényi-erdő: tisztás	FeI	22.2685	47.7453	21
		Fényi-erdő: határ	FeII	22.2859	47.7303	40
		Fényi-erdő: erdőszél	FeIII	22.2754	47.7357	29
		Guti-erdő A	GutA	22.0025	47.6369	43
		Guti-erdő B	GutB	21.9784	47.6522	47
		Bátorliget	Bat	22.2726	47.7682	42
	BER	Fülesd	Ful	22.6492	48.0363	15
		Lónyai-erdő	Lon	22.3430	48.2676	29
		Fehérgyarmat	Feh	22.5105	48.0305	14
		Magosliget	Mag	22.8586	48.0682	20
	KÖR	Sebesfoki-erdő	Seb	21.2338	46.7551	23
		Dobozi-erdő	Dob	21.2358	46.7463	25
		Gyula Városerdő	GyV	21.3233	46.6938	46
		Gyula Köriserdő	GyK	21.3397	46.6826	24
	ÉMO	Noszvaj	Nov	20.5156	47.8976	23
		Sajólad	Saj	20.9166	48.0382	43
		Girincs	Gir	20.9722	47.9653	33
		Feldebrő	Feld	20.2091	47.8024	30
		Kisgyőr	Kgy	20.6706	48.0299	16
<i>P. mnemosyne</i>	ÉKH	Nagy-Milic	ZNm	21.4532	48.5747	19
		Nagyoldal	No	20.5756	48.5086	23
		Bükk1	Bk1	20.5665	48.0412	18
		Bükk2	Bk2	20.6722	48.0339	13
		Bükk3	Bk3	20.6698	48.0286	25
	DKH	Vasverem	Vas	19.0092	47.9579	20
		Pilistető	Pil	18.8555	47.7046	47
		Nagyszénás	Kov	18.8654	47.5897	46
		Meleghegy	Mel	18.5952	47.2782	21
		Márkó	Mar	17.7977	47.1650	18
		Közép-Hajag	Haj	17.7571	47.1646	24
		Hárskút	Har	17.8216	47.1814	18
		Várhegy	Var	17.2866	46.8064	19
		Bátaapáti	Bat	18.6089	46.1975	22
	KÖR	Sebesfoki-erdő	Seb	21.2338	46.7551	36
		Dobozi-erdő	Dob	21.2358	46.7463	29
		Gyula Városerdő	Gve	21.3233	46.6938	39
		Gyula Köriserdő	Gke	21.3397	46.6826	21

E.1.1.2. függelék: Az E.1.1.1. esettanulmányban elemzett *E. matura* és *P. mnemosyne* populációk variabilitásának a mutatói. N: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=13); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; %Fix: a fixálódott allélok aránya; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; NYÍR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; ÉMO: Észak-Magyarország

Faj	Régió	Pop	N	n_A	Ar	Ho	%Fix	P_{95}
<i>P. mnemosyne</i>	ÉKH	ZNm	19.0	2.29	2.04	0.219	0.135	0.500
		No	23.0	2.21	1.93	0.226	0.158	0.500
		Bk1	18.0	1.86	1.74	0.308	0.127	0.429
		Bk2	13.0	2.00	1.97	0.286	0.132	0.429
		Bk3	25.0	2.21	1.92	0.267	0.123	0.429
	DKH	Vas	20.0	2.43	2.23	0.206	0.182	0.500
		Pil	46.9	2.71	2.30	0.184	0.177	0.500
		Kov	46.0	2.93	2.17	0.146	0.180	0.571
		Mel	20.8	2.21	1.98	0.226	0.167	0.500
		Mar	18.0	2.79	2.46	0.077	0.238	0.786
		Haj	24.0	2.50	2.27	0.143	0.176	0.643
		Har	17.8	2.71	2.41	0.132	0.216	0.643
		Var	18.9	2.43	2.27	0.206	0.206	0.500
		Bat	21.7	2.14	1.92	0.233	0.184	0.500
	KÖR	Seb	36.0	2.29	2.08	0.121	0.242	0.714
		Dob	29.0	2.43	2.15	0.147	0.232	0.643
		Gve	39.0	2.79	2.28	0.051	0.205	0.857
		Gke	21.0	2.50	2.27	0.114	0.190	0.714
<i>E. matura</i>	NYÍR	FeO	39.5	1.94	1.57	0.114	0.171	0.667
		FeI	20.9	1.72	1.45	0.086	0.290	0.500
		FeII	39.9	1.94	1.53	0.104	0.121	0.667
		FeIII	28.9	2.11	1.64	0.122	0.132	0.722
		GutA	42.9	1.83	1.49	0.101	0.212	0.611
		GutB	46.9	1.89	1.50	0.123	0.206	0.611
		Bat	41.8	1.78	1.51	0.132	0.281	0.500
	BER	Ful	15.0	1.72	1.55	0.133	0.323	0.444
		Lon	28.8	1.94	1.60	0.144	0.200	0.611
		Feh	14.0	1.72	1.54	0.115	0.387	0.333
		Mag	19.3	1.56	1.40	0.091	0.286	0.556
	KÖR	Seb	22.6	1.94	1.57	0.131	0.200	0.611
		Dob	25.0	1.78	1.46	0.118	0.250	0.556
		GyV	45.9	1.78	1.40	0.099	0.281	0.500
		GyK	24.0	1.56	1.43	0.109	0.429	0.333
	ÉMO	Nov	23.0	1.61	1.44	0.089	0.345	0.444
		Saj	43.0	1.67	1.43	0.102	0.333	0.444
		Gir	32.9	1.67	1.39	0.097	0.300	0.500
		Feld	29.9	1.67	1.42	0.104	0.300	0.500
		Kgy	15.9	1.89	1.69	0.164	0.235	0.556

E.1.1.3. függelék: Az E.1.1.2. esettanulmányban elemzett *Aricia artaxerxes* és *Maculinea alcon* cruciata ökotípus populációk gyűjtőhelyei és a minták mérete (N). GTK: Gömör-Tornai-karszt ; BÜKK: Bükk-hg.

Faj	Régió	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N
<i>Aricia</i>	GTK	Tohonya-völgy	Toh	20.5501	48.4879	46
		Szőlőhegy	Szh	20.5787	48.4865	60
	BÜKK	Zsidó-rét	Zsr	20.4626	48.0682	18
		Kecskeláb-rét	Klr	20.5306	48.0802	19
		Nagymező	Nme	20.4955	48.0741	20
<i>Maculinea</i>	GTK	Tohonya-völgy	Toh	20.5501	48.4879	38
		Kurisztán	Kur	20.5740	48.4924	50
	BÜKK	Bükkszentkereszt	Bszk	20.6342	48.0687	40
		Nagymező	Nme	20.4955	48.0741	47

E.1.1.4. függelék: Az E.1.1.3. esettanulmányban elemzett *Aricia artaxerxes* populációk gyűjtőhelyei és a minták mérete (N). GTK: Gömör-Tornai-karszt ; BÜKK: Bükk-hg.

Régió	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N	
					2002	2005
GTK	Hačava	Hac	20.8198	48.6660	29	36
	Haragistya	Hht	20.5361	48.5276	50	41
	Dénes-töbör	Dtb	20.5640	48.5267	47	39
	Szelcepuszta	Szp	20.5832	48.5228	26	32
	Szőlőhegy	Szh	20.5787	48.4865	60	26
	Zabanyik	Zab	20.6257	48.4575	33	15
BÜKK	Nagymező	Nme	20.4955	48.0741	-	56
	Zsidórét	Zsr	20.4626	48.0682	18	-
	Fekete-sár	Fes	20.4460	48.0743	-	12
	Kecskeláb-rét	Klr	20.5306	48.0802	19	-

E.1.1.5. függelék: Az E.1.1.3. esettanulmányban elemzett *Aricia artaxerxes* populációk variabilitásának a mutatói. N: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; n_{AN} : az allélok mintaszámra korrigált száma; $\Delta 1$: az allélok vizsgált és mintaszámra korrigált értékének a különbsége ($\Delta 1 = n_A - n_{AN}$); Ar: allélgazdagság ($N=11$); $\Delta 2$: az allélok vizsgált számának és az allélgazdagságnak a különbsége ($\Delta 2 = n_A - Ar$); He: várható heterozigóta gyakoriság.

Régió	Év	Pop	N	n_A	n_{AN}	$\Delta 1$	Ar	$\Delta 2$	He
Karszt	2002	2Hac	28.2	3.16	3.14	0.018	2.67	0.491	0.336
		2Hht	49.0	3.37	3.38	-0.012	2.61	0.761	0.326
		2Dtb	46.2	3.37	3.35	0.014	2.48	0.889	0.300
		2Szp	25.4	2.84	3.09	-0.252	2.51	0.336	0.312
		2Szh	58.4	3.53	3.46	0.069	2.58	0.941	0.328
		2Zab	32.2	3.00	3.20	-0.198	2.51	0.488	0.325
	2005	5Hac	35.8	3.53	3.24	0.283	2.88	0.643	0.342
		5HHt	40.4	3.42	3.30	0.124	2.63	0.794	0.327
		5Dtb	38.7	3.32	3.28	0.038	2.61	0.703	0.318
		5Szp	31.3	3.21	3.19	0.025	2.58	0.630	0.321
		5Szh	25.7	3.21	3.10	0.112	2.71	0.501	0.335
		5Zab	14.6	2.47	2.85	-0.379	2.38	0.096	0.312
Bükk	2002	2Zsr	17.7	2.42	2.94	-0.515	2.28	0.146	0.286
		2Klr	18.8	2.42	2.96	-0.541	2.21	0.215	0.277
	2005	5Nme	55.4	3.05	3.43	-0.382	2.41	0.640	0.296
		5Fes	11.9	2.47	2.76	-0.291	2.46	0.015	0.308

E.1.2.1. függelék: Az E.1.2. esettanulmányban vizsgált *Euphydryas maturna* fényi-erdei populációjának szubpopulációs mintái. A szubpopulációk földrajzi helye és a minták mérete.

Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	2005	2006	2007	2008
Fényi-erdő: Ömböly	FeO	22.2410	47.7145	40	56	59	18
Fényi-erdő: határ	FeB	22.2859	47.7303	40	44	24	20

E.1.2.2. függelék: Az E.1.2. esettanulmányban detektált családok genetikai összetétele az *E. maturna* határszél szubpopulációjában (FB). N AC: az adott allélkombinációt hordozó egyedek száma; N G: az adott allélkombinációt azonos gamétafázisban hordozó egyedek (családtagok) száma; G%: a családtagok aránya a kérdéses allélkombinációt hordozó egyedek között; m%: a családtagok aránya a mintában; Átl. m%: a családtagok átlagos aránya a mintában. Kövér betű: ritka allélok; szürkén satírozott allélok: szubpopuláció specifikus ritka allélok.

	2005				2006			2007		2008
	FB5-A3	FB5-A5	FB5-G2	FB5-G3	FB6-A3	FB6-G1	FB6-G6	FB7-A6	FB7-A7	FB8-A2
<i>Acon</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Aox</i>	4	3	3	2	3	3	3	4	3	2
<i>EstA</i>	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5
<i>EstB</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Hk</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lap</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>LdhA</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Mdh</i>	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3
<i>Me</i>	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1
<i>6Pgdh</i>	2	5	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Pgi</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Pgm</i>	3	3	3	3	4	3	3	3	4	4
<i>SodB</i>	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
N AC	5	5	7	6	9	6	9	6	12	3
N G	2	2	5	3	4	4	5	4	3	3
G %	0.4	0.4	0.714	0.5	0.444	0.667	0.556	0.667	0.25	1
m %	0.050	0.050	0.125	0.075	0.073	0.073	0.091	0.069	0.052	0.176
Átl..m%		0.075				0.079		0.060		0.176

E.1.2.3. függelék: Az E.1.2. esettanulmányban detektált családok genetikai összetétele az *E. matura* Önböly szubpopulációjában (FO). N AC: az adott allélkombinációt hordozó egyedek száma; N G: az adott allélkombinációt azonos gamétafázisban hordozó egyedek (családtagok) száma; G%: a családtagok aránya a kérdéses allélkombinációt hordozó egyedek között; m%: a családtagok aránya a mintában; Átl. m%: a családtagok átlagos aránya a mintában. Kövér betű: ritka allélok; szürkén satírozott allélok: szubpopuláció specifikus ritka allélok.

	2005	2006			2007		2008
	FO5-G1	FO6-A3	FO6-G1	FO6-G2	FO7-N	FO7-A1	FO8-G3
<i>Acon</i>	3	3	3	3	3	2	3
<i>Aox</i>	4	3	3	3	4	3	2
<i>EstA</i>	5	5	5	4	5	5	4
<i>EstB</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Hk</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lap</i>	3	2	3	3	3	3	3
<i>LdhA</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>Mdh</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>Me</i>	2	2	1	2	2	2	2
<i>6Pgdh</i>	5	2	2	2	2	2	2
<i>Pgi</i>	5	5	5	5	5	5	5
<i>Pgm</i>	3	3	4	4	4	4	4
<i>SodB</i>	3	3	3	2	3	3	3
N AC	3	9	7	4	4	3	4
N G	2	3	2	3	3	3	2
G %	0.667	0.333	0.286	0.75	0.75	1	0.5
m %	0.050	0.070	0.050	0.070	0.130	0.130	0.100
Átl. m %	0.050		0.078		0.130		0.100

E.2.1.1. függelék: Az E.2.1. esettanulmányban elemzett *M. alcon* (pneumonanthé ökotípus) és *M. teleius* populációk gyűjtőhelyei és a minták mérete (N). ZEM: Zemplén-hg.; KMO-TRY: Közép-Magyarország és Erdély; FÜL: a Fülesdi populáció; ÉMO: Észak-Magyarország; KKMO: Közép-Magyarország keleti régiója; NYMO: Nyugat-Magyarország.

Faj	F.reg.	G.reg	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N
<i>M. alcon</i>	Zemplén	ZEM	Drahos-rét	Dra	21.4223	48.5609	59
		ZEM	Gyertyánkút	Gyk	21.3641	48.4418	38
	Mátra	KMO-TYR	Gyilkos-rét	Gyr	19.9959	47.8093	74
		KMO-TYR	Tugár-rét	Tug	19.8422	47.9065	20
		KMO-TYR	Jáger-rét	Jag	19.8636	47.8944	20
	Kiskunság	KMO-TYR	Kunpeszér	Kun	19.2794	47.0645	45
	Bereg	FÜL	Fülesd	Fül	22.6433	48.0330	77
		KMO-TYR	Hetefejércse	Het	22.4986	48.1324	19
	Erdély	KMO-TYR	Hargita	Har	25.6266	46.3403	13
<i>M. teleius</i>	Zemplén	ÉMO	Drahos-rét	Dra	21.4223	48.5609	34
		ÉMO	Gyertyánkút	Gyk	21.3641	48.4418	65
		ÉMO	Kovácsvágás	Kag	21.5320	48.4638	29
		ÉMO	Felsőregmec	Freg	21.6160	48.4859	32
	Karszt	ÉMO	Aggtelek	Agk	20.5127	48.4493	85
	Cserehát	ÉMO	Barakonyi-völgy	Bav	20.8220	48.4530	92
		ÉMO	Rakaca-Meszes	Ram	20.8193	48.4409	77
	Bereg	ÉMO	Fülesd	Fül	22.6433	48.0330	73
	Közép-Mo.	KKMO	Csévharaszt	Csh	19.4224	47.2912	32
		KKMO	Kunpeszér	Kun	19.2794	47.0645	37
	Nyugat-Mo.	NYMO	Nagybajcs	Nb	17.6940	47.7632	43
		NYMO	Szaknyér	Szn	16.5280	46.8606	18
		NYMO	Nagygörbő	Ng	17.1852	46.9318	22
		NYMO	Magyarszombatfa	Mfa	16.3335	46.7579	18
		NYMO	Kétvölgy	Kv	16.2267	46.8793	64
		NYMO	Szomoróc	Szo	16.3193	46.7819	50

E.2.1.2. függelék: Az E.2.1. esettanulmányban elemzett *M. alcon* (pneumonanthé ökotípus) és *M. teleius* populációk variabilitásának a mutatói. N: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (*M. alc.*: N=15; *M. tel.*: N=9); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ZEM: Zemplén-hg.; KMO-TRY: Közép-Magyarország és Erdély; FÜL: a Fülesdi populáció; ÉMO: Észak-Magyarország; KKMO: Közép-Magyarország keleti régiója; NYMO: Nyugat-Magyarország.

	Régió	Pop.	N	n_A	Ar	Ho	P_{95}
<i>M. alcon</i>	ZEM	aDra	57.9	1.69	1.51	0.119	0.500
		aGyk	37.4	1.63	1.48	0.126	0.438
	KMO-TRY	aGyr	73.5	1.50	1.39	0.074	0.375
		aTug	19.9	1.50	1.44	0.135	0.375
		aJag	19.9	1.44	1.43	0.115	0.375
		aKun	43.8	1.56	1.38	0.078	0.375
		aHet	18.6	1.31	1.31	0.060	0.313
		aHar	27.6	1.56	1.47	0.076	0.375
	FÜL	aFul	74.9	1.44	1.51	0.087	0.313
<i>M. teleius</i>	ÉMO	tDra	33.6	1.63	1.39	0.060	0.563
		tGyk	64.0	1.63	1.45	0.062	0.500
		tKag	27.9	1.56	1.42	0.078	0.500
		tFreg	31.7	1.69	1.42	0.047	0.563
		tAgg	82.9	1.94	1.39	0.069	0.750
		tBav	88.6	2.00	1.62	0.086	0.750
		tRam	75.4	2.00	1.56	0.072	0.688
		tKun	35.8	1.75	1.53	0.079	0.500
		tNb	41.3	1.63	1.44	0.080	0.563
	KKMO	tFul	71.2	1.75	1.57	0.115	0.688
		tCsh	31.6	1.75	1.49	0.072	0.688
	NYMO	tSzn	17.2	1.88	1.72	0.153	0.625
		tNg	21.2	1.69	1.60	0.107	0.563
		tMfa	17.5	1.69	1.57	0.085	0.438
		tKv	61.9	2.00	1.65	0.112	0.750
		tKsz	47.8	2.06	1.61	0.111	0.750

E.2.1.3. függelék: A Bayes-féle klaszteranalízisek összesített eredménye az E.2.1. esettanulmányban elemzett *M. alcon* (pneumonanthe ökotípus) és *M. teleius* populációk esetében. K: klaszterek száma; Ism.: ismétlések száma az adott K érték mellett; Átl. L (K): átlagos log likelihood értékek az adott K esetében; SD L (K): a log likelihood értékek szórása adott K esetén; Delta K: $(|L''(K)|) / Sd(L(K))$. A kövér betűk az elfogadott K értékeket jelölik.

	K	Ism.	Átl. L (K)	SD L (K)	Delta K
<i>M. alcon</i>	1	3	-2739.3	0.1	-
	2	10	-2601.0	1.5	24.00
	3	10	-2499.4	4.1	20.96
	4	10	-2484.0	8.2	7.04
	5	10	-2525.9	22.7	1.99
	6	10	-2522.7	18.7	0.62
	7	10	-2531.1	15.7	2.70
	8	10	-2581.9	35.2	0.20
	9	10	-2639.9	42.5	-
<i>M. teleius</i>	1	5	-5308.8	0.1	-
	2	10	-5261.4	29.8	0.41
	3	13	-5201.7	85.3	0.73
	4	10	-5080.2	15.6	3.45
	5	10	-5012.3	26.5	5.37
	6	10	-5086.7	23.4	3.27
	7	10	-5084.5	19.4	5.16
	8	10	-5182.5	115.0	0.93
	9	10	-5387.5	115.3	1.99
	10	10	-5362.9	137.6	1.08
	11	10	-5487.6	103.2	1.32
	12	10	-5476.0	115.8	1.56
	13	10	-5645.6	99.3	0.29
	14	10	-5786.1	183.2	0.13
	15	8	-5950.8	131.4	0.14
	16	9	-6096.7	363.2	-

E.3.1.1. függelék: Az E.3.1. esettanulmányban elemzett *Parnassius mnemosyne* populációk gyűjtőhelyei. N_{ENZ}: az enzimpolimorfizmus mintáinak mérete; N_{COI}: a COI szekvenciák elérhetőségének száma a GenBank-ban. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; BSZK: Szatmár-Beregi-sík – Erdélyi Sziget-hegység – Keleti-Kárpátok.

Régió	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N _{ENZ}	N _{COI}
ÉKH	Nagy-Milic	ZNm	21.4532	48.5747	19	KU246402
	Nagyoldal	No	20.5756	48.5086	23	KU246394
	Bükk1	Bk1	20.5665	48.0412	18	KU246386
	Bükk2	Bk2	20.6722	48.0339	13	-
	Bükk3	Bk3	20.6698	48.0286	25	KU246387
DKH	Vasverem	Vas	19.0092	47.9579	20	KU246401
	Pilistető	Pil	18.8555	47.7046	47	KU246395
	Nagyszénás	Kov	18.8654	47.5897	46	KU246390
	Meleghegy	Mel	18.5952	47.2782	21	KU246393
	Márkó	Mar	17.7977	47.1650	18	KU246392
	Középhajag	Haj	17.7571	47.1646	24	KU246388
	Hárskút	Har	17.8216	47.1814	18	KU246389
	Várhegy	Var	17.2866	46.8064	19	KU246400
	Bátaapáti	Bat	18.6089	46.1975	22	KU246383
KÖR	Sebesfoki-erdő	Seb	21.2338	46.7551	36	KU246397, KU246398
	Dobozi-erdő	Dob	21.2358	46.7463	29	
	Gyula Városerdő	Gve	21.3233	46.6938	39	KU246385
	Gyula Köriserdő	Gke	21.3397	46.6826	21	KU246384
BSZK	Magosliget	Mag	22.8586	48.0682	11	KU246391
	Torockó	Tor	23.5333	46.4364	21	KU246399
	Száldobos	Sal	25.5931	46.1600	11	KU246396
	Szováta	Szo	25.0943	46.5934	24	

E.3.1.2. függelék: Az E.3.1. esettanulmányban elemzett *Parnassius mnemosyne* populációk variabilitásának mutatói. N: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=11); %Fix: a fixálódott allélok aránya; Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság. ÉKH: Északi-középhegység; DKH: Dunántúli-középhegység; KÖR: Körösök vidéke; BSZK: Szatmár-Beregi-sík – Erdélyi Sziget-hegység – Keleti-Kárpátok.

Régió	Pop.	N	n_A	Ar	%Fix	Ho
ÉKH	ZNm	19.0	2.29	2.04	0.219	0.135
	No	23.0	2.21	1.93	0.226	0.158
	Bk1	18.0	1.86	1.74	0.308	0.127
	Bk2	13.0	2.00	1.97	0.286	0.132
	Bk3	25.0	2.21	1.92	0.267	0.123
DKH	Vas	20.0	2.43	2.23	0.206	0.182
	Pil	46.9	2.71	2.30	0.184	0.177
	Kov	46.0	2.93	2.17	0.146	0.180
	Mel	20.8	2.21	1.98	0.226	0.167
	Mar	18.0	2.79	2.46	0.077	0.238
	Haj	24.0	2.50	2.27	0.143	0.176
	Har	17.8	2.71	2.41	0.132	0.216
	Var	18.9	2.43	2.27	0.206	0.206
	Bat	21.7	2.14	1.92	0.233	0.184
KÖR	Seb	36.0	2.29	2.08	0.121	0.242
	Dob	29.0	2.43	2.15	0.147	0.232
	Gve	39.0	2.79	2.28	0.051	0.205
	Gke	21.0	2.50	2.27	0.114	0.190
BSZK	Mag	11.0	2.07	2.07	0.241	0.188
	Tor	21.0	2.71	2.49	0.105	0.214
	Sal	11.0	2.29	2.29	0.125	0.208
	Szo	23.9	3.43	2.86	0.083	0.262

E.3.1.3. függelék: A Bayes-féle klaszteranalízisek összesített eredménye az E.3.1. esettanulmányban elemzett *Parnassius mnemosyne* populációk esetében. K: klaszterek száma; Ism.: ismétlések száma az adott K érték mellett; Átl. L (K): átlagos log likelihood értékek az adott K esetében; SD L (K): a log likelihood értékek szórása adott K esetén; Delta K: $(L''(K)) / Sd(L(K))$. A kövér betűk az elfogadott K értékeket jelölik.

K	Ism.	Átl. L (K)	SD L (K)	Delta K
1	5	-8859.0	0.04	NA
2	5	-8028.0	0.45	1170.69
3	5	-7723.2	0.95	141.86
4	5	-7553.5	14.13	1.24
5	5	-7366.4	2.21	44.29
6	5	-7277.1	4.61	10.35
7	5	-7235.5	4.42	1.71
8	5	-7186.3	14.42	0.49
9	5	-7130.1	7.20	5.57
10	5	-7114.0	6.07	5.06
11	5	-7067.1	3.79	6.88
12	5	-7046.4	4.95	9.88
13	5	-7074.5	116.71	0.11
14	5	-7114.9	171.21	0.61
15	5	-7050.8	11.54	7.87
16	5	-7077.5	23.04	0.08
17	5	-7102.3	33.59	0.04
18	5	-7125.7	13.29	5.33
19	5	-7219.8	56.31	0.46
20	5	-7340.0	132.52	NA

E.3.2.1. függelék: Az E.3.2. esettanulmányban elemzett *Euphydryas aurinia* populációk gyűjtőhelyei. N_{enz} : az enzimpolimorfizmus mintáinak mérete; N_{mor} : a morfológiai elemzésekben vizsgált hímek száma; N_{COI} : mtDNS elemzés mintaszáma. SLOR: a szlovén és az őrségi populációk; KDT: Közép-Dunántúl; TRY: Erdély; VÉR: Vértes-hegység; KEH: Keszthelyi-hegység.

Régió	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N_{enz}	N_{mor}	N_{COI}
SLOR	Trnovsky Gozd	Trn	45.9462	13.9199	12	10	-
	Apátistvánfalva	Api	46.8995	16.2611	40	-	-
	Szomoróc	Szo	46.7819	16.3193	14	-	-
	Gödörháza	God	46.7460	16.3524	34	15	-
	Magyarszombatfa	Mfa	46.7579	16.3335	18	13	5
KDT	Középhajag	Khg	47.1646	17.7571	18	12	-
	Széki-erdő	Sze	47.1321	17.5059	17	15	5
	Nyírad	Nyí	46.9968	17.4193	-	-	6
	Látrány	Lar	46.7345	17.7263	17	15	-
TRY	Magyarsárd	Sar	46.9110	23.5935	39	30	5
VÉR	Szár	Sza	47.4782	18.5402	-	-	5
	Gánt	Ga	47.3894	18.4335	-	-	5
KEH	Zalaszántó	Za	46.8835	17.2561	-	-	5

E.3.2.2. függelék: Az E.3.2. esettanulmányban elemzett *Euphydryas aurinia* populációk variabilitásának mutatói. N : az átlagos mintaszám; Enzimek: az enzimpolimorfizmus mutatói; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar : allélgazdagság ($N=10$); Ho : tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján; %Fix: a fixálódott allélok aránya. Szárny: a szárnyjellegek átlagos variabilitása; $L\%$: A Leven-féle változók átlaga a jellegek átlagának %-ban kifejezve. SLOR: a szlovén és az őrségi populációk; KDT: Közép-Dunántúl; TRY: Erdély.

Régió	Pop	Enzimek						Szárny	
		N	n_A	Ar	Ho	P_{95}	%Fix	N	$L\%$
SLOR	Trn	11.8	1.78	1.75	0.099	0.444	0.313	10	0.046
	Api	38.9	2.83	2.19	0.148	0.667	0.118	-	-
	Szo	13.7	1.83	1.76	0.134	0.611	0.212	-	-
	God	32.8	2.28	1.92	0.100	0.611	0.171	15	0.037
	Mfa	17.3	1.94	1.80	0.129	0.556	0.229	13	0.039
CTRD	Khg	17.4	2.22	2.00	0.136	0.556	0.200	12	0.044
	Sek	16.7	2.44	1.80	0.190	0.611	0.159	15	0.036
	Lar	16.6	1.94	2.19	0.144	0.611	0.200	15	0.041
TRY	Sar	37.4	2.22	1.93	0.119	0.444	0.250	30	0.045

E.3.2.3. függelék: A Bayes-féle klaszteranalízisek összesített eredménye az E.3.2. esettanulmányban elemzett *Euphydryas aurinia* populációk esetében. K: klaszterek száma; Ism.: ismétlések száma az adott K érték mellett; Átl. L (K): átlagos log likelihood értékek az adott K esetében; SD L (K): a log likelihood értékek szórása adott K esetén; Delta K: $(L''(K)) / Sd(L(K))$. A kövér betűk az elfogadott K értékeket jelölik. Az

K	Ism.	Átl. L (K)	SD L (K)	Delta K
1	5	-3281.4	0.05	NA
2	5	-2962.0	0.41	482.47
3	5	-2838.5	0.68	72.10
4	5	-2764.1	2.05	24.11
5	5	-2739.1	3.08	1.78
6	5	-2708.6	4.49	3.33
7	5	-2693.0	4.73	11.55
8	5	-2732.1	109.90	0.80
9	5	-2683.1	29.12	NA

E.4.1.1. függelék: Az E.4.1. esettanulmányban elemzett *Maculinea* fajok populációinak gyűjtőhelyei. *M.alc.pn.*: *M.alcon* pneumonanthe ökotípus; *M.alc.cr.*: *M.alcon* cruciata ökotípus; *M.tel.*: *M.teleius*; *M.nau.*: *M.nausithous*; *M.ar.*: *M.arion*. N: mintaszám.

Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N				
				<i>M.alc.pn.</i>	<i>M.alc.cr.</i>	<i>M.tel.</i>	<i>M.nau.</i>	<i>M.ar.</i>
Drahos-rét	Dra	21.4223	48.5609	15		26		
Rakaca	Ram	20.8193	48.4409			35		
Barakonyi-völgy	Bav	20.8220	48.4530			33		
Aggtelek E	AgkE	20.5127	48.4493			27		
Aggtelek J	AgkJ	20.5127	48.4493			21		
Aggtelek K	AgkK	20.5127	48.4493			34		
Tohonya	Toh	20.5501	48.4879		38			
Kuriszlán	Kur	20.5740	48.4924		50			
Bükkszentkereszt	Bszk	20.6342	48.0687		20			
Bükk-fennsík	Bfe	20.4955	48.0741		10			
Sárhegy	Sah	19.9718	47.7959	54				
Fülesd	Fül	22.6433	48.0330	31		32		
Kaszonyi-hegy	Kh	22.4820	48.2445					19
Kunpeszér	Kun	19.2794	47.0645	25		21		
Vérteskozma	Vk	18.4282	47.4521					11
Nagybajcs	Nb	17.6940	47.7632			22		
Kétvölgy	Kv	16.2267	46.8793			23	20	
Apátistvánfalva	Api	16.2611	46.8995			10		
Orfalu	Orf	16.2695	46.8789				12	
Magyarországbatfa	Mfa	16.3335	46.7579			18	25	
Celje	Cel	15.2345	46.2600	23		20		
Nanos	Nan	14.0145	45.8163		16			
Sacele	Sac	25.7517	45.6189	21				
Gyilkos-tó	Gyt	25.7881	46.7891		21			14
Vargyas	Var	25.5565	46.0929		17			

E.4.1.2. függelék: A variabilitás mutatói az E.4.1. esettanulmányban elemzett *Maculinea* fajok populációiban. N: az átlagos mintaszám; n_A: az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=10); Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P₉₅: a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. *M.tel.*: *M. teleius*; *M.nau.*: *M. nausithous*; *M.alc.pn.*: *M. alcon* pneumonanthe ökotípus; *M.alc.cr.*: *M. alcon* cruciata ökotípus.

Faj	Pop	N	nA	Ar	Ho	P ₉₅
<i>M. tel.</i>	Fül	31.3	1.70	1.47	0.148	0.500
	Mfa	17.4	1.70	1.36	0.082	0.429
	Rak	34.0	2.00	1.43	0.091	0.643
	Nb	20.9	1.40	1.20	0.048	0.214
	Dra	25.7	1.60	1.28	0.079	0.429
	Api	9.4	1.40	1.27	0.076	0.357
	Kv	21.9	1.90	1.45	0.111	0.500
	Kun	20.1	1.60	1.29	0.078	0.357
	Agk	26.5	1.77	1.32	0.084	0.429
	Barv	32.1	2.00	1.35	0.079	0.357
	Cel	19.1	1.60	1.34	0.110	0.429
<i>M. nau.</i>	Mfa	24.5	1.60	1.36	0.110	0.429
	Kv	19.6	1.50	1.32	0.092	0.286
	Orf	11.6	1.40	1.31	0.101	0.214
<i>M. arion</i>	Kh	18.5	1.70	1.48	0.175	0.571
	Vko	10.8	1.60	1.50	0.188	0.429
	Gyt	13.8	1.80	1.67	0.220	0.643
<i>M. alc. pn.</i>	Dra	14.6	1.40	1.26	0.105	0.357
	Fül	29.4	1.40	1.26	0.094	0.286
	Kun	24.0	1.40	1.28	0.091	0.357
	Gyr	53.5	1.40	1.24	0.074	0.214
	Cel	22.2	1.40	1.24	0.058	0.286
	Sac	20.3	1.30	1.22	0.081	0.214
<i>M. alc. cr.</i>	Var	16.6	1.40	1.23	0.067	0.357
	Gyt	20.6	1.50	1.29	0.095	0.357
	Nan	15.8	1.40	1.25	0.063	0.286
	Toh	37.7	1.40	1.21	0.057	0.214
	Kur	49.9	1.60	1.29	0.079	0.357
	Bsz	14.9	1.60	1.38	0.128	0.429
	Bukk	9.9	1.40	1.26	0.071	0.286

E.4.2.1. függelék: Az E.4.2.1. esettanulmányban elemzett *Maculinea nausithous* populációk gyűjtőhelyei. N_{enz} : az enzimvizsgálatok mintaszámai; N_{morf} : a morfometriai elemzésekben használt hímek száma. NYDT: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina.

Régió	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N_{enz}	N_{morf}
NYDT	Nagygörbő	Ng	17.1852	46.9318	18	-
	Orfalu	Orf	16.2695	46.8789	12	-
	Szomoróc	Szo	16.3193	46.7819	36	-
	Öriszentpéter	Oszp	16.3955	46.8587	24	-
	Magyarszombatfalva	Mfa	16.3335	46.7579	46	18
	Kétvölgy	Kv	16.2267	46.8793	74	28
TRY	Fanatele A	FanA	23.6272	46.8313	22	-
	Fanatele B	FanB	23.6321	46.8414	59	25
	Rascrucci	Ras	23.7290	46.9236	89	23
BUK	Radauti	Rad	25.9192	47.8425	24	-
	Solca	Sol	25.8367	47.7000	27	18
	Sucevita	Suc	25.7167	47.7833	32	-

E.4.2.2. függelék: Az E.4.2.1. esettanulmányban elemzett *Maculinea nausithous* populációk variabilitásának mutatói. N : az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar : allélgazdagság ($N=6$); %Fix: a fixálódott allélok aránya; H_o : tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. NYDT: Nyugat-Dunántúl; TRY: Erdély; BUK: Bukovina.

Régió	Pop	N	n_A	Ar	%Fix	H_o	P_{95}
NYDT	Kv	72.9	1.94	1.42	0.303	0.095	0.412
	Orf	11.6	1.35	1.34	0.609	0.083	0.176
	Oszp	23.5	1.65	1.40	0.357	0.086	0.412
	Mfa	45.2	1.88	1.48	0.281	0.100	0.471
	Szo	35.3	1.65	1.38	0.357	0.109	0.412
	Ng	17.9	1.53	1.37	0.462	0.095	0.294
TRY	FanA	20.4	1.88	1.64	0.219	0.173	0.588
	FanB	57.9	2.29	1.75	0.154	0.165	0.647
	Ras	86.2	2.35	1.75	0.125	0.167	0.706
BUK	Rad	23.8	1.65	1.41	0.321	0.099	0.471
	Suc	31.6	1.59	1.33	0.333	0.087	0.471
	Sol	26.6	1.71	1.51	0.310	0.137	0.471

E.4.2.3. függelék: A Bayes-féle klaszteranalízisek összesített eredménye az E.4.2.1. esettanulmányban elemzett *Maculinea nausithous* populációk esetében. K: klaszterek száma; Ism.: ismétlések száma az adott K érték mellett; Átl. L (K): átlagos log likelihood értékek az adott K esetében; SD L (K): a log likelihood értékek szórása adott K esetén; Delta K: $(L''(K)) / Sd(L(K))$. A kövér betűk az elfogadott K értékeket jelölik.

K	Ism.	Átl. L (K)	SD L (K)	Delta K
1	3	-5141.6	0.06	NA
2	5	-4481.3	1.14	428.12
3	5	-4307.9	2.14	74.48
4	6	-4293.6	3.96	1.67
5	5	-4272.7	7.24	1.28
6	5	-4261.0	14.80	2.01
7	5	-4279.0	11.51	1.02
8	6	-4285.3	7.55	2.02
9	5	-4276.4	20.13	1.08
10	3	-4289.2	18.78	0.46
11	3	-4310.6	14.92	1.33
12	3	-4312.1	8.76	NA

E.4.2.4. függelék: Az E.4.2.2. esettanulmányban elemzett *Euphydrys matura* populációk gyűjtőhelyei és mintaszámai (N). F.reg.: földrajzi régiók; K.reg.: klaszter régiók. NYÍR: Nyírség; BER: Szatmár-Beregi-sík; KÖR: Körösök vidéke; ÉMO: Észak-Magyarország; KUN: Kiskunság; BAK: Bakony-hegység; DRA: Dráva-sík; TRY: Erdély; DOB: Dobrudzsa; ÉKM: Észak- és Kelet-Magyarország; KNYM: Közép- és Nyugat-Magyarország.

F.reg.	K.reg.	Populáció	Pop.jel.	Hosszúság	Szélesség	N
NYÍR	ÉKM	Fényi-erdő: Ömböly	FeO	47.71447	22.24097	40
		Fényi-erdő: tisztás	FeI	47.74529	22.26851	21
		Fényi-erdő: határ	FeII	47.73025	22.28587	40
		Fényi-erdő: erdőszél	FeIII	47.73568	22.27544	29
		Guti-erdő A	GutA	47.63689	22.00247	43
		Guti-erdő B	GutB	47.65218	21.97836	47
		Bátorliget	Bat	47.76821	22.27258	42
		Fülesd	Ful	48.03633	22.64924	15
		Lónyai-erdő	Lon	48.26756	22.34296	29
		Fehérgyarmat	Feh	48.03048	22.51050	14
		Magosliget	Mag	48.06818	22.85857	20
		Sebesfoki-erdő	Seb	46.75514	21.23376	23
		Dobozi-erdő	Dob	46.74631	21.23578	25
		Gyula Városerdő	GyV	46.69382	21.32325	46
KÖR		Gyula Köriserdő	GyK	46.68262	21.33972	24
		Noszvaj	Nov	47.89762	20.51558	23
		Sajólád	Saj	48.03816	20.91660	43
		Girincs	Gir	47.96526	20.97223	33
		Feldebrő	Feld	47.80236	20.20911	30
ÉMO		Kisgyőr	Kgy	48.02989	20.67063	16
KUN	KNYM	Kunpeszér	Kun	47.06451	19.27941	43
BAK		Marko	Mar	47.16496	17.79769	32
DRA		Őrtilos	Ort	46.23843	16.97946	23
TRY	TRY	Torockó	Tor	46.43643	23.53326	29
		Tordai-hasdék	Tdh	46.56237	23.68811	20
DOB	DOB	Dobrudzsa	Dobr	44.91890	28.42095	19

E.4.2.5. függelék: Az E.4.2.2. esettanulmányban elemzett *Euphydryas maturna* populációk variabilitásának mutatói. N: az átlagos mintaszám; n_A : az allélok tapasztalt száma; Ar: allélgazdagság (N=7); %Fix: a fixálódott allélok aránya; Ho: tapasztalt heterozigóta gyakoriság; P_{95} : a polimorf lokuszok aránya a 95%-os kritérium alapján. ; ÉKM: Észak- és Kelet-Magyarország; KNYM: Közép- és Nyugat-Magyarország; TRY: Erdély; DOB: Dobrudzsa.

Gen. Reg.	Pop	N	n_A	Ar	%Fix	Ho	P_{95}
ÉKM	FeO	39.5	1.94	1.57	0.171	0.114	0.667
	FeI	20.9	1.72	1.45	0.290	0.086	0.500
	FeII	39.9	1.94	1.53	0.121	0.104	0.667
	FeIII	28.9	2.11	1.64	0.132	0.122	0.722
	GutA	42.9	1.83	1.49	0.212	0.101	0.611
	GutB	46.9	1.89	1.50	0.206	0.123	0.611
	Bat	41.8	1.78	1.51	0.281	0.132	0.500
	Ful	15.0	1.72	1.55	0.323	0.133	0.444
	Lon	28.8	1.94	1.60	0.200	0.144	0.611
	Feh	14.0	1.72	1.54	0.387	0.115	0.333
	Mag	19.3	1.56	1.40	0.286	0.091	0.556
	Seb	22.6	1.94	1.57	0.200	0.131	0.611
	Dob	25.0	1.78	1.46	0.250	0.118	0.556
	GyV	45.9	1.78	1.40	0.281	0.099	0.500
	GyK	24.0	1.56	1.43	0.429	0.109	0.333
	Nov	23.0	1.61	1.44	0.345	0.089	0.444
	Saj	43.0	1.67	1.43	0.333	0.102	0.444
	Gir	32.9	1.67	1.39	0.300	0.097	0.500
	Feld	29.9	1.67	1.42	0.300	0.104	0.500
	Kgy	15.9	1.89	1.69	0.235	0.164	0.556
NYKM	Kun	43.0	2.06	1.65	0.189	0.151	0.611
	Mar	31.0	1.83	1.67	0.182	0.197	0.667
	Ort	22.0	1.78	1.63	0.219	0.184	0.611
TRY	Tor	28.6	1.94	1.68	0.257	0.155	0.500
	Tdh	19.6	1.61	1.53	0.345	0.114	0.444
DOB	Dobr	19.0	1.94	1.86	0.200	0.228	0.611

E.4.2.6. függelék: A Bayes-féle klaszteranalízisek összesített eredménye az E.4.2.2. esettanulmányban elemzett *Euphydryas maturna* populációk esetében. K: klaszterek száma; Ism.: ismétlések száma az adott K érték mellett; Átl. L (K): átlagos log likelihood értékek az adott K esetében; SD L (K): a log likelihood értékek szórása adott K esetén; Delta K: $(|L''(K)|) / Sd(L(K))$. A kövér betűk az elfogadott K értékeket jelölik.

K	Ism.	Átl. L (K)	SD L (K)	Delta K
1	5	-8343.6	0.00	NA
2	5	-8163.9	5.22	14.71
3	5	-8060.9	6.50	9.00
4	5	-7899.4	4.68	25.83
5	5	-7858.7	104.32	0.57
6	5	-7758.5	7.81	16.01
7	5	-7783.3	20.47	1.28
8	5	-7781.8	20.57	0.61
9	5	-7793.0	15.39	0.04
10	5	-7803.4	21.12	1.77
11	5	-7851.2	23.39	0.60
12	5	-7885.1	16.08	0.86
13	5	-7932.9	17.78	2.33
14	5	-8022.1	21.33	0.52
15	5	-8100.3	27.39	5.55
16	5	-8330.4	206.29	0.40
17	5	-8478.4	25.90	6.21
18	5	-8465.4	91.47	1.18
19	5	-8560.7	53.98	0.33
20	5	-8638.2	80.48	0.19
21	5	-8731.2	107.41	0.20
22	5	-8803.0	87.15	0.83
23	5	-8947.2	91.47	0.55
24	5	-9041.5	75.44	0.81
25	5	-9196.6	88.98	0.67
26	5	-9292.3	154.27	NA