

**Kételtűek klasszikus és molekuláris taxonómiája, filogeográfiája és populációgenetikája
három kontinensen**

MTA Doktori értekezés

Vörös Judit

HUN-REN Balatoni Limnológiai Kutatóintézet

Budapest

2025

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Farkos kétéltűek filogeográfiája és populációgenetikája a Kárpát-medencében	7
2.1. Síkvidéki fajok.....	7
2.1.1. A dunai tarajosgöte (<i>Triturus dobrogicus</i>) filogeográfiája és populációgenetikája.....	7
2.1.2. A pettyes göte (<i>Lissotriton vulgaris</i>) populációgenetikája.....	16
2.2. Hegyvidéki fajok.....	23
2.2.1. Az alpesi göte (<i>Ichthyosaura alpestris</i>) filogeográfiája és intraspecifikus taxonómiája.....	23
2.2.2. A foltos szalamandra (<i>Salamandra salamandra</i>) filogeográfiája és populációstruktúrája.....	32
3. A barlangi vakgöte (<i>Proteus anguinus</i>) környezeti DNS-alapú kimutatása és populációstruktúrája a Balkán-félszigeten	42
3.1. A barlangi vakgöte környezeti DNS-alapú kimutatása.....	43
3.2. A barlangi vakgöte populációstruktúrája Horvátországban, és tíz variábilis, fajspecifikus mikroszatellita-marker fejlesztése.....	50
3.3. Új, víz alatti mintavételi módszer kifejlesztése a barlangi vakgöte populációgenetikai vizsgálatához.....	57
4. Két levelibékafaj (<i>Litoria aurea</i> és <i>Litoria raniformis</i>) filogeográfiája és molekuláris szisztematikája Óceániában	63
4.1. A két levelibékafaj betelepítésének története Ausztráliából Új-Zélandra.....	63
4.2. A <i>Litoria raniformis</i> molekuláris szisztematikája Ausztráliában.....	69
5. Integratív taxonómia Dél-Amerikában öt új faj leírásával	83
5.1. A <i>Phyllodytes amadoi</i> és ebihalának leírása Brazília atlanti esőerdejéből.....	83
5.2. Négy új <i>Pristimantis</i> -faj leírása Ecuadorból.....	93
5.2.1. A <i>Pristimantis phoxocephalus</i> fajcsoport egy új faja Loja városából.....	93
5.2.2. A <i>Pristimantis orestes</i> fajcsoport három új faja.....	103
6. Összegzés	118
7. Az értekezés témaköréből készült közlemények	121
7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	121
7.2. További közlemények a PhD fokozat megszerzése óta.....	122
8. Köszönetnyilvánítás	124
9. Irodalomjegyzék	125

1. Bevezetés

A kétéltűek (Amphibia) a gerincesek egyik legősibb és legváltozatosabb osztályát alkotják. Tagjai kulcsszerepet töltenek be a szárazföldi és vízi ökoszisztémák működésében (Hopkins 2007). Jelenleg 8890 leírt faj képviseli az osztályt (Amphibiaweb 2025), és bár az Antarktiszon kívül mindegyik kontinensen előfordulnak, a fajok nagy része a trópusokon él (Gastner & Newman 2004). Habár a leírt fajok 40,7%-a globálisan veszélyeztetett, amihez elsősorban az élőhelyeik eltűnése, a klímaváltozás és a betegségek járulnak hozzá (Luedtke és mtsai. 2024), átlagosan évente 150 új fajt fedeznek fel (Amphibiaweb 2025). Ehhez az ellentmondásos helyzethez nagymértékben hozzájárul az egyre modernebb molekuláris módszerek alkalmazása a populáció- és fajszintű kutatásokban, amelyek segítségével nagyszámú morfológiailag rejtőzködő (kriptikus) taxont azonosítanak (Funk és mtsai. 2012, Hebert és mtsai. 2003, Köhler és mtsai. 2005, Lehtinen és mtsai. 2007, Stuart és mtsai. 2006). Jól mutatja az ismert fajok számának bővülését, hogy a második IUCN Globális Kétéltű Felmérés (GAA2, 2022-ben) az első felméréshez képest (GAA1, 2004-ben) 2286 fajról tudott hozzáadni információt (Luedtke és mtsai. 2024). Gyakran ugyan a leírt fajok csak kis területről – vagy csak a típuslelőhelyről – ismertek, rögtön veszélyeztetett természetvédelmi kategóriába kerülnek. A kriptikus fajok feltárása kulcsfontosságú a természetvédelmi kezelési tervek megalkotásához (Bickford és mtsai. 2007, Mace 2004). A fajszintű azonosítás megfelelő ismerete nélkül az egyes fajok természetvédelmi helyzete téves értelmezéshez és helytelen gyakorlati természetvédelmi intézkedésekhez vezethet. Amikor egy kriptikus fajkomplexről kiderül, hogy két vagy több faj alkotja, a korábban széles elterjedésűnek hitt taxon elterjedését újra kell értékelni (pl. Ausztráliában, Catullo és mtsai. 2014, Catullo & Keogh 2021, Donnellan és mtsai. 1999, Donnellan és mtsai. 2004, Hoskin 2007, Mahony és mtsai. 2001, Mahony és mtsai. 2022, McDonald és mtsai. 2016, Rowley és mtsai. 2021). Az újonnan felismert taxonok nagy valószínűséggel kisebb elterjedési területtel rendelkeznek, és akár fokozottan veszélyeztetettek lehetnek (Bickford és mtsai. 2007). A kis elterjedési területtel rendelkező fajok jobban ki vannak téve a súlyos aszályoknak és más, az éghajlatváltozással összefüggő eseményeknek, ami további állománycsökkenést okoz és fokozott kihalási kockázattal jár (Blaustein és mtsai. 2010, Carey & Alexander 2003). Továbbá a kis elterjedési területtel rendelkező fajok nagyobb valószínűséggel szenvednek a fertőző betegségek következményeitől, mint például a kitridiomikózistól, amelyet a *Batrachochytrium dendrobatidis* rajzospórák gombafaj okoz (Bielby és mtsai. 2008, Geyle és mtsai. 2021).

Európa kétéltűfaunája intenzíven kutatott, ritkán kerülnek elő új fajok (Speybroeck és mtsai. 2020). A genetikai és genomikai módszerek egyre intenzívebb használatával azonban ezen a kontinensen is jelentős kriptikus változatosságot fedeztek fel elsősorban a mediterrán régióban az Ibériai-, Appenin-, és Balkán-félszigeteken (Velo-Antón és mtsai. 2023). Hosszú ideig tartotta magát az a paradigma, hogy ez a három régió képviselte az európai fauna pleisztocén eljegesedése alatti fő menedékterületeket (Hewitt 2004, Taberlet és mtsai. 1998). Fosszilis bizonyítékok világítottak rá arra először, hogy a három fő refúgiumterületen kívül több extra-mediterrán refúgium is létezhetett, pl. a Kárpát-medencében vagy délnyugat Franciaországban (Sommer & Benecke 2005, Sommer & Nadachowski 2006). Később egyre több bizonyíték került elő és támasztotta alá, hogy Észak-Európában további kriptikus refúgiumok alakulhattak ki a késő pleisztocénben (Rowe és mtsai. 2006, Stewart & Lister 2001, Tzedakis és mtsai. 2013). Ezeknek a refúgiumoknak az ismerete váratlan kriptikus változatosság felfedezését vont maga után főként Közép-Európa és a Balkán-félsziget határán, így a Kárpát-medencében is (Babik és mtsai. 2005, Ruiz-González és mtsai. 2013, Schmitt 2007, Schmitt & Varga 2012, Varga 2019). Több kétéltűfaj esetében igazolták, hogy közép-európai refúgium-területet használt, mint például a sárga- és vöröshasú unka (*Bombina variegata* és *B. bombina*) (Zacho és mtsai. 2025, Dufresnes és mtsai. 2021, Fijarczyk és mtsai. 2011, Hofman és mtsai. 2007, Spolsky és mtsai. 2006, Vörös és mtsai. 2006), a mocsári béka, *Rana arvalis* (Babik és mtsai. 2004), vagy a kárpáti göte, *Lissotriton montandoni* (Wielstra és mtsai. 2017). A Kárpát-

medencében előforduló kétéltűfajok – főként a farkos kétéltűek – evolúciós története azonban nagyrészt feltáratlan maradt.

A szubterrán ökoszisztémákat nagyszámú szűk elterjedésű és reliktum taxon jellemzi (Culver & Sket 2000, Holsinger 1993, Marmonier és mtsai. 1993). Ez elsősorban a szubterrán élőhelyek földrajzi elszigeteltségével magyarázható, ami elősegíti a genetikai sodródást (Gibert & Deharveng 2002, Romero 2011). Páratlan biodiverzitásuk kialakulása összefüggésben lehet a pleisztocén jégkorszakok hiányával is, mivel hosszú ideje nem érintették őket jelentős klimatikus ingadozások (Gibert & Deharveng 2002, Holsinger 1993, Howarth 1983). Sokáig a szárazföldi biotikumokhoz képest a szubterrán élőhelyeket nem tekintették különösen fajgazdagnak (Culver & Sket 2000). Azonban az elmúlt évtizedek felmérései alapján és a közelmúltban, főként a gerinctelenek körében leírt nagyfokú kriptikus diverzitás (Gibert & Deharveng 2002, Lefebure és mtsai. 2006, Rouch & Danielopol 1997, Schneider & Culver 2004) ezt a vélekedést felülírta. Jóllehet az obligát szubterrán faunát a gerinctelenek uralják (Culver és mtsai. 2000, Gibert & Deharveng 2002, Sket és mtsai. 2004), a gerincesek közül a csontos halak és a farkos kétéltűek sikeresen hódították meg ezeket az élőhelyeket. A földfelszínen vagy a felszín közelében élő taxonokkal összehasonlítva a szubterrán biodiverzitás lényegesen kevésbé tanulmányozott. Ezen belül a barlangi biodiverzitásnak csak kis részét vizsgálták eddig a fizikai hozzáférhetetlenség vagy a megfelelő mintavételi módszerek hiánya miatt (Gibert és mtsai. 2009). A nagyszámú endemizmus mellett a szubterrán vizek biológiai sokfélesége értékes ökoszisztéma-szolgáltatásokat is nyújthat (pl. víztisztítás, bioremediáció, víz infiltráció és szállítás), ezért fontos ezen élőhelyek populációs, fajszintű és ökoszisztéma-diverzitásának felmérése (Boulton és mtsai. 2008, Deharveng és mtsai. 2009).

Az idegenhonos fajok betelepítése jelentős környezeti károkat okozhat az érzékeny élőhelyeken. Az egzotikus fajok - általában az ember által történő – behurcolása káros hatással lehet az őshonos élővilágra, és a biológiai sokféleség csökkenésének egyik legjelentősebb forrása (Couchamp és mtsai. 2003, Kats & Ferrer 2003). A biotikus homogenizáció jelensége, vagyis az egymástól eltérő élőhelyek élőlényegyütteseinek közötti különbség csökkenése az őshonos fajok idegenhonos fajokra cserélődése miatt, fokozott figyelmet kapott az elmúlt évtizedekben (Didham és mtsai. 2005, McKinney & Lockwood 1999, Olden & Poff 2004, Rahel 2002, Vitousek és mtsai. 1997). A homogenizáció három, egymással kölcsönhatásban álló folyamat eredménye: idegenhonos fajok betelepítése, őshonos fajok eltűnése, és az élőhelyek tönkretétele, amely elősegíti az előző két folyamatot (Rahel 2002).

Az idegenhonos fajokat vagy véletlenül hurcolják be globális közlekedés és kereskedelem révén, vagy szándékosan telepítik be, például vadászat, halászat, gazdálkodás vagy biológiai védekezés céljából. A magasabb trófikus szintű állatfajok használata alacsonyabb rendű invázió fajok biológiai kontrolljához bevett módszerek közé tartozik (Hoddle 2004). A kétéltűeket elsősorban a biológiai védekezés folyamatában a 20. században (Crossland 2000; Lever 2003), de ezeknek az idegenhonos kétéltűfajoknak a betelepítése gyakran az őshonos fajok visszaszorulásához vagy akár kipusztulásához vezetett (Collins & Storfer 2003). Legszemléltetőbb példa erre az óriás-, vagy agavarangy (*Bufo marinus*), amely Közép- és a trópusi Dél-Amerikában őshonos faj, és a cukornádültetvények kártevő rovarai ellen vetették be több trópusi országban. Miután megtelepedett, a *B. marinus* is kártevő fajjává vált többek között Hawaiiin (Kraus és mtsai. 1999) és Ausztráliában (Mungomery 1935). Szép lassan szemmel láthatóvá vált, hogy negatív hatással van az őshonos kétéltűfaunára (Crossland 2000), és bebizonyosodott, hogy közvetlen vagy közvetett hosszú távú hatása van más gerinces és gerinctelen taxonokra is (Covacevich & Archer 1975; Catling és mtsai. 1999). Új-Zélandra, ahol három őshonos kétéltűfaj (*Leiopelma* spp.) él, három Ausztráliában őshonos kétéltűfajt (*Litoria aurea*, *L. raniformis*, *L. ewingii*) telepítettek be. A három *Litoria*-faj őshazája, Ausztrália, gazdag kétéltűfaunának ad otthont, amely 253 (AmphibiaWeb 2025) leírt fajt jelent. Ezek közül 34-et az utóbbi 12 évben fedeztek fel molekuláris vagy integratív taxonómiai módszerekkel (AmphibiaWeb 2025). Bár kimutatták, hogy a kriptikus taxonok eloszlása hasonló a különböző biogeográfiai régiókban (Pfenninger & Schwenk 2007), az Ausztráliában

leírt fajok nagy részét a trópusi területeken találták és csak néhányat a mérsékelt égövi régiókban. A legjelentősebb számú endemizmust és kriptikus fajkomplexet Észak-Ausztrália monszunhatás által befolyásolt trópusi területein fedezték fel (Pepper és mtsai. 2016).

Az atlanti esőerdő Brazília keleti partvidékén húzódik, és a világ egyik legfajgazdagabb területe (Myers és mtsai. 2000). Az elmúlt 500 évben az atlanti esőerdő eredeti kiterjedésének közel 88%-a eltűnt, és helyét az ember által módosított tájak, mint például legelők, szántóföldek vagy települések vették át (Ribeiro és mtsai. 2009, Tabarelli és mtsai. 2004). Viszonylag kis fennmaradt területe (4000 km²) ellenére Brazília kétéltű-faunájának fele itt található, és Brazilián belül itt a legmagasabb (85 %) az endemizmusok száma (Cruz & Feio 2007, Haddad és mtsai. 2013).

Ecuador egyike a világ azon országainak, ahol kiemelkedően gazdag a biológiai sokféleség (Bass és mtsai. 2010, Ulloa és mtsai. 2017), legmagasabb a kétéltűek fajsűrűsége (egy területegységre jutó fajok száma) (Ron és mtsai. 2019) és figyelemre méltó az endemikus fajok száma is (Ortega-Andrade és mtsai. 2021). Kis mérete ellenére Ecuador számos olyan ökoszisztémát rejt a trópusi Andok régiójában, amelyeket a kétéltűdiverzitás forró pontjaként ismerünk (Ron és mtsai. 2019). Változatosságuk még messze nem teljesen feltárt, folyamatosan kerülnek elő új fajok a térségből amit az elmúlt években publikált tanulmányok bizonyítanak (Brito és mtsai. 2017, Franco-Mena és mtsai. 2023, Reyes-Puig és mtsai. 2019, 2024, Sánchez-Nivicela és mtsai. 2021, Székely és mtsai. 2020).

Legyenek azok Közép-Európa felszíni vizeiben vagy a Balkán-félsziget felszín alatti vizeiben élő farkos kétéltűek, Új-Zélandra betelepített, de Ausztráliában őshonos levelibékák, Brazília atlanti esőerdejében vagy Ecuador trópusi Andok régiójában élő endemikus békafajok, fontos, hogy megismerjük és leírjuk változatosságukat. Míg Európában a fajösszetétel ismeretében tudunk a populációsintű változatosságra fókuszálni és biogeográfiai összefüggéseket felderíteni, addig Ausztrália és Dél-Amerika egyes régióiban elsősorban a fajsintű változatosság feltárására van szükség. Dolgozatomban a fent említett három kontinens kiválasztott kétéltűfajainak populációs, alfaji vagy faj-sintű változatosságának vizsgálatát mutatom be, amelyhez morfológiájukat, hívóhangjukat és/vagy genetikai jellegzetességeiket elemeztem.

A dolgozat négy fő fejezetre tagolódik. Az első fejezetben a Kárpát-medencében előforduló négy farkos kétéltűfaj (*Triturus dobrogicus*, *Lissotriton vulgaris*, *Ichthyosaura alpestris*, *Salamandra salamandra*) populációgenetikáját és filogeográfiáját mutatom be. A második fejezetben a barlangi vakgöte (*Proteus anguinus*) kimutatására fejlesztett környezeti-DNS-alapú módszert, a faj horvátországi populációinak genetikai vizsgálatát fajspecifikus mikroszatellita-markerek fejlesztésével, és egy nem-invázív víz alatti mintavételi technikát írok le. A harmadik fejezetben két levelibékafaj (*Litoria aurea* és *L. raniformis*) betelepítés-történetét tárom fel Új-Zélandon, és a *L. raniformis* endemikus ausztrál állományának molekuláris szisztematikáját szemléltetem. A negyedik fejezetben pedig Brazília atlanti esőerdejéből és Ecuador trópusi Andok régiójából leírt öt fajt (*Phyllodytes amadoi*, *Pristimantis lojanus*, *P. sagedunnae*, *P. paladines*, *P. numbala*) jellemzem.

Mivel a kutatásaimat együttműködésben végeztem, az eredményeket többszám első személyben mutatom be. Mindegyik kutatás során részt vettem a vizsgálat megtervezésében és a publikáció megírásában, a legtöbb vizsgálatban a mintavételezésben és a laboratóriumi feldolgozásban, és az adatok feldolgozása is a közreműködésemmel történt.

2. Farkos kétéltűek filogeográfiája és populációgenetikája a Kárpát-medencében

2.1. Síkvidéki fajok

2.1.1. A dunai tarajosgöte (*Triturus dobrogicus*) filogeográfiája és populációgenetikája

A folyók aktív szerepet játszhatnak a fajok evolúciós történetében, különböző módon befolyásolva populáció-dinamikájukat (Lyttle & Poff 2004; Robinson, Tockner & Ward 2002). Viselkedhetnek akadályként a szárazföldi fajok esetében, míg elterjedési folyosók lehetnek a folyókban élő vagy ahhoz kötődő életmóddal rendelkező fajok számára (Brandley és mtsai. 2010, Eriksson és mtsai. 2004, Vernesi és mtsai. 2015). A kétéltűek elterjedését mindkét irányban alakíthatják; lehetnek akadályok (főként tavakban (Martínez-Solano és mtsai. 2004) vagy a kisebb vízfolyásokban (Alexandrino, Arntzen & Ferrand 2002, García-París & Jockusch 1999) élő fajok számára), és terjedési útvonalak is, habár erre kevesebb példa található az irodalomban (Carstens és mtsai. 2005, Jones és mtsai. 2006).

A tarajosgöték (*Triturus* spp., N=9) Eurázsia emblematis farkos kétéltűi. A kilenc leírt faj közül a dunai tarajosgöte (*Triturus dobrogicus*, (Kiritzescu, 1903), Caudata: Salamandridae) (1. ábra) a leginkább vízhez kötődő, folyókban és környékükön is előforduló faj. Előfordulását a Bécsi-medencétől a Fekete-tengerig követhetjük a Duna, Tisza, Száva és Dráva vízgyűjtőihez tartozó síkvidéki élőhelyeken (Wielstra és mtsai. 2013) (2. ábra). Teljes európai állományának nagyjából 60%-a Magyarország területén él, ezért megóvásában kiemelt szerepe van a hazai természetvédelemnek.



1. ábra. Dunai tarajosgöte (*Triturus dobrogicus*) nőstény és hím példánya. Fotó: Halpern Bálint

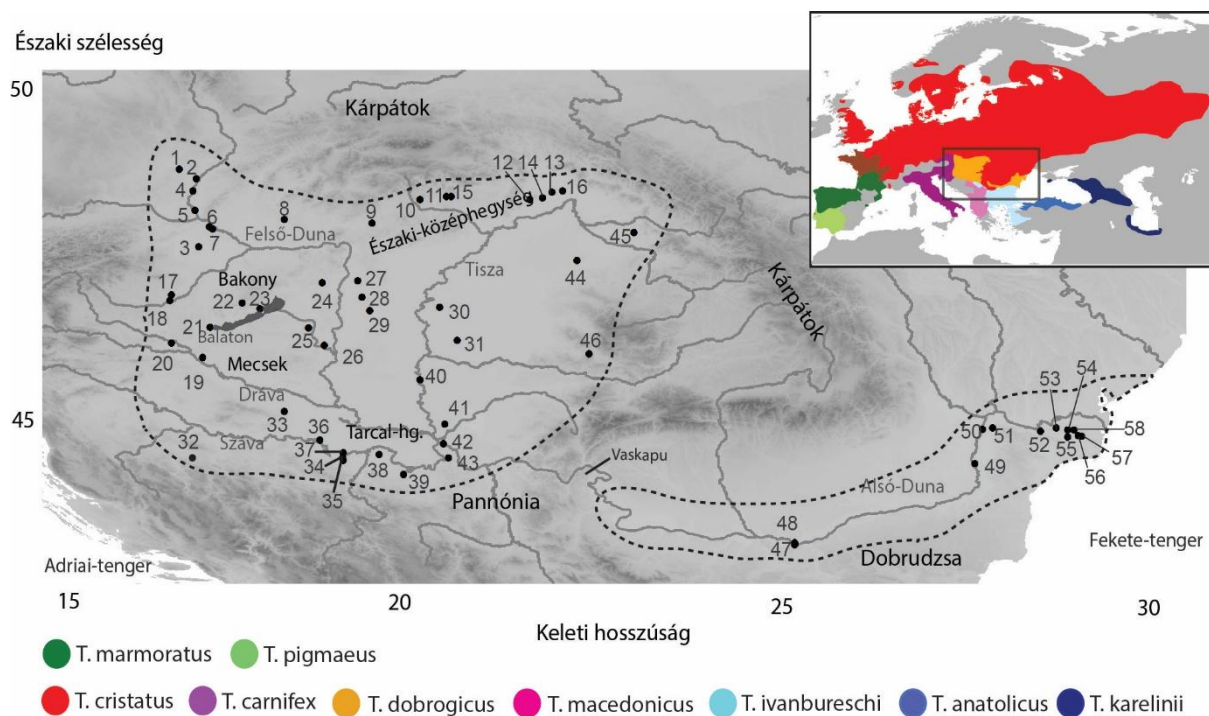
Jóllehet a most bemutatott munka előtt születtek már a dunai tarajosgöte evolúciós történetét különböző aspektusokból vizsgáló munkák (Themudo & Arntzen 2007, Vörös & Arntzen 2010, Wielstra és mtsai. 2013), egyik sem rekonstruálta kellő részletességgel a faj elterjedéstörténetét a Kárpát-medencében. Munkánk célja volt, hogy 1) feltárjuk a faj utolsó Pleisztocén eljegesedési időszak (LGM) alatt használt egy vagy több refúgium-területének pozícióját; 2) megértsük az LGM alatti és utáni diszperziós mintázatot, ami a *T. dobrogicus* jelenlegi elterjedéshez vezetett azt feltételezve, hogy a faj a nagyobb folyókat és a hozzájuk tartozó síkvidékeket használta diszperziós csatornaként és 3) potenciális elterjedési modellezést alkalmazva összehasonlítsuk a kapott eredményeket a vöröshasú unka (*Bombina bombina*) szakirodalomban közölt filogeográfiai adataival (Fijarczyk és mtsai. 2011, Pabijan és mtsai.

2013), mivel a *B. bombina* a *T. dobrogicus*-hoz hasonló ökológiai jellegzetességekkel és elterjedéssel rendelkezik Közép-Európában és az Észak-Balkánon.

Módszerek

Mintavétel, mitokondriális DNS-szekvenálás és mikroszatellita-genotipizálás

Lefedve a *T. dobrogicus* ismert elterjedési területét, 58 populáció 363 egyedéből gyűjtöttünk szövetmintát (2. ábra). A teljes genomi DNS-t a Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki. A NADH-dehidrogenáz gén 2. alegységének (ND2) 1065 bázispár (bp) hosszú szakaszát és a hozzá tartozó tRNS-Met 43 bp hosszú szakaszát amplifikáltunk az L3780/H5018 primerpár segítségével (Babik és mtsai. 2005). A PCR-reakciókat a Babik és mtsai. (2005) által leírt módszerek alapján futtattuk. Az amplifikált fragmentumokat Applied Biosystem/Hitachi 3130 Genetic Analyzer segítségével szekvenáltuk a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában. A szekvenciákat a BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999) szoftver segítségével szerkesztettük és illesztettük. A külső csoport taxonok (*T. pygmaeus*, *T. marmoratus*, *T. karelinii*, *T. macedonicus*, *T. carnifex*, *T. cristatus*) szekvenciáit az NCBI Genbankból töltöttük le (HQ697280, GQ258948, GU982516, GU982461, GU982459, GQ258949). A genetikai változatosság kimutatására hat, a *T. cristatus* elemzésére fejlesztett mikroszatellita-lókuszt használtunk (Krupa és mtsai. 2002). A PCR-reakciókat egy korábbi tanulmányunkban közölt protokoll (Vörös & Major 2007) szerint végeztük. A fragmenthossz-elemzést is a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában található Applied Biosystem/Hitachi 3130 Genetic Analyzer segítségével futtattuk a FragmentAnalysis 36_POP7 protokoll szerint. A mikroszatellita fragmenthossz-leolvasást a GeneMapper v4.0 szoftver (Applied Biosystems) segítségével végeztük.



2. ábra. A *T. dobrogicus* elterjedése Közép-Európában (szaggatott vonal). A számok mutatják a mintavételi helyszíneket a Vörös és mtsai. 2016, 1. táblázatával összhangban. A színes térkép a jobb felső sarokban a kilenc *Triturus*-faj előfordulását ábrázolja, Wielstra és mtsai. 2019 nyomán.

A mitokondriális DNS elemzése

A mitokondriális adatokat a következőképpen elemeztük: 1) átlagos nukleotid- és haplotípus-diverzitást számoltunk a fajon belül, a két kapott fő genetikai vonalon belül és a négy nagy folyó mentén elhelyezkedő csoportokon belül (Felső- és Középső- Duna-menti, Tisza, Száva és Alsó- Duna-menti állományok); 2) haplotípus-törzsfát építettünk; 3) haplotípus-hálózatot építettünk; és 4) hogy többet tudjunk meg a *T. dobrogicus* recens demográfiai történetéről, mismatch eloszlást (mismatch distribution) és Raggedness-indexet számoltunk; 5) a közelmúltbeli populációméret-változás tesztelésére Fu F_s és Tajima D-statisztikáját alkalmaztuk.

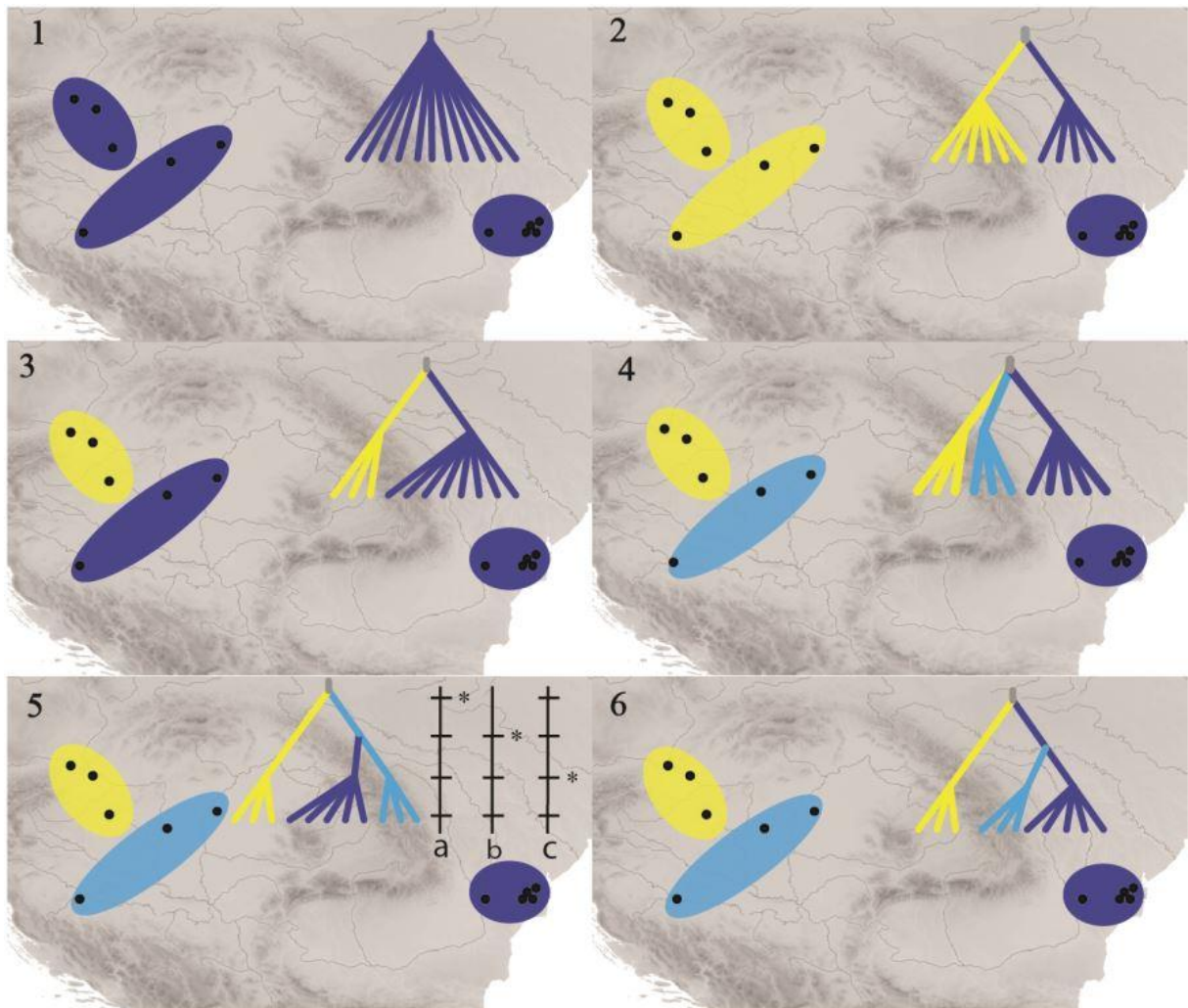
A mikroszatelliták elemzése

A mikroszatellita-fragmenteken a következő elemzéseket végeztük: 1) populációgenetikai mérőszámokat számoltunk (allélszám, privát allélok száma, beltenyészési együttható, várható és megfigyelt heterozigótaság, allélgazdagság, null allélok száma, Hardy–Weinberg egyensúlytól való eltérés, kapcsoltsági egyensúly egy populációban a vizsgált lókuszon (kapcsoltsági egyensúlytalanság - LD) 2) a populációk közötti genetikai különbség leírására F-statisztikát számoltunk 3) a Bayes-féle módszeren alapuló STRUCTURE szoftvert (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) használtuk a populációk genetikai struktúrájának jellemzésére 4) a populációk térbeli genetikai struktúráját a Geneland szoftver (Guillot, Mortier & Estoup 2005) segítségével írtuk le és 5) a DiyABC (Approximate Bayesian Computation) szoftverrel (Cornuet és mtai. 2008) próbáltuk megtalálni a legvalószínűbb elméletet a *T. dobrogicus* populációk elterjedés-történetére. Ehhez első lépésben hat különböző forgatókönyvet vázoltunk fel (3. ábra) és előzetes tesztek futtattunk:

- 1) a jelenlegi populációk egy refúgiumterületet használtak;
- 2) két refúgium a két földrajzi csoportot képviselve, Pannónia és Dobrudzsa területén;
- 3) két refúgium, a Geneland eredmények alapján: nyugati és keleti;
- 4) három refúgium, figyelembe véve a genetikai és földrajzi csoportokat;
- 5) három refúgium, a két genetikai csoport (nyugati és keleti), plusz egy fiatalabb szétválási esemény a két földrajzi csoport (Pannónia és Dobrudzsa) között a keleti genetikai csoporton belül, Dél-Pannoniát tekintve ősbibb populációnak;
- 6) ismételten három refúgium, a két genetikai csoport (nyugati és keleti), plusz egy fiatalabb szétválási esemény a két földrajzi csoport (Pannónia és Dobrudzsa) között a keleti genetikai csoporton belül, de a Duna-Deltát tekintve ősbibb populációnak.

Második lépésben az előzetes tesztek alapján legmagasabb valószínűségi értéket elért 5. forgatókönyvet teszteltük tovább, hogy a szétválási események időskáláját megállapíthassuk:

- 5a) a két genetikai csoport szétválása az LGM kezdete előtt történt;
- 5b) a két genetikai csoport szétválása a keleti csoporton belül az LGM kezdete előtt történt;
- 5c) a három csoport közötti mindegyik szétválási esemény az LGM kezdete előtt történt.



3. ábra. A *T. dobrogicus* refúgium-területeinek kialakulására felvázolt hat elmélet időbeli és térbeli ábrázolása. Az elméletek számozása a képek bal felső sarkában található. Az 5b és 5c elméletek megegyeznek az 5a elmélettel, csak az időskála különbözik. A csillaggal jelölt időbeli események az LGM-et jelzik.

Elterjedési-modellezés

A *T. dobrogicus* és a *B. bombina* közép-európai és észak-balkáni elterjedési területeit határoló hegységekben a közelrokon fajok (a gőte esetében a *T. carnifex*, *T. cristatus*, *T. ivanbureschi*, és *T. macedonicus*, a vöröshasú unka esetében pedig a *Bombina variegata*) fordulnak elő. Mindkét esetben a fajok alapvetően parapatikus elterjedésűek (Arntzen, Wielstra & Wallis 2014, Pabijan és mtsai. 2013). Az elterjedési-modellezéséhez a közelrokon fajokat használtuk fel, függő változóként az előfordulási adatokat, magyarázó változóként pedig a tengerszint feletti magasságot és domborzati viszonyokat adtuk meg. A múltbeli elterjedési modellek rekonstruálásától eltekintettünk, mivel a fajok múltbeli parapatikus elterjedését nem tudjuk adatokkal alátámasztani. A vizsgált területre a *Triturus* esetében 2000, a *Bombina* esetében pedig 4342 adatpont állt rendelkezésre (Sillero és mtsai. 2014, Wielstra és mtsai. 2014). A tengerszint feletti magassági adatokat a WorldClim 1.4 adatbázisból nyertük 30 ívmásodperc (kb. 1 km) felbontással (Hijmans és mtsai. 2005). A domborzat paramétert a tengerszint feletti magasság adatokból számoltuk ki különböző szűrőműveletek segítségével az ILWIS 3.8 program (ILWIS 2012) felhasználásával. Az elterjedési modellek pontosságát a görbe alatti terület statisztikával (Area Under the Curve - AUC) értékeltük (Guisan & Zimmermann 2000).

Eredmények

Mitokondriális DNS

Az ND2-fragment 44 variábilis nukleotid-pozíciót tartalmazott, amelyek közül 20 volt parszimónia-informatív. Összesen 38 különböző haplotípust találtunk, amelyek közül 13 több populációban is előfordult, 25 pedig csak egyszer. Tíz haplotípus kizárólag a dobrudzsai populációkra, 21 pedig kizárólag a pannon-populációkra volt jellemző, hét pedig mindkét területen megtalálható volt. A leggyakoribb haplotípus (H2) 35 egyedben fordult elő, és széles elterjedésű volt (4. ábra, Vörös és mtsai. 2016, 1. táblázat). A teljes haplotípus-diverzitás (H_d) $0,896 \pm 0,016$ (SD), a teljes nukleotid-diverzitás (π) pedig $0,003 \pm 0,000$ (SD) volt. A haplotípus- és nukleotid-diverzitás az Alsó-Dunán volt a legmagasabb ($H_d=0,927 \pm 0,020$, $\pi=0,003 \pm 0,002$), a Száva-folyó mentén valamivel alacsonyabb ($H_d=0,709 \pm 0,090$, $\pi=0,002 \pm 0,001$) és a Tisza-folyó ($H_d=0,831 \pm 0,044$, $\pi=0,001 \pm 0,001$) és a Felső- és Közép-Duna régió ($H_d=0,647 \pm 0,075$, $\pi=0,001 \pm 0,000$) mentén volt a legalacsonyabb. A két mtDNS-vonal elemzésekor a Tisza- és a Száva-folyókhoz kapcsolódó populációk magasabb haplotípus- és nukleotid-diverzitással rendelkeztek ($H_d=0,875 \pm 0,029$, $\pi=0,003 \pm 0,001$), mint a Pannon Duna-szakaszon előforduló populációk ($H_d=0,770 \pm 0,044$, $\pi=0,002 \pm 0,001$).

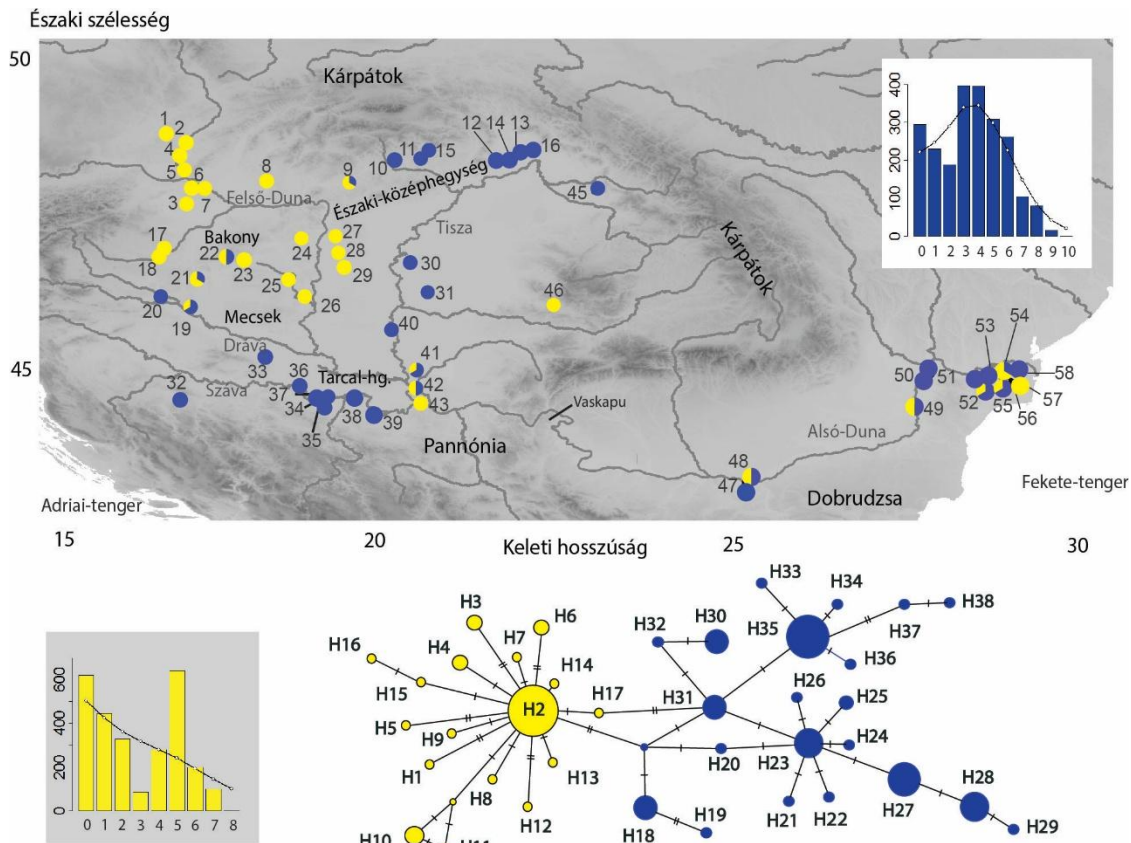
A filogenetikai rekonstrukció alapján a *T. dobrogicus* monofiletikus egységnek tekinthető. A ma élő *T. dobrogicus* mtDNS-vonalak legközelebbi közös őse a Késő-Pleisztocénre tehető (átlagos becsült érték 0,99 millió év, legmagasabb utólagos denzitás eloszlása, 95%-os konfidencia intervallum 1,44-0,59).

A BAPS két haplotípus-vonalat azonosított, az egyik az Észak-Pannon Duna-szakasról származó populációkat (H1-H17), a másik pedig a Száva és a Tisza mentéről származó populációkat (H18-H38) tartalmazta. A PopArt segítségével épített haplotípus-hálózat a Száva-Dráva, a Tisza és az Alsó-Duna régióban strukturáltabb volt, mint az Észak-Pannon Duna-szakaszban (4. ábra).

A két haplotípus-vonal mismatch-eloszlásait a 4. ábra mutatja be. A teszt egyik vonal esetében sem utasította el a populáció-terjedési modellt (Észak-Pannon Duna-szakasz, $SSD=0,30$, Raggedness index=0,43; Száva - Tisza-vidék, $SSD=0,47$, Raggedness index=0,78). Mind a Tajima D-statisztika, mind a F_u F_s negatív értékeket adott. A F_u F_s -statisztika szerint pedig mindkét haplotípus-vonalban egyensúlytól való szignifikáns eltérést tapasztaltunk (Észak-Pannon Duna-szakasz, $F=-6,970$, $p=0,014$; Száva - Tisza-vidék, $F=-8,504$, $p=0,002$) ($P<0,001$).

Populáció	NA	AR	H _o	H _E	F _{IS}	Populáció	NA	AR	H _o	H _E	F _{IS}
2	2.8	1.6	0.4	0.5	0.2	31	11.0	1.9	0.7	0.8	0.2
3	4.0	1.7	0.6	0.6	0.0	35	7.3	1.9	0.7	0.8	0.1
4	5.0	1.8	0.7	0.7	0.1	38	6.3	1.8	0.5	0.7	N.A.
5	10.2	1.8	0.5	0.8	0.3	40	7.8	1.9	0.6	0.8	0.2
6	9.0	1.8	0.5	0.8	0.3	41	8.7	1.9	0.7	0.8	0.1
19	8.2	1.9	0.7	0.8	0.2	42	8.7	1.9	0.8	0.9	0.1
20	6.8	1.8	0.6	0.7	0.2	47	6.8	1.9	0.7	0.8	0.1
21	8.5	1.9	0.6	0.8	0.3	50	5.7	1.9	0.9	0.8	-0.2
23	6.0	1.8	0.7	0.8	0.1	52	14.0	1.9	0.8	0.9	0.1
25	9.2	1.9	0.8	0.8	0.1	54	16.8	1.9	0.7	0.9	0.2
27	9.7	1.9	0.7	0.8	0.2	55	10.0	1.9	0.7	0.8	0.1
28	15.0	1.9	0.7	0.9	0.2	56	16.5	1.9	0.7	0.9	0.1
29	13.7	1.9	0.7	0.9	0.2	57	16.8	1.9	0.7	0.9	0.2
30	7.8	1.9	0.8	0.8	0.0	58	14.7	1.9	0.7	0.9	0.1
Átlag							9.5	1.9	0.7	0.8	0.1

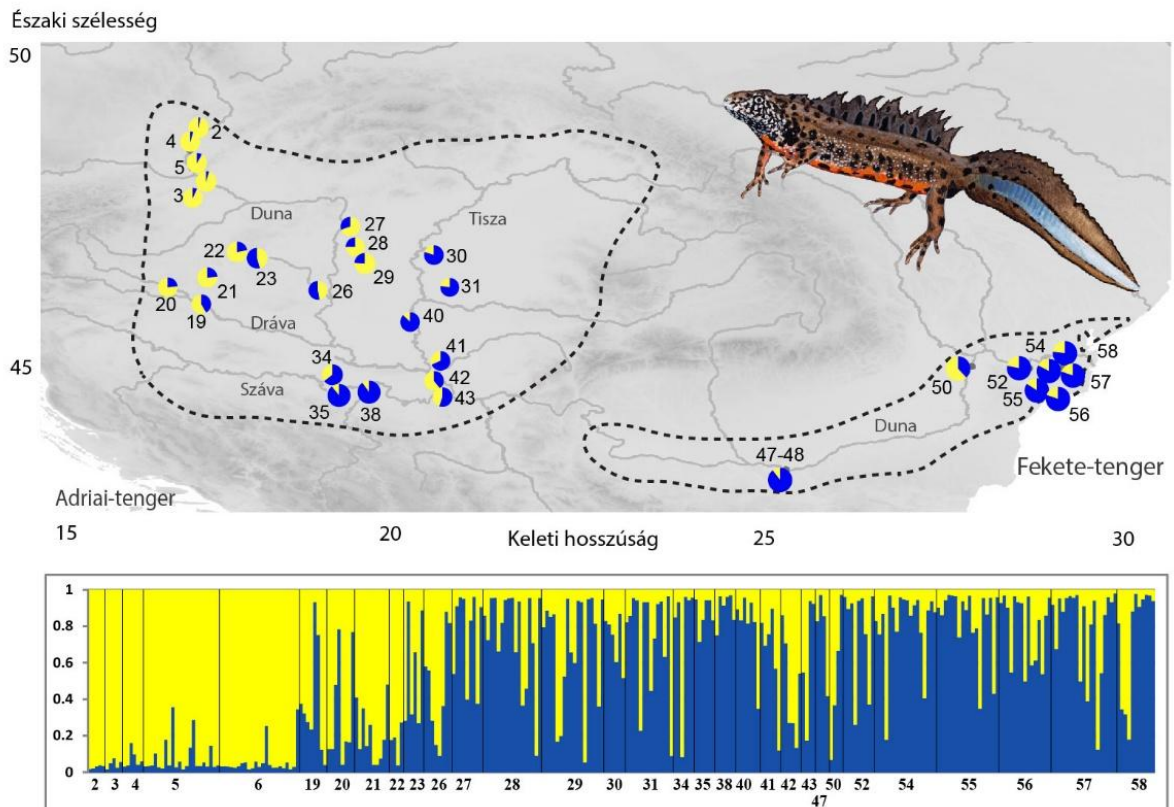
1. táblázat. Átlagos allélszám (NA), allélgazdagság (AR, minimum 1 egyedre számolva), megfigyelt (H_o) és várható (H_E) heterozigotás és beltenyésztési együttható (F_{IS}) 28 *T. dobrogicus* populációra. N.A. – nem elemzett.



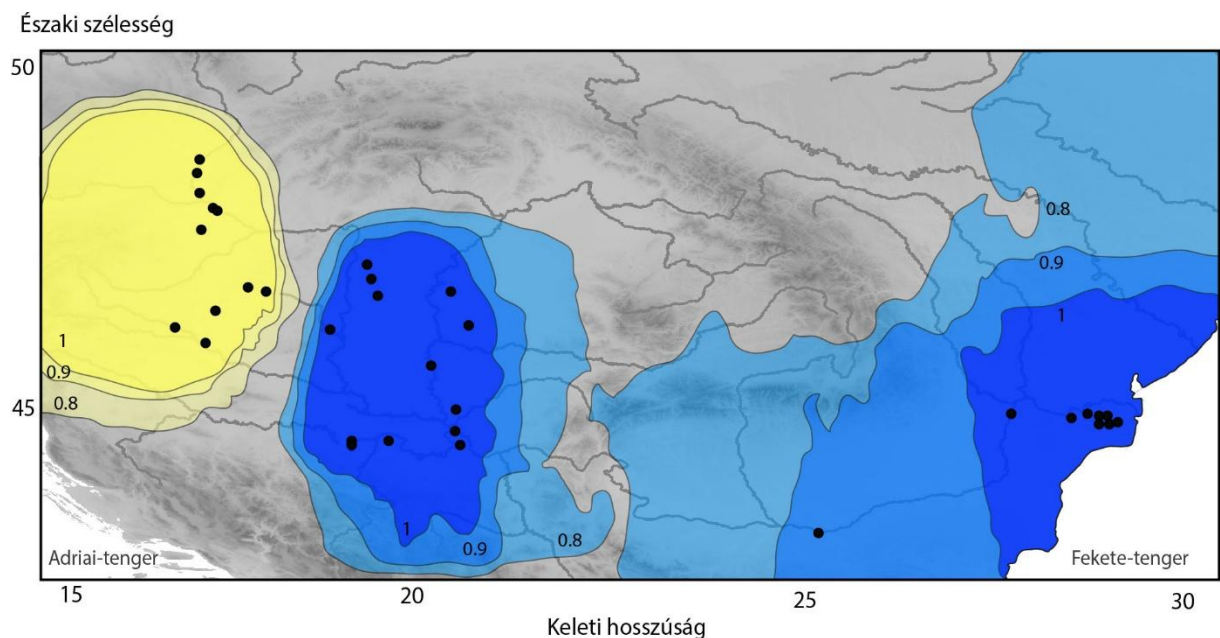
4. ábra. A 142 mitokondriális DNS-szekvenciából épített median-joining haplotípus hálózat. A körök nagysága a haplotípus-gyakoriságot jellemzi. A sárga körök a nyugati (H1-H17), míg a kék körök a keleti haplotípus-csoportot (H18-H38) képviselik. A hisztogramok a két csoport mismatch-eloszlását mutatják. Az oszlopok a megfigyelt értékeket mutatják, a fekete vonal pedig a várható - sudden expansion model alatti - eloszlást.

Mikroszatellita-markerek

A hat mikroszatellita-lókuszból mindegyike polimorf volt (allélszám=275, privát allélszám=55, átlagos allélszám lókuszonként és populációnként=9,5 volt (mintaterjedeleme (range) = 2,8-16,8). A populációnkénti átlagos allélgazdagság (egy egyedből álló minimális mintanagyság alapján) 1,85 volt (mintaterjedeleme = 1,56-1,94). A megfigyelt heterozigótáság kissé alacsonyabb volt (átlagos $H_o = 0,67$, mintaterjedeleme = 0,41 - 0,85), mint a várható heterozigótáság ($H_e = 0,80$, mintaterjedeleme = 0,50 - 0,89) (1. táblázat). A hat lókuszból becsült páros LD-értékek nem voltak szignifikánsak, és azt jelezték, hogy a vizsgált mikroszatellita-lókuszból szabadon rekombinálnak (Vörös és mtsai. 2016, SX1. táblázat). A 28 vizsgált populációból 16-ban találtunk Hardy-Weinberg-egyensúlytól való szignifikáns eltérést ($T_{cr}13$ (két populáció), $T_{cr}27$ (öt populáció), $T_{cr}35$ (kilenc populáció), $T_{cr}36$ (két populáció) és $T_{cr}46$ (12 populáció) lókuszból). A beltenyésztési együttható (F_{IS}) -0,2 és 0,3 között mozgott (1. táblázat). Negatív F_{IS} -értékeket csak egy populációban találtunk (50-es populáció). A globális F_{ST} (95%-os konfidencia intervallummal az ENA korrekciót alkalmazva) 0,058 (0,031-0,096) értéket mutatott, ami alacsony populációs differenciáltságot mutat. A populációk közötti F_{ST} -értékek 0 és 0,289 között mozogtak (2. és 35. populáció). A STRUCTURE-elemzés legvalószínűbbnek a $K=2$ csoportosítást választotta. Az északkelet-pannóniai populációk (2-6) alkottak egy csoportot, míg az összes többi populáció többé-kevésbé kevert jelleget mutatott (5. ábra). Ehhez hasonló képet mutatott a Geneland is ($\ln P(D) = -10730$), egy csoportba helyezve az Északnyugat-Pannóniában elhelyezkedő 2-6 és 19-23 populációkat, és egy másikba az összes többi populációt (6. ábra). A DiyABC szoftver az 5a elméletet jelölte meg legvalószínűbbnek.



5. ábra. A 38 populációhoz tartozó 313 *T. dobrogicus*-egyed populációstruktúrája, hat mikroszatellita-lókusz használatával, Bayes-féle klaszterezéssel elemezve. Az oszlop- és kördiagrammok az egyedek és populáció klasszifikációs valószínűségét jelzik. A mintavételi pontok megegyeznek a Vörös és mtsai, 2016, 1. táblázatban foglaltakkal. Götte grafika: Zsoldos Márton.



6. ábra. A Geneland-elemzéssel kapott klaszterek földrajzi elhelyezkedése a legnagyobb valószínűséget képviselő $K=2$ esetén. Sárga: Északnyugat-Pannónia, kék: Dél-Pannónia és Dobruzsza. A fekete pontok jelzik a mintavételi helyeket. A sötét sárga és kék foltok mutatják a legmagasabb valószínűségi értékeket, és a szintvonalak pedig a besorolási értékek térbeli változását.

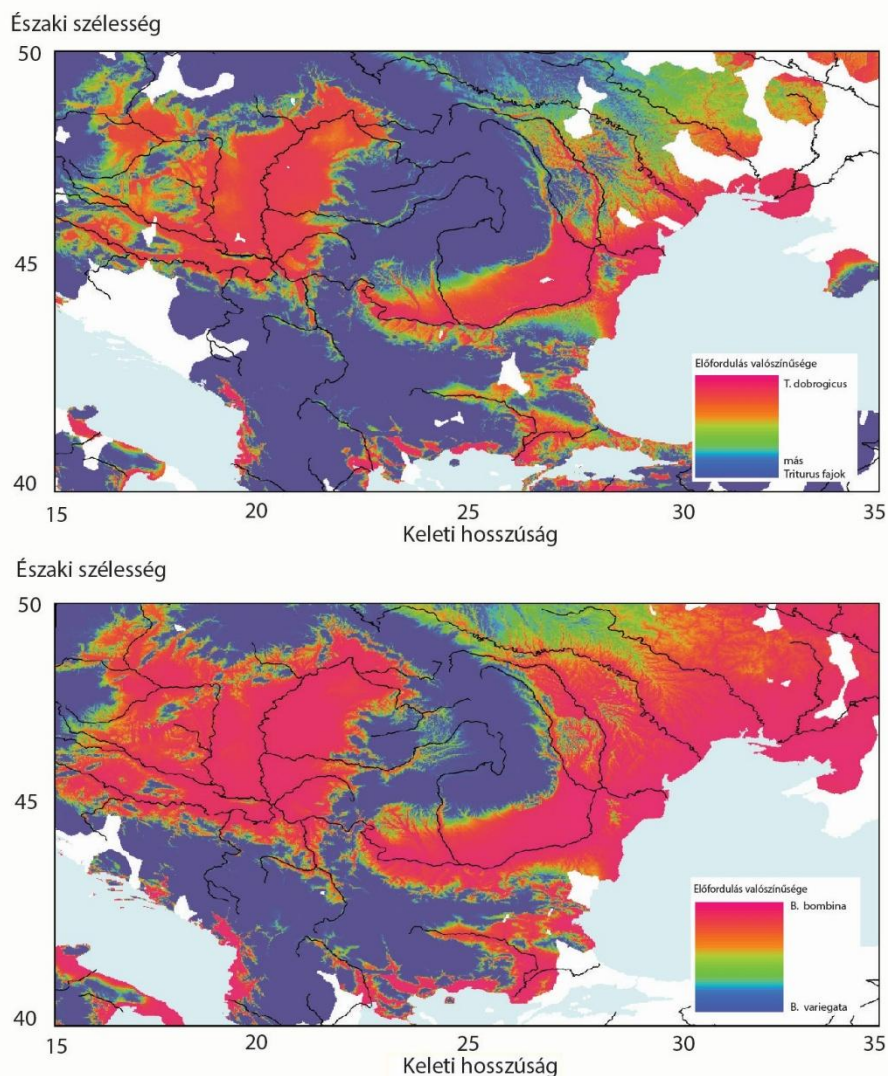
Elterjedési-modellezés

A *Triturus* és *Bombina* fajcsoportok elterjedési modelljeit a következő logisztikus egyenletek írják le, amelyekben p annak a valószínűsége, hogy egy adott térbeli egységet *T. dobrogicus* (p_T) vagy *B. bombina* (p_B) foglal el:

$$p_T = \frac{1}{1 + \exp(4.284 * \text{Altitude} + 1.625 * \text{Relief} + 2.602)}$$
 and

$$p_B = \frac{1}{1 + \exp(4.900 * \text{Altitude} - 0.119 * \text{Relief} + 1.459)}$$

A modellek térbeli ábrázolása a 7. ábrán látható. A domborzat paramétereit figyelmen kívül hagyva a modellek a *Triturus* esetében 156 m tengerszint feletti magasságon, a *Bombina* esetében pedig 269 m tengerszint feletti magasságon található síkvidék/hegyvidék átmenetnek felelnek meg. A *B. bombina* közép-európai és észak-balkáni elterjedése szélesebb, mint a *T. dobrogicus*-fajé. Mindkét modell arra utal, hogy a rokon fajok számára megfelelő élőhelyek vannak Pannónián belül például a Bakony-hegységben, az Északi-középhegységben, a Mecsekben és a Tardai-hegységben. A tényleges elterjedési adatok azt mutatják, hogy ezeket a hegységeket a *B. variegata* foglalja el, és a (nem-dobrogicus) tarajosgöték itt nem élnek (Gubányi és mtsai. 2010, Trócsányi, Schäffer & Korsós 2007, Vukov és mtsai. 2013).



7. ábra. A *Triturus dobrogicus* (felső kép) és *B. bombina* (alsó kép) élőhely-modellezése. Pirossal látható a vizsgált faj elterjedése, kékkel pedig a közelrokon fajok parapatikus elterjedése.

Diszkusszió

Tanulmányunk célja volt, hogy átfogó molekuláris vizsgálatok segítségével felderítsük a *T. dobrogicus* LGM alatti refúgium-területeinek feltételezett pozícióját. A mitokondriális DNS-vizsgálattal két haplotípus-csoportot azonosítottunk, egyiket a Duna kárpát-medencei szakaszán, a másikat a Tisza- és Száva-folyók mentén előforduló populációk alkotnak, míg a Duna alsó szakaszán a két vonal keveredik egymással. A legnagyobb haplotípus-diverzitást a Duna-Deltában és a Duna-Száva-Tisza összefolyása körül és után előforduló populációkban találtuk, amely jelenség nem ritka két vagy több folyó összefolyása alatt (Selkoe, Scribner & Galindo 2015). A mikroszatellita-vizsgálatok az északnyugat-kárpát-medencei és a többi populáció közötti genetikai szétválást mutatták. A DiyABC elemzések pedig a déli Kárpát-medence és a Duna-Delta közötti fiatalabb szétválási eseményt valószínűsítették.

Mindezekből arra következtethetünk, hogy a *T. dobrogicus* két külön refúgiumban élte túl az utolsó eljegesedési periódust. Egyik refúgium a Kárpát-medence északnyugati, a másik a déli részén helyezkedett el, ahonnan aztán a Duna és a Tisza mentén tudott szétterjedni a felmelegedési periódus alatt. Ezt a szétterjedési mintázatot támasztja alá a két mtDNS-vonal (Felső-közép-Duna és Száva-Tisza-folyók) mismatch-eloszlása és a Fu Fs és Tajima D-statisztikák eredményei. A szignifikáns Fu Fs érték arra utal, hogy a jelenleg a Száva-Tisza-alsó-Duna-mentén élő állományok egy kis őspopulációból rövid idő alatt alakulhattak ki.

A Würm-eljegesedés utáni felmelegedési periódus alatt a folyóvizekhez kötődő életmódú és síkvidéki fajok számára a Duna és a Duna-medence terjedési útvonalak lehettek a déli refúgiumokból észak felé (Hewitt 1999, Taberlet és mtsai. 1998, Varga 1995). Eredményeink alapján a *T. dobrogicus* is a Kárpát-medence nagy folyóit használhatta terjedési folyosóként. Az északnyugat kárpát-medencei populációk genetikai elkülönülése a Kárpát-medence folyóinak és vízgyűjtő rendszereinek komplex evolúciós történetével magyarázható. Nagyjából 140000 éve a Dunántúl folyóinak folyásiránya megváltozott, ami elválasztotta az Észak- és Közép-Dunántúlt (Gábris & Mari 2007). A Balaton kialakulásával a pleisztocén végén a folyók ismét észak felé fordultak, és a tótól nyugatra és délre kiemelkedő teraszokat formáltak (Sümegei, Gulyás & Jakab 2008). Ezek az akadályok elkülöníthették a *T. dobrogicus* északnyugati állományait, amelyek aztán önállóan fejlődtek egy darabig.

Több párhuzam is felfedezhető a *Triturus*- és *Bombina*-fajok elterjedési mintázatában. A *B. bombina* (ahogy a *T. dobrogicus* is) a síkvidékeken fordul elő, míg a *B. variegata* a hegyvidéki élőhelyeket foglalja el, csakúgy, mint a *T. carnifex*, *T. cristatus*, *T. ivanbureschi* és *T. macedonicus*. Fontos különbség azonban, hogy amíg a *B. variegata* jelen van a Kárpát-medence elszigetelt hegységeiben (pl. Bakony, Mecsek, Mátra, Zemplén), addig a nem-*dobrogicus* götefajok hiányoznak onnan. Valószínűleg ennek az eltérő mintázatnak a magyarázata a különböző LGM alatti refúgium-területek használatában és az LGM utáni elterjedés történetében rejlik. Nem valószínű, hogy az elszigetelt kárpát-medencei *B. variegata* populációk a faj recens terjedésének eredményei, hiszen akkor a fajnak olyan terepen kellett volna átkelnie, amit az eltérő ökológiai igényű, parapatikus elterjedésű *B. bombina* foglal el. Ráadásul jól ismert tény a két faj hibridizációja Közép-Európában (pl. Harrisó, 1993, Szymura & Barton 1986, Vines és mtsai. 2003). A kiterjedt interspecifikus hibridizáció valószínűtlenné teszi, hogy a *B. variegata* genetikailag érintetlenül jutott volna el az izolált Kárpát-medencei hegységekre. Valószínűbb, hogy a Fekete-tenger partvidékén az eljegesedés során menedéket találó *B. bombina* érkezett később a Kárpát-medencébe, kompetíció és hibridizáció révén kiszorítva a *B. variegata*-t az alacsonyabban fekvő területekről (Arntzen 1978, Vörös és mtsai. 2006). Ezzel ellentétben a *T. dobrogicus* a Száva-vidéken elhelyezkedő refúgiumából azelőtt szétterjedt a síkvidéki élőhelyeken, hogy a többi *Triturus*-faj posztglaciális vándorlása során elérhette volna a Kárpát-medencét.

2.1.2. A pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*) populációgenetikája

A pettyes göte (*Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758), Caudata: Salamandridae) (8. ábra) széles elterjedésű, eurázsiai faj (Arntzen és mtsai. 2009). Magas fajon belüli változatosságot mutat, legalább hét alfajra tagozódik, és számos evolúciós vonal fajképződési folyamatát képviseli, amelyek ráadásul földrajzilag és morfológiailag is részben átfednek egymással (Raxworthy, 1990). Az elterjedési terület északi részén fordul elő a törzsalak *L. v. vulgaris*, amelyet a közelmúltban multilókusz adatok felhasználásával északi és déli *L. v. vulgaris* genetikai vonalakra osztottak (Pabijan és mtsai. 2017). A többi alfaj tekintetében a *L. v. graecus* a Balkán-félsziget déli részén fordul elő, a *L. v. kossingwi* a Fekete-tenger partvidékének egy kis területére korlátozódik, a *L. v. schmidlerorum* Nyugat-Anatóliában és a Márvány-tenger partvidékén dominál, míg a *L. v. lantzi* az Észak-Kaukázusban és a Transzkaukázus egyes részein él. A közelmúltban a fent említett négy déli alfajt faji rangra emelték (*L. graecus*, *L. kossingwi*, *L. lantzi* és *L. schmidleri*) (Pabijan és mtsai. 2017). Az Appennin-félszigetet és a szomszédos területeket a *L. v. meridionalis* lakja, végül pedig a *L. v. ampelensis* Erdélyben honos, előfordulása keleten a Kárpátokig és a Hargita-fennsíkig terjed. Ez idáig a Kárpát-medence keleti részén nem erősítették meg a jelenlétét. A fajok és alfajok elterjedését legjobban Pabijan és mtsai. (2017) tanulmány 1. ábrája foglalja össze. A közép-európai genetikai vonalak parapatikus előfordulása előrevetíti a közöttük lévő génáramlás lehetőségét. A *L. v. ampelensis* két morfológiai formára különíthető el, és intenzív génáramlást mutat mind a két *L. v. vulgaris* vonallal és a *L. montandoni* fajjal (Pabijan és mtsai. 2017; Zieliński és mtsai. 2016, 2019). De a déli *L. v. vulgaris* vonal és a *L. v. meridionalis* közötti génáramlás sem ismeretlen (Pabijan és mtsai. 2017). Jelen tanulmányban két evolúciós vonal, a déli *L. v. vulgaris* és a *L. v. ampelensis* kárpát-medencei elterjedési mintázatára és populációszerkezetére összpontosítok.



8. ábra. Hím pettyes göte (*Lissotriton vulgaris vulgaris*). Fotó: Vörös Judit.

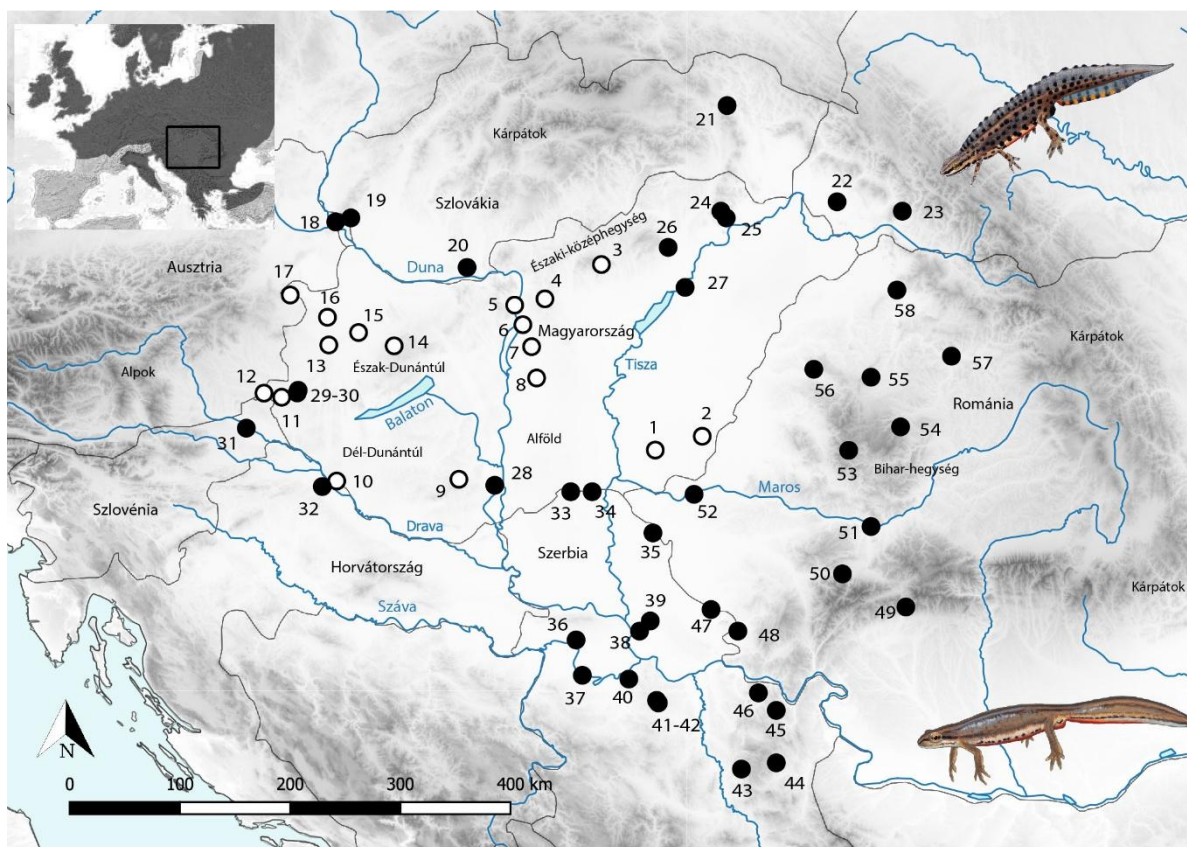
A pettyes göte elsődleges LGM alatti refúgium területének, és a magas genetikai változatosság forráspopulációjának a Balkán-félszigetet tartják, ahonnan aztán a visszaterjedő *L. vulgaris* populációk újranépesítették Közép- és Észak-Európát (Babik és mtsai. 2005, Pabijan és mtsai. 2015). Azt is bizonyították, hogy a faj a Balkántól északra és keletre több kisebb refúgium-területtel is rendelkezett, amelyek a faj genetikai változatosságának egy részét konzerválhatták (Babik és mtsai. 2005). Például a *L. vulgaris* és a *L. montandoni* mitokondriális DNS-vonalak előfordulása, valamint a déli *L. v. vulgaris* és a *L. kossingwi* közötti génáramlás arra utal, hogy a Kárpát-medence és Törökország ezen refúgium-területek közé tartozhatott (Babik és mtsai. 2005; Nadachowska & Babik 2009). Pabijan és mtsai. (2017) azt is felvetette, hogy a pettyes göte evolúciós vonalai egy másodlagos genetikai kontaktzónát alkotnak.

Tanulmányunkban populációgenomikai módszerek alkalmazásával vizsgáltuk 1) a *L. vulgaris* evolúciós vonalainak jelenlegi elterjedését és populáció-szerkezetét a Kárpát-medencében, 2) a déli *L. v. vulgaris* vonal és a *L. v. ampelensis* közötti lehetséges kontaktzónát a Kárpát-medence keleti részén, és 3) a Duna- és Tisza-folyók földrajzi barrier-szerepét a *L. vulgaris* populáció szerkezetének kialakulásában.

Módszerek

Mintavétel, laboratóriumi feldolgozás

Összesen 98 *L. vulgaris* egyed mintáztunk 17 populációból Magyarország területén 2020-ban (9. ábra, Herczeg és mtsai. 2023, 1. táblázat). Továbbá, 41 Wielstra és mtsai. (2018) által leközölt DNS-szekvenciával egészítettük ki az adatsorunkat, amelyek 41 különböző lokalitásról származtak. A szövetmintákból a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) segítségével vontuk ki a DNS-t, majd 1233 génszakaszt amplifikáltunk Molecular Inversion Probes (MIPs) módszert alkalmazva (Niedzicka és mtsai. 2016, Zieliński és mtsai. 2019). A szekvenálást Illumina MiSeq platformon végeztük, a Wielstra és mtsai. (2018) által publikált szekvenciák feldolgozásával megegyező protokollt használva, hogy az adatok együtt elemezhetőek legyenek. Ezután a 139 egyedhez tartozó fragmenteket referenciagenomokhoz illesztettük (Zieliński és mtsai. 2019). Az egyponos nukleotid-polimorfizmus eseteket a UnifiedGenotyper of GATK 3.6 (DePristo és mtsai. 2011, McKenna és mtsai. 2010) szoftverrel kerestük meg. Az adatok szűrése után (alacsony genotípus minőség, hiányzó adatok) a többi elemzést 58 populáció 138 egyedével végeztük.



9. ábra. *L. vulgaris vulgaris* és *L. v. ampelensis* mintavételi területei a Kárpát-Medencében. Fehér pontok mutatják az ismertetett tanulmány során gyűjtött lokalitásokat, fekete pontok jelzik a Wielstra és mtsai. (2018) tanulmány által mintázott lokalitásokat. A mintavételi helyek sorszáma megegyezik a Herczeg és mtsai. 2023, S1 táblázatában foglaltakkal. A bal felső sarokban elhelyezett kép a mintaterület elhelyezkedését és a faj elterjedését (szürke folt) mutatja Európán belül (AmphibiaWeb 2025), a jobb oldali sarkokban pedig a pettyes göte hím (fent) és nőstény (lent) példányának grafikáját láthatjuk (Zsoldos Márton).

A populációszerkezet elemzése

A genetikai változatosság vizsgálatához először főkomponens-elemzést alkalmaztunk a Plink 1.9 csomag használatával (Chang és mtsai. 2015). Ezután az ADMIXTURE szoftverrel (Alexander és mtsai. 2009) megbecsültük a minták genetikai származását. A cross-validation módszert használva (Alexander & Lange 2011) térképeztük fel az ősi (ancestral) populációk számát, illetve ugyan ez a módszer megadta az ős-populációk közötti F_{ST} értékeket is. A populációnkénti genetikai származás átlagos értékeket kördiagramok formájában ábrázoltuk. A térképeket QGIS 3.16 (QGIS, 2021) segítségével rajzoltuk. A várható heterozigótaságot (H_e) Arlequin 3.5 szoftverrel (Excoffier & Lischer, 2010) számoltunk. A H_e értékek elterjedését egy hőtérképen ábrázoltuk. Végül, a genetikai vonalak filogenetikai kapcsolatát szemléltetve az F_{ST} genetikai távolságmátrix felhasználásával egy gyökér nélküli filogenetikai fát építettünk a neighbour-joining módszert alkalmazva a MEGA szoftver (Tamura és mtsai. 2021) használatával.

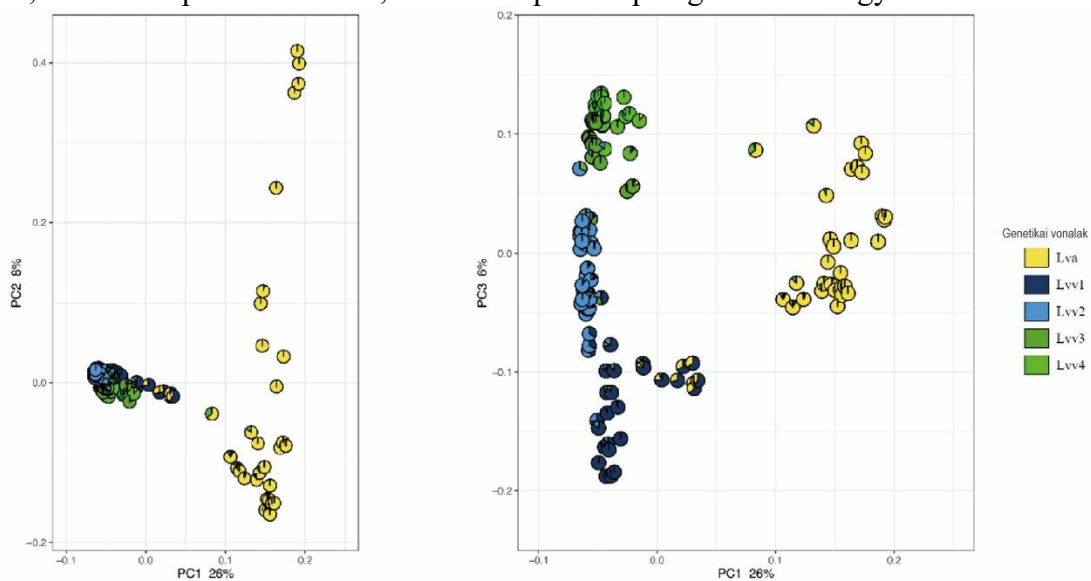
A folyók, mint földrajzi akadályok

Ahhoz, hogy megállapítsuk, vajon a Duna- és Tisza-folyók földrajzi akadályt jelentenek-e a gótéak számára, először az F_{ST} értékek és a földrajzi távolságok kapcsolatát vizsgáltuk meg a Duna és a Tisza egyik és másik partján található populációkban. Utána különböző színekkel jelöltük a folyó ugyanazon oldaláról vagy különböző oldaláról származó minták páronkénti összehasonlításait Bradburd és mtsai. (2013) javaslatait követve. Ezután egy 'Bayesian Estimation of Differentiation in Alleles by Spatial Structure and Local Ecology (BEDASSLE) elemzést végeztünk a 'BEDASSLE' R csomagot használva (Bradburd és mtsai. 2013). A BEDASSLE elemzés a genetikai adatok (esetünkben a random kiválasztott SNP/MIP-fragment), mintaszámok, földrajzi adottságot és ökológiai paraméterek különbözőségi mátrixát figyelembe véve keresi a kapcsolatot a környezeti változók (pl. esetünkben a Duna és Tisza) és a földrajzi távolságok között. A BEDASSLE modell azt feltételezi, hogy a populációk migráció-sodródás egyensúlyban vannak, és az allélok jelenléte/hiánya modellezhető a földrajzi távolságok alapján (Bradburd és mtsai. 2013) (a futási modellek ábráit lást Herczeg és mtsai. 2023, S2A és S2B ábrák).

Eredmények

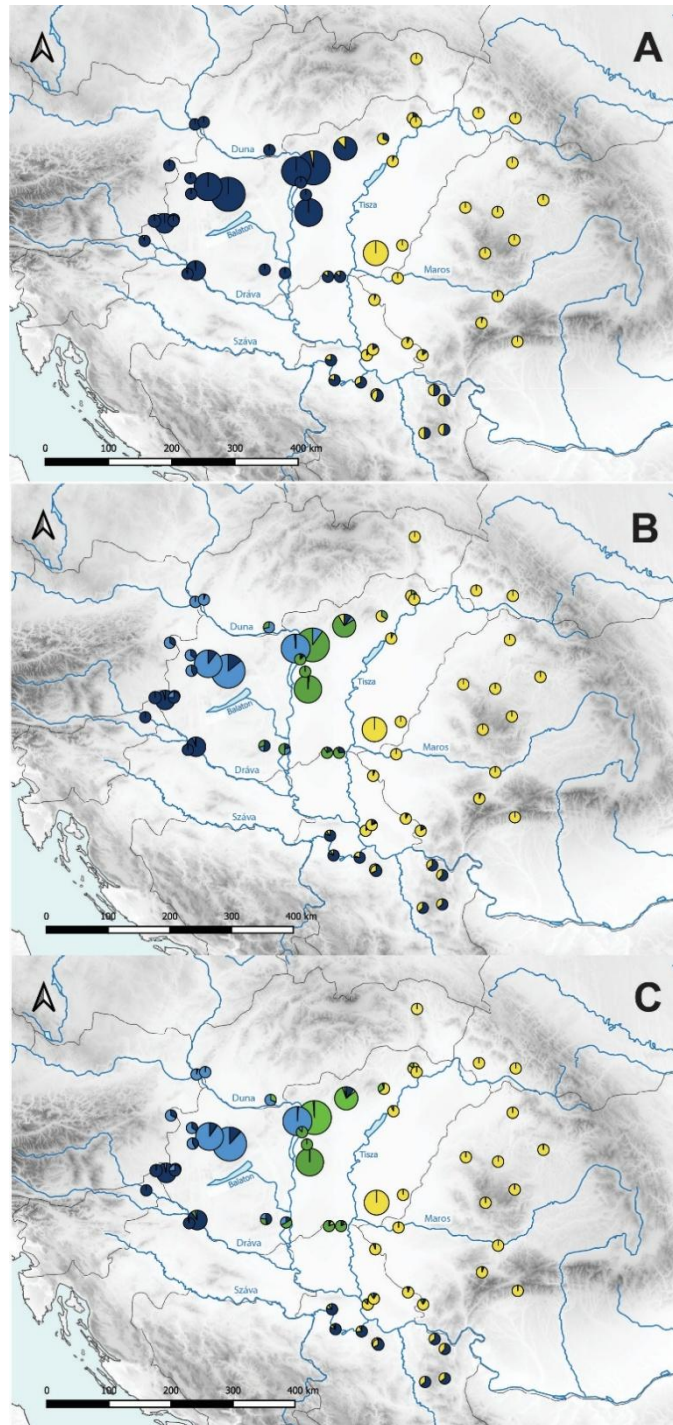
Populációszerkezet

A főkomponens-elemzés eredményét a 10. ábra mutatja be. Az első főkomponens a variancia 26%-át, a 2. főkomponens a 8%-át, a 3. főkomponens pedig a 6%-át magyarázta.



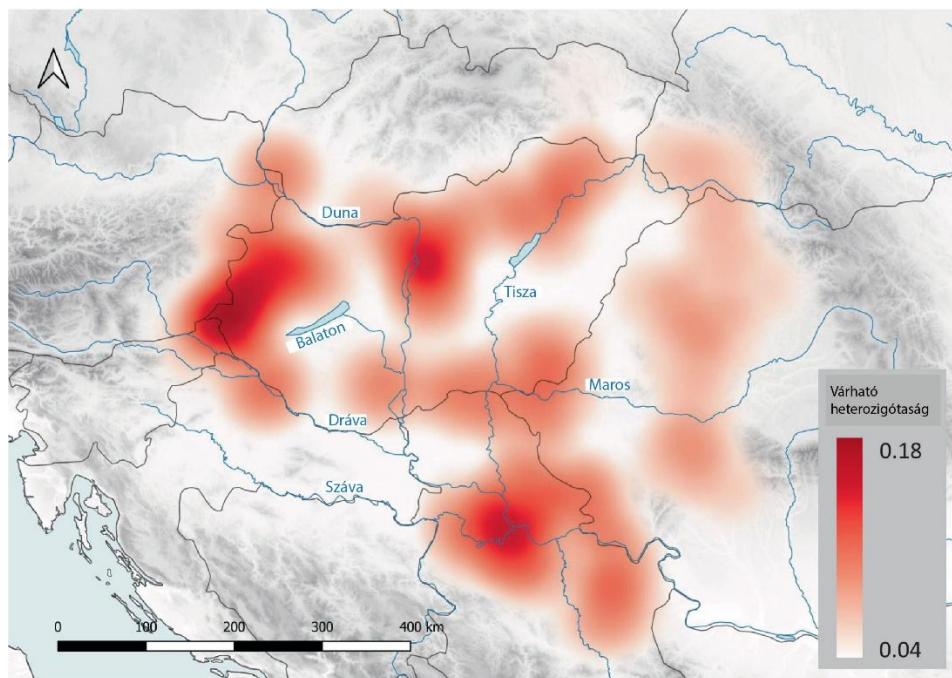
10. ábra. A PCA-elemzés eredménye. A kördiagramok az egyedek genetikai keveredését mutatja. A bal oldali ábra a PC1 és PC2 főkomponensek viszonyát, a jobb oldali ábra a PC1 és PC3 főkomponensek viszonyát mutatja. Lva = *Lissotriton vulgaris ampelensis*; Lvv1-Lvv4 = *L. v. vulgaris* 1-4 klaszterek.

Az ADMIXTURE elemzés négy fő klasztert támogatott, azonban a 2-5 klaszter közötti különbség minimális volt (0,352-0,368). A 2-klaszter elkülönítés a déli *L. v. vulgaris* és a *L. v. ampelensis* alfajoknak/genetikai vonalnak felelt meg. A klaszterszám növekedésével a *L. v. ampelensis* szerkezete nem változott, míg a déli *L. v. vulgaris* vonal 2-4 (Lv1-4) további klaszterre oszlott (11A-11C ábra), amit a minták PC1-PC3 közötti eloszlása is alátámasztott (10. ábra). Míg a PC1 a két genetikai vonal közötti szétválást mutatta, a PC3 a déli *L. v. vulgaris* klaszterek közötti eltéréseket fejezte ki jobban. A déli *L. v. vulgaris* vonal és a *L. v. ampelensis*, valamint a déli *L. v. vulgaris* vonal szubklaszterei között keveredés mutatható ki (10. és 11B és C ábrák).

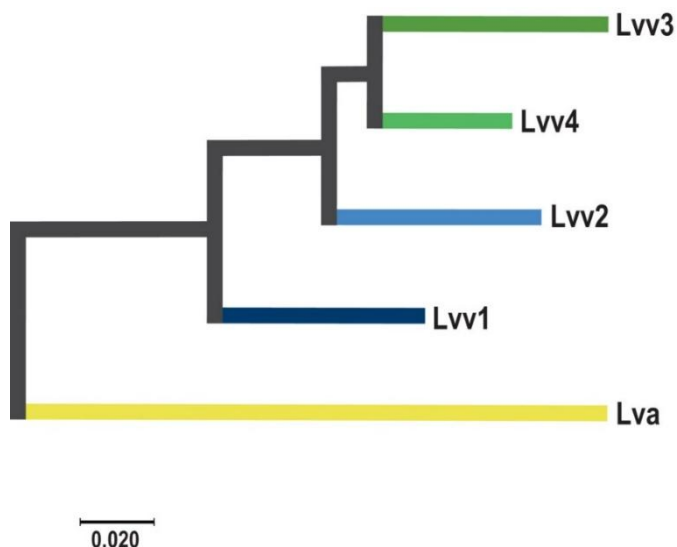


11. ábra. Az ADMIXTURE-elemzés eredményei $K=2$ (a), $K=4$ (b) and $K=5$ (c) esetén. Minden szín egy klasztert jelöl. A kördiagramok mérete a populáció méretével korrelál. Lva = *Lissotriton vulgaris ampelensis*; Lv1-Lv4 = *L. v. vulgaris* 1-4 klaszterek. A genetikai vonalak és a színek megegyeznek a 10. ábrán láthatókkal.

Az F-statisztika jelentős eltérést (0,266) mutatott a *L. v. ampelensis* és a déli *L. v. vulgaris* vonalak, valamint az *L. v. ampelensis* és mind a négy déli *L. v. vulgaris* (Lvv1-4) klaszter között (0,266-0,31). A déli *L. v. vulgaris* vonal klaszterei között alacsonyabb differenciáltságot találtunk (0,103-0,157), az Lvv1 klaszter különbözött a leginkább a többitől (0,133-0,157; lásd Herczeg és mtsai. 2023 1. táblázat). A várható heterozigótaság (He) 0,04 (21. lelőhely, Lva) és 0,17 (35. lelőhely, Lva) között változott, átlaga 0,13 (SD = 0,02), mediánja 0,14 volt (12. ábra, Herczeg és mtsai. 2023, S1 ábra). A legalacsonyabb He értéket a 21. lelőhelyen valószínűleg a hiányzó genotípusok magas száma (52%) okozhatta. A populációk közötti különbségek a He tekintetében alacsonyak voltak (Herczeg és mtsai. 2023, S1. ábra). Az eloszlásának azonban egyértelmű földrajzi mintázata volt, ahogyan azt a hőtésképen is láthatjuk (12. ábra). A déli *L. v. vulgaris* vonal négy klasztere közötti genetikai távolság pedig azt mutatja, hogy nagy valószínűséggel az Lvv1 klaszter képviseli a legkorábban leágazó genetikai vonalat, és hogy az Lvv2, Lvv3 és Lvv4 klaszterek nagyjából egy időben differenciálódtak (13. ábra).



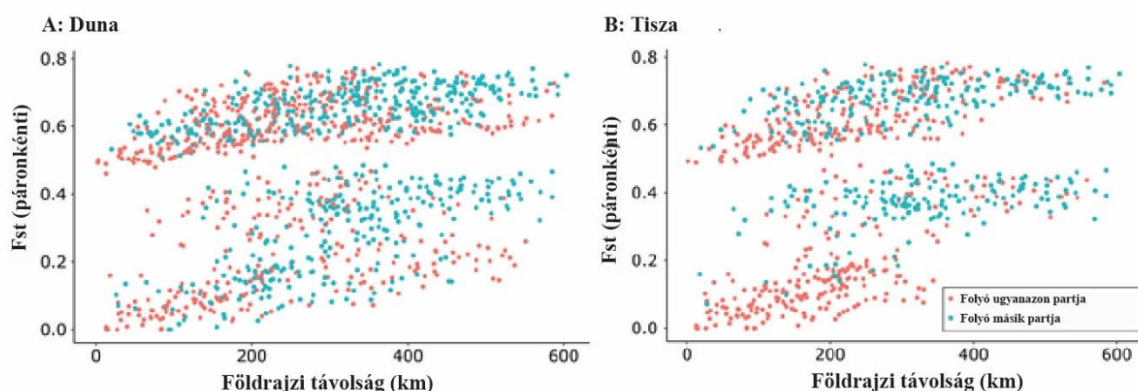
12. ábra. A kárpát-medencei *L. vulgaris* populációk genetikai diverzitását bemutató, a várható heterozigótaságot ábrázoló hőtéskép.



13. ábra. Gyökér nélküli, genetikai távolságon alapuló fa a *Lissotriton vulgaris ampelensis* (Lva) és a *L. v. vulgaris* (Lvv1–Lvv4) vonalak és klaszterek rokonsági viszonyainak szemléltetésére.

A folyók földrajzi akadály-hatásának vizsgálata

Összességében a Duna azonos oldalán lévő populációk páronkénti összehasonlítása hasonló F_{ST} értéket adott a Duna ellentétes oldalán lévő populációk páronkénti F_{ST} értékei-hez (14A ábra). Úgy tűnik azonban, hogy a földrajzi távolság hatása a Duna ellentétes oldalán fekvő minták esetében viszonylag magas páros F_{ST} értékeket eredményezett (a grafikon jobb felső részén több türkizkék pont található, mint rózsaszínű; 14A ábra). Ez a hatás a Tisza esetében még erősebbnek tűnik (14B ábra), mivel a Tisza azonos oldalán lévő populációk (rózsaszín) viszonylag alacsony F_{ST} értékkel rendelkeznek, de a Tisza azonos oldalán olyan populációk is vannak, amelyek magas páros F_{ST} értékekkel rendelkeznek, hasonlóan a folyó ellentétes oldalán lévő populációkhoz (türkiz) (14B ábra).



14. ábra. (a) Páronkénti F_{ST} értékek és a földrajzi távolságok (km) közötti korreláció, a Duna egyazon oldalán (rózsaszín) és két különböző oldalán (türkizkék) található populációk esetében és (b) páronkénti F_{ST} értékek és a földrajzi távolságok (km) közötti korreláció, a Tisza egyazon oldalán (rózsaszín) és két különböző oldalán (türkizkék) található populációk esetében.

A BEDASSLE-elemzés eredményei azt mutatják, hogy a Duna, mint akadály csak kis mértékben okozza a populációk szétválását, míg a Tisza esetében ez jóval jelentősebb. A modell eredményei szerint a Tisza-folyó ellentétes oldalán való elhelyezkedés a *L. vulgaris* populációk esetében ~3000 km távolságnak felel meg, jóllehet a populációk közötti valós földrajzi távolság mediánja 279 km (2. táblázat).

Prediktor változó	Átlagos földrajzi távolság (km; 95% CI)
Duna	21.3 (0.01–68.47)
Tisza	3016.7 (1385.6–4809.0)

2. táblázat. A populációk folyókhoz (Duna és Tisza) képest viszonyított földrajzi elhelyezkedésének „prediktor változó hatásméretei” (effect sizes for the predictor variables).

Diszkusszió

Pettyes göte alfajok és genetikai vonalak elterjedése és populációstruktúrája a Kárpát-medencében

Tanulmányunkban Wielstra és munkatársaihoz (2018) hasonlóan kimutattuk a Dunántúlon és a Duna-Tisza közén elterjedt déli *L. v. vulgaris* genetikai vonal elterjedését, és megerősítettük a Kárpát-medence keleti részén élő *L. v. ampelensis* alfaj jelenlétét. A Kárpátok Romániától Szlovákiáig tartó peremén a *L. v. ampelensis* elterjedése átfed a közelrokon *L. montandoni*-val, ami a két faj hibridizációjához vezet (Babik és mtsai. 2005, Zieliński és mtsai. 2013). Leírták már a régióban a *L. v. ampelensis* és az északi *L. v. vulgaris* vonal illetve a *L. montandoni* közötti génáramlást (Pabijan és mtsai. 2017, Zieliński és mtsai. 2016) is. Genomikai módszerekkel mi a *L. v. ampelensis* és a déli *L. v. vulgaris* vonal közötti keveredést észleltük, ami megerősíti a közép-európai pettyes götepopulációk komplex genetikai szerkezetét.

A pettyes göté, hasonlóan az európai fauna sok eleméhez, a Balkán-félszigeten elhelyezkedő refúgiumterületen élhették túl az utolsó jégkorszak alatti eljegesedési időszakot (Babik és mtsai. 2005, Pabijan és mtsai. 2015). Ennek megfelelően ezen a területen találták a *L. vulgaris* fajon belüli legmagasabb genetikai változatosságot is (Pabijan és mtsai. 2015). Tanulmányunk jelentős genetikai változatosságot mutatott ki a kárpát-medencei pettyes göte populációkban is, főként az Északi-középhegységben, az ország déli peremén a Dráva, a Duna és a Tisza mentén, valamint a Száva, a Duna és a Tisza összefolyásánál. Ez a mintázat arra utalhat, hogy a pettyes göte esetében nem zárható ki egy vagy két kisebb kiterjedésű, északi refúgiumterület a Kárpát-medence érintett részein. Az Északi-középhegység refúgium-szerepe felmerült már a hasonló elterjedésű foltos szalamandra (*Salamandra salamandra*) esetében (Vörös és mtsai. 2016b), míg a három folyó összefolyásánál a dunai tarajosgöte (*Triturus dobrogicus*) mutatott hasonlóan magas genetikai változatosságot (Vörös és mtsai. 2016a).

A földrajzi elemek szerepe a *L. vulgaris* populációszerkezetének kialakulásában

Sokáig úgy vélték, hogy a pettyes göte korlátozott (50-182 m) terjedési képességgel rendelkezik (Bell 1977, Dolmen 1981), azonban a legújabb vizsgálatok szerint az egyedek nagyobb, akár 2 km-es távot is megtehetnek (Schmidt és mtsai. 2006, Tóth és mtsai. 2021). A nőstények ráadásul általában visszatérnek azokba a víztestekbe petézni, ahol ők maguk is születtek (Bell 1977). Így a szárazföldön való korlátozott terjedési képesség, a szaporodóhelyekhez való hűség, és ami a legfontosabb, az áramló vízzel járó élőhelyek kerülése (Löhmus & Linnamägi 2012) korlátozhatja a pettyes göté genetikai vonalainak elterjedését.

Eredményeink azt mutatják továbbá, hogy a Tisza jelentősen korlátozza a *L. v. ampelensis* nyugat felé történő elterjedését és a *L. v. vulgaris* déli vonalának kelet felé terjedését. A Dél-Dunántúlon (Lvv1), az Észak-Dunántúlon (Lvv2) és a Duna-Tisza közén (Lvv3 és Lvv4) elterülő négy déli *L. v. vulgaris* csoport jelenléte azt mutatja, hogy a nagyobb földrajzi objektumok - mint például a Duna vagy a Balaton - a *L. vulgaris* populációszerkezetét is alakíthatják a Kárpát-medencében. A két fő folyónk közötti terület (az Alföldtől Észak-Szerbia felé), a dunai tarajosgötéhez (*T. dobrogicus*) hasonlóan (Vörös és Arntzen 2010, Vörös és mtsai. 2016a) a genetikai vonalak kontaktónjaként szolgál (egy nagyjából 400 km hosszú szakaszon), annyi különbséggel, hogy mivel a dunai tarajosgöte előfordul a folyókban is, a kevésbé szabályozott Tisza, főként áradáskor, nem jelent olyan szigorú akadályt a göté diszperziójában, mint a pettyes göte esetében.

2.2. Hegyvidéki fajok

2.2.1. Az alpesi göte (*Ichthyosaura alpestris*) filogeográfiája és intraspecifikus taxonómiája
Az alpesi göte (*Ichthyosaura alpestris* (Laurenti, 1768), Caudata: Salamandridae) (15. ábra) széles elterjedésű faj Európa mérsékelt égövi és mediterrán régióiban, és jelentős morfológiai és ökológiai változatosságot mutat (Andreone & Triepi 2006, Recuero & Martínez-Solano 2002, Roček és mtsai. 2003, Sotiropoulos és mtsai. 2008). Sokáig vitatott volt egyes, gyakran elszigetelt populációk taxonómiai státusza, ráadásul morfológiai (testarányok és színezet) vagy életmódbeli jellemzők alapján számos kétes érvényességű alfajt írtak le (pl. Dely 1959, Dubois & Raffaëlli 2009, Herrero & Arano 1986, Lužnik és mtsai. 2011, Speybroeck és mtsai. 2010, 2020, Zuiderwijk 1997). A molekuláris technológiák fejlődésével azonban a multilókusz vizsgálatok segítettek tisztázni a faj evolúciós történetét és filogeográfiáját. Sotiropoulos és munkatársai (2007) mtDNS-adatok felhasználásával öt kládot (A-E) határoztak meg, amelyek három, egymástól erősen eltérő genetikai vonalra válnak szét (a Balkán egy kis területére korlátozó Vlaşina vonal, egy nagyon változatos keleti vonal, amely a Balkán-félsziget többi részéből származó mintákat tartalmaz, valamint egy genetikailag homogénebb nyugati vonal, amely Délnyugat- és Közép-Európa populációit foglalja magában). Ezeket az eredményeket Recuero és mtsai. (2014) finomították és részben megerősítették egy időben kalibrált multilókusz filogenetikai tanulmánnyal. Ez a tanulmány kimutatta, hogy a vlašini mtDNS-vonal a nukleáris DNS alapján nem különül el jelentősen, és négy fő vonalat határolt le, amelyek némileg ellentmondásban vannak néhány korábban leírt alfaj taxonómiai státuszával (*I. a. veluchiensis* (Wolterstorff, 1935) Görögországban, *I. a. reiseri* (Werner, 1902) és *I. a. montenegrina* (Radovanovic, 1951) Kelet-Európában és a Balkánon, *I. a. apuana* (Bonaparte, 1839) + *I. a. inexpectata* (Dubois & Breuil, 1983) az Appenini-félszigeten és *I. a. alpestris* + *I. a. cyreni* (Wolterstorff, 1932) Nyugat- és Közép-Európában és Észak-Spanyolországban (17. ábra.). A faj evolúciós történetének főbb eseményei Recuero és mtsai. (2014) szerint a következők voltak: 1) a nyugati és keleti vonalak a késő miocénben a Paratethys-tenger szintjének változásait követve váltak szét, 2) a miocén és pliocén magasabb hőmérsékletű időszakokban, helyi izolációs események következtében további parapatikus szétágazások alakultak ki, és 3) a pleisztocén glaciális ciklusai során helyi kihalások, újbóli benépesítések, másodlagos kontaktok alakították tovább a populációk elterjedését.

Míg az *I. alpestris* a környező Alpokban és Kárpátokban gyakori, addig a Kárpát-medencében a megfelelő élőhelyek hiánya miatt csak szórványosan fordul elő. A Kárpát-medence egyes populációi a folyamatosan elterjedt alpesi és kárpáti populációkkal szemben marginálisnak tekinthetők (Őrség, Zempléni-hegység), míg a többi populáció (Bakony, Mátra és Bükk, valamint a Bihar-hegység Romániában) földrajzilag elszigeteltnek számít (16. és 18. ábra).

Az alpesi göte kárpát-medencei szórványos előfordulásának rendszertani vonatkozását Dely Olivér vizsgálta részletesebben. Munkái során 26 morfometriai és 24 csonttani jellemzőt figyelembe véve leírta a *Triturus alpestris bukkiensis*-t a Bükk-hegységből, a *T. a. satoriensis*-t a Zempléni-hegységből (Dely 1959), a *T. a. carpathicus*-t a Déli-Kárpátokból Romániában (Dely 1959), és a *T. a. bakonyiensis*-t a Bakonyi-hegységből (Dely 1964). A négy alfaj közül három (*bukkiensis*, *satoriensis* és *carpathicus*) érvényességét több szerző módszertani okokra hivatkozva elutasította (Roček 1974, Denoël 1994, Raffaëlli 2018). Az 1964-ben Dely disszertációjában, majd 1967-ben a Fauna Hungariae könyvsorozatban (csak magyar nyelven) külön leírt *T. a. bakonyiensis* státusza azonban továbbra is bizonytalan maradt.

Mivel a korábbi filogeográfiai munkák (Recuero és mtsai. 2014, Sotiropoulos és mtsai. 2007) nem vizsgálták a Kárpát-medencében előforduló állományokat behatóbban (amely kulcsfontosságú régió lehet a faj evolúciós története szempontjából), jelen tanulmányunk fő célja volt: 1) az *Ichthyosaura alpestris* genetikai változatosságának feltárása a Kárpát-medencében mitokondriális markerek felhasználásával; 2) ismert mtDNS-vonalakhoz rendelni az általunk vizsgált populációk szekvenciáit és ennek segítségével következtetni a faj evolúciós történetére a közép-kelet-európai régióban; és 3) az új genetikai adatok fényében felülvizsgálni a faj morfológiai alapú intraspecifikus rendszertanát.



15. ábra. *Ichthyosaura alpestris bakonyiensis* Vörös, 2022 hím példánya. Fotó: Vörös Judit.

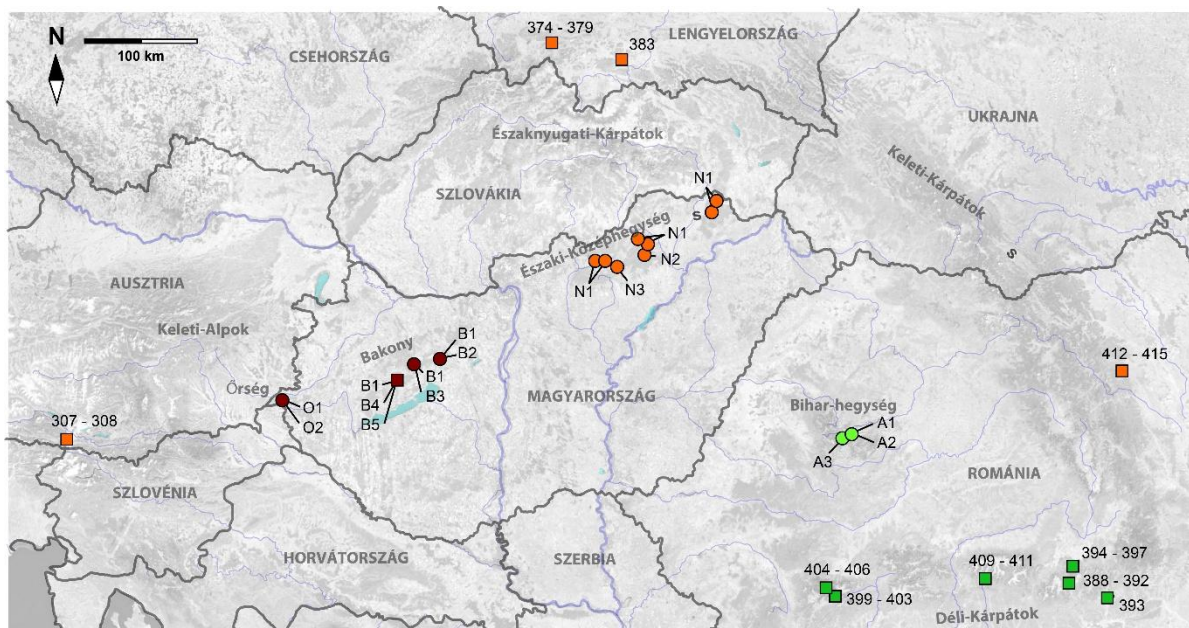
Módszerek

A Kárpát-medence 6 régiójában (Őrség, Bakony, Mátra, Bükk és Zemplén Magyarországon, és Bihar-hegység Romániában) 13 településről 24 egyedből gyűjtöttünk szövetmintákat 2010-2012 között a faj szaporodási időszakában (16. ábra, Vörös és mtsai. 2021, S1. táblázat). A szövetmintákat 96%-os etanolba helyeztük és a feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A teljes genomi DNS-t a DNeasy Blood&Tissue Kit segítségével nyertük ki a gyártó protokolljait követve (Qiagen, Hilden, Németország). Két mitokondriális génszakaszt amplifikáltunk: a riboszomális 16s RNS gén (16S) 562 bp hosszú részleges szakaszát a 16Sar-16Sbr primer párokkal (Palumbi és mtsai. 1991) és a mitokondriális NADH-dehidrogenáz 4 gén (ND4) 689 bp hosszú szakaszát, beleértve a szomszédos tRNS-ek (Ile, Leu és részben Met) 191 bp hosszú szakaszát az ND4-Leu primer párokkal (Arévalo és mtsai. 1994). A PCR és a szekvenálás részletes leírását lást Vörös és mtsai. 2021, 179. oldal.

A szekvenciákat a COLLAPSE 1.2 (Posada 2011) szoftver segítségével haplotípusokká vontuk össze. Ezeket a CLUSTALW (Chenna és mtsai. 2003) programban igazítottuk egymáshoz. Az általunk létrehozott szekvenciákat a korábban publikált, különböző mtDNS-vonalakból származó, átfedő *I. alpestris*-szekvenciákkal együtt elemeztük, lefedve a faj teljes elterjedési területét (összesen 136 példány, 54 haplotípus; Recuero és mtsai. 2014). Az ND4 szekvenciák tökéletesen illeszkedtek, inzerciók és deléciók nélkül. A tRNS-szekvenciák illesztési bizonytalansága miatt az elemzésekben az adathalmazból csak 1431 bp hosszú szakaszt használtunk fel.

A kárpát-medencei minták esetében a DNASP 5.0 (Librado és Rozas 2009) segítségével a teljes mtDNS-adatállományra standard diverzitási indexeket (haplotípus-diverzitás és nukleotid-diverzitás π) számoltunk. A Kárpát-medencei mtDNS-haplotípusok közötti kapcsolatokat a POPART 1.7 szoftver (<http://popart.otago.ac.nz>) segítségével medián-összevonó (median-joining) haplotípus-hálózattal (Bandelt és mtsai. 1999) jelenítettük meg.

Az alfajok/evolúciós vonalak közötti evolúciós divergenciát a MEGA 6.0 szoftverrel becsültük (Tamura és mtsai. 2013). Az elemzés 147 nukleotid szekvenciát érintett. A 95%-nál kisebb lefedettségű pozíciókat kizártuk. Vagyis 5%-nál kevesebb illesztési hézag, hiányzó adat és kétértelmű bázis bármely pozícióban megengedett volt. A végleges adathalmazban összesen 1417 pozíció szerepelt.



16. ábra. Mintavételi helyek és haplotípusok a Kárpát-medencében és környékén. Az általunk gyűjtött mintákat körökkel és haplotípus-kódokkal jelöltük, a korábban már leközölt mintákat négyzettel jelentettük meg és a Recuero és mtsai. (2014) publikációban található azonosító kódokat írtuk mellé. A színek különböző mtDNS-vonalakat jelölnek (lásd 17. és 18. ábra).

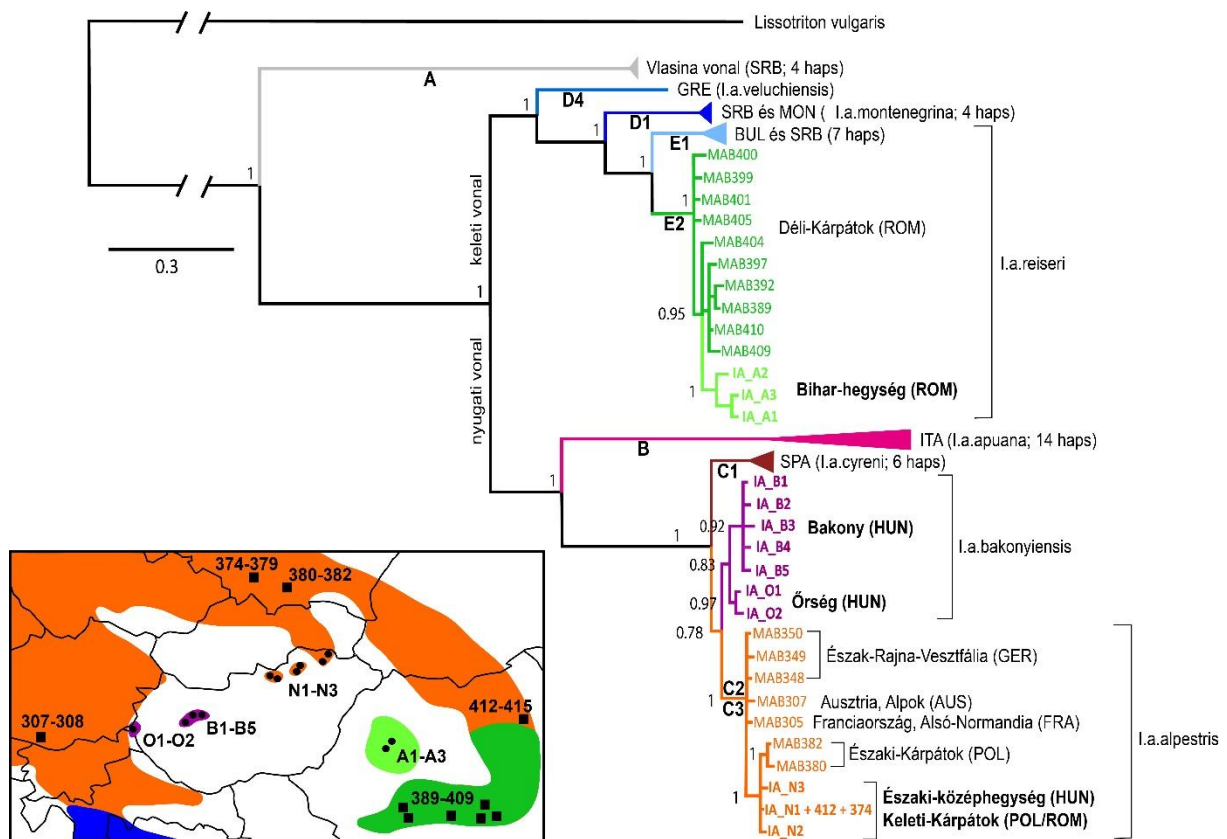
A filogenetikai kapcsolatokra egy Bayes-féle (BI) filogram építésével (MRBAYES 3.1 - Ronquist és Huelsenbeck 2003) következtettünk. Kulcsoportnak a *Lissotriton vulgaris* fajt választottuk (Telkibánya, Zempléni-hegység, 48,45 É, 21,35 K). A filogenetikai elemzések részleteit lásd Vörös és mtsai. 2021, 180-181. oldalak.

Eredmények

Összesen 13 haplotípust találtunk a hat mintavételi helyről származó szekvenciák között (11 a mi mintáinkból, további kettő Recuero és mtsai. 2014-ből; 16. ábra, Vörös és mtsai. 2021, S1. táblázat). Az újonnan talált haplotípus-szekvenciákat az NCBI GenBankban helyeztük el. A haplotípusok összetétele és változatossága jelentősen különbözött az egyes régiókban.

A Kárpát-medence nyugati részén élő populációk erősen változatosnak bizonyultak (2 haplotípus 3 őrési mintából és 5 haplotípus 14 bakonyi mintából), míg az Északi-középhegységből származó mintákban csak három, egymástól alig különböző haplotípus volt jelen. Két egyedi haplotípust találtunk ebben a régióban (N2 a Bükk-hegységben és N3 a Mátrában; 17. ábra). A Bihar-hegység populációja igen változatos volt (3 haplotípus 3 egyedben, amelyek közül az egyik 6 szubsztitúcióval különbözött a többitől; 18. ábra). A földrajzi régiók nem osztoztak haplotípusban. A diverzitási mutatókra vonatkozó részletesebb adatokat lásd a 3. táblázatban). Az alfajok/evolúciós vonalak közötti genetikai távolságokat a 4. táblázat mutatja.

Földrajzi közelségük ellenére a Kárpát-medencei alpesi gőtepopulációk két különböző mitokondriális vonalat képviselnek. Az északi-középhegységi populációk (Mátra, Bükk és Zemplén) közeli rokonságban állnak egymással, és a nyugati vonalhoz sorolhatók (C3 mtDNS-szubklád mind Sotipoulos és mtsai. 2007-ben, mind Recuero és mtsai. 2014-ben; 17. ábra), többségük ugyanazt az N1 haplotípust viseli, mint az ÉK-Kárpátokban (Lengyelország és Románia; 18. ábra) talált egyes egyedek. A Bakony és az Őrség haplotípusai külön kládot alkottak a nyugati vonalon belül (C2-C3 szubklád; 17. ábra), és 11-18 szubsztitúcióval különböztek az Alpokban és az ÉK-Kárpátokban talált mintáktól (18. ábra). A Bihar-hegységből származó gőté a keleti vonalhoz (E2 alvonal) tartoznak, de ezen a vonalon belül külön kládot alkotnak (17. ábra), amely 7-10 szubsztitúcióval különbözik a Déli-Kárpátokban talált haplotípusoktól (18. ábra). Nem találtunk bizonyítékot az alpesi gőte két fő keleti és nyugati vonala közötti keveredésre.



17. ábra. A kombinált mtDNS-haplotípusok Bayes-féle filogramja a Kárpát-medencében és környékén. Beékelte térkép: az *Ichthyosaura alpestris* elterjedése Közép-Európában. A színek a különböző mtDNS-vonalakat jelölik (Recuero és mtsai. 2014 alapján). A filogramon a fő mtDNS-vonalak Sotiropoulos és mtsai. (2007) kódolását követik (A-E2). Az alfaji besorolások Recuero és mtsai. (2014) tanulmányát és a saját eredményeinket tükrözik. Az elágazásoknál a Bayes-féle utólagos valószínűségi értékek láthatóak.

Diskusszió

Átmeneti biogeográfiai helyzetéből adódóan a Kárpát-medence Európa egyik legnagyobb biológiai sokféleséggel rendelkező régiója (Varga 2010, 2019, Williams és mtsai. 1999). Míg a Dunántúl nyugati és délnyugati részén pannon, illír és alpesi hatások, addig északkeleti peremén pannon, kárpáti és dácikus hatások fedik át egymást, és különböző mediterrán elemek (pontomediterrán, balkáni és anatóliai) gazdagítják a magyar középhegység alacsonyán fekvő területeit (Varga 1995).

Az alpesi göte evolúciós története a Kárpát-medence gazdag biogeográfiai történetéről tanúskodik: három különböző mitokondriális vonal találkozik ebben a régióban, és nagyfokú genetikai változatosságot mutat. Az *Ichthyosaura alpestris* fő nyugati vonalához két vonal kapcsolódik: az egyik az Északi-középhegységben, a másik a Bakony-hegység és az Órség területén. Emellett egy harmadik, a keleti vonalhoz kapcsolódó vonal is jelen van a Bihar-hegységben. Hasonló mintázat fedezhető fel több, a Kárpát-medencében élő faj esetében. Kelet-nyugati genetikai szétválást dokumentáltak például a *Bombina variegata* és a *Salamandra salamandra* alpesi és kárpáti vonalaiban (Vörös és mtsai. 2006; Vörös és mtsai. 2016b), a Dunántúlon és az Északi-középhegységben élő *Anguis fragilis* és *A. colchica* (Szabó és Vörös 2014), valamint a *Vipera berus* kárpáti és balkáni kládjában (Ursenbacher és mtsai. 2006). A genetikai differenciálódás hasonló mintázatáról számoltak be egyes lepkefajok esetében is a Kárpát-medencében. A délnyugati (dunántúli) és az északkeleti, (szub)kárpáti populációk közötti jelentős genetikai távolságot megfigyelték például a *Parnassius mnemosyne* (Pecsenye és mtsai. 2015), a *Phengaris nausithous* (Hollós és mtsai. 2012) és az *Erebia medusa* (Schmitt & Seitz 2001) esetében. Az Órség és a Bakony-hegység populációi közötti differenciálódást találtak az *Euphydryas aurinia* populációiban is (Pecsenye és mtsai. 2018); mindkét populáció az európai populációkon belül egy, az Erdélyiektől erősen differenciált alkíladot alkot.

Recuero és mtsai. (2014) feltételezése szerint az *Ichthyosaura alpestris* őse már a késő miocénben elterjedt volt. A Paratethys-tenger szintjének oszcillációi elősegíthették a két fő vonal szétválását a tortonai korszakban (11,6-7,2 Ma): a keleti vonal a Balkánon, a nyugati vonal pedig az Alpokban. A Kárpát-medencét a két *I. alpestris* vonal két fő útvonalon népesítette be: a nyugati vonal az Alpokból a Dunántúlra és az Északkeleti-Kárpátoktól az Északi-középhegységre, a keleti vonal pedig a Déli-Kárpátok felől a Bihar-hegységet kolonizálta.

Haplotípus	Bihar	Bakony	Őrség	ÉKH	ÉNY Kárpátok*	Déli Kárpátok*	Genbank 16s and ND4
IA_A1	1	-	-	-	-	-	MW685537, MW685550
IA_A2	1	-	-	-	-	-	MW685538, MW685551
IA_A3	1	-	-	-	-	-	MW685539, MW685552
IA_B1	-	7	-	-	-	-	MW685540, MW685553
IA_B2	-	3	-	-	-	-	MW685541, MW685554
IA_B3	-	1	-	-	-	-	MW685542, MW685555
IA_B4	-	2	-	-	-	-	MW685543, MW685556
IA_B5	-	1	-	-	-	-	MW685544, MW685557
IA_O1	-	-	2	-	-	-	MW685545, MW685558
IA_O2	-	-	1	-	-	-	MW685546, MW685559
IA_N1	-	-	-	7	10	-	MW685547, MW685560
IA_N2	-	-	-	1	-	-	MW685548, MW685561
IA_N3	-	-	-	1	-	-	MW685549, MW685562
N	3	14	3	9	10	20	
Hapl. N.	3	5	2	3	1	10	
Polim. poz.	7	5	1	2	0	12	
H	1 (0.27)	0.72 (0.1)	0.67 (0.31)	0.41 (0.19)	0	0.82 (0.08)	
$\pi * 10^{-2}$	0.32 (0.00)	0.074 (0.02)	0.05 (0.02)	0.031 (0.02)	0	0.15 (0.02)	
$\Theta * 10^{-2}$	0.32 (0.22)	0.11 (0.06)	0.05 (0.00)	0.052 (0.04)	0	0.23 (0.1)	

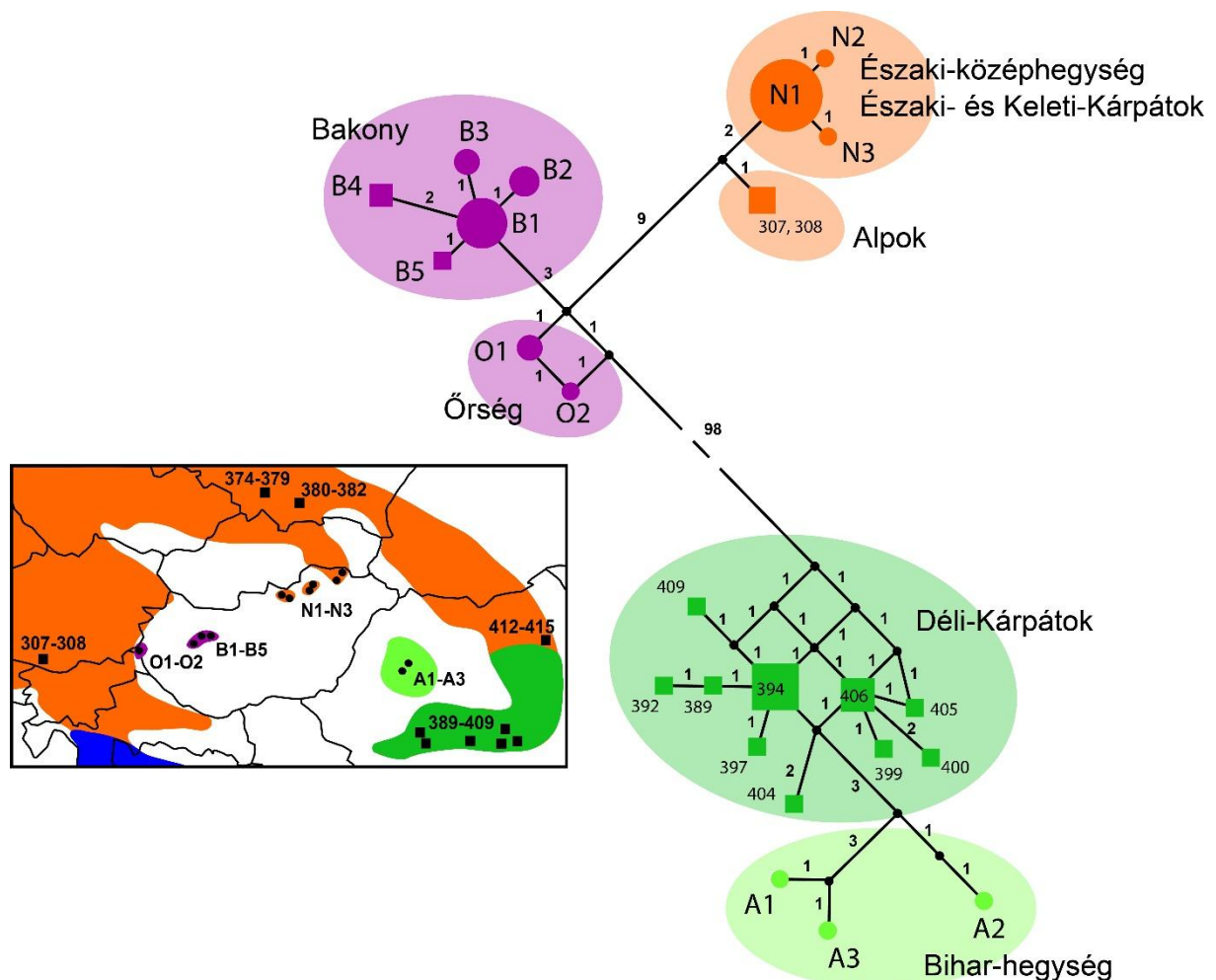
3. táblázat. A Kárpát-medence és környéke alpesi gőtepopulációiban talált mtDNS haplotípusok GenBank azonosítóikkal (16s és ND4), variábilis pozíciók, polimorf pozíciók száma és diverzitási indexek (géndiverzitás átlagos és standard hibaértékekkel **H**, nukleotid diverzitás π , és populációk átlagos nukleotid diverzitása Θ). A Recuero és mtsai. (2014) által mintázott populációkat csillaggal jelöltük.

A miocén és pliocén idején Európában tapasztalt magasabb hőmérséklet valószínűleg elősegítette a populációk különböző hegyvonulatokba való elszigetelődését, és a pleisztocén jégkorszakok során a különböző genetikai vonalak elterjedési területe tovább változott. A Kárpát-medence a késő-pleisztocén során kriptikus refúgiumokat biztosíthatott az alpesi gőtepopulációknak a hideg kontinentális erdőssztyepp-tájakon (Willis és mtsai. 1997, Willis és Andel 2004, Varga 2010, Schmitt és Varga 2012). Ezt a Bakony-hegység és az Őrség területéről származó populációk magas haplotípus-diverzitása és genetikai elkülönülése is alátámaszt az *I. a. alpestris* nyugati vonalának többi részéhez képest. Arano és Arntzen (1987) 35 lókuszt segítségével vizsgálta az *I. alpestris* alfajokon belüli populációk közötti genetikai differenciálódást és evolúciós kapcsolatokat. Négy mintát használtak a Bakony-hegységből (Ajka), amelyek a Franciaországból, Németországból, Jugoszláviából (akkoriban), Ausztriából és Bulgáriából származó populációkból álló *I. alpestris alpestris* kládba ágyazódtak. Recuero és munkatársai (2014) átfogó molekuláris tanulmányukban öt, a Bakony-hegységből (Ajka lelőhely, mintaazonosítók: MAB309-313) származó példányt elemeztek. Az mtDNS-adatokon

alapuló Bayes-féle konszenzus-filogramjuk az *I. a. alpestris*-en belül két fő kládot támogatott, a bakonyi mintákat tartalmazó klád pedig testvérkládjá lett a törzsalakot tartalmazó kládoknak. Az *I. a. alpestris* két kládjának szétválása a becslések szerint a pleisztocénben, nagyjából 1,6 millió évvel ezelőtt történt. A bakonyi-örségi populáció elkülönülését új minták hozzáadásával erősítettük meg jelen tanulmányunkban.

A kárpát-medencei kriptikus refúgiumok létezését több tanulmány is felvetette már (lásd Schmitt & Varga, 2012). Az alpesi götte mellett a mocsári béka (*Rana arvalis*) három vonala (Babik és mtsai. 2004), a *Vipera berus* egy vonala (Ursenbacher és mtsai. 2006) és a dunai götte, *Triturus dobrogicus* két vonala (Vörös és mtsai. 2016a) élhette túl az utolsó glaciális maximumot a Kárpát-medencében lévő, extra-mediterrán refúgiumokban.

A Bihar-hegység elkülönülő kládjának leválása kevesebb, mint 2,5 millió évvel ezelőtt történt (amikor az E1 és E2 kládok szétváltak). A Bihar-hegység a Déli-Kárpátok alsó vonulata, amely a harmadidőszak óta földrajzilag elszigetelődött a Kárpátok fő ívétől (Mráz & Ronikier 2016). Ez a régi elkülönülés okozhatja a régió magas faj- és endemizmus gazdagságát (köztük földigiliszták (Pop és mtsai. 2010), vízi rovarok (Bálint és mtsai. 2011) és egy elkülönülő *Salamandra salamandra* vonal (Vörös és mtsai. 2016b)), és ami a Bihar-hegységet a Kárpátok egyik legfontosabb biodiverzitás forró pontjává teszi.



18. ábra. Medián-összevonó haplotípus-hálózat a kombinált mtDNS-adatakra a Kárpát-medencében és környékén. Beékelt térkép: az *Ichthyosaura alpestris* elterjedése Közép-Európában. A hálózaton a körrel jelölt haplotípusok az általunk gyűjtött mintákat jelölik, Recuero és mtsai. (2014) tanulmányban publikált adatokat pedig négyzettel jelenítettük meg. A nukleotid-szubsztitúciós lépések száma szürke számokkal látható. A színek a különböző mtDNS-vonalakat mutatják (Recuero és mtsai. 2014 alapján).

	<i>I.a.</i> <i>alpestris</i>	<i>I.a.</i> <i>apuana</i>	<i>I.a.</i> <i>bakonyiensis</i>	<i>I.a.</i> <i>cyreni</i>	<i>I.a.</i> <i>montenegrina</i>	<i>I.a.</i> <i>reiseri</i>	<i>I.a.</i> <i>veluchiensis</i>
<i>I.a.</i> <i>alpestris</i>		8.872	3.150	4.570	10.196	9.145	9.678
<i>I.a.</i> <i>apuana</i>	89.280		8.609	9.012	9.790	9.035	9.713
<i>I.a.</i> <i>bakonyiensis</i>	10.843	86.745		3.688	10.210	9.316	10.011
<i>I.a.</i> <i>cyreni</i>	20.238	91.145	17.659		10.487	9.634	9.897
<i>I.a.</i> <i>montenegrina</i>	97.030	95.619	95.765	103.160		5.997	7.606
<i>I.a.</i> <i>reiseri</i>	92.169	93.646	91.189	99.639	48.273		7.642
<i>I.a.</i> <i>veluchiensis</i>	88.152	95.190	89.353	95.520	67.000	68.068	

4. táblázat. Az evolúciós vonalak közötti szekvencia-divergencia értékek. Standard hiba értékek a mátrix diagonál alatti részén láthatóak.

Taxonómiai vonatkozások

Dely (1964) kandidátusi értekezésében mutatta be a *Triturus alpestris* (= *Ichthyosaura alpestris*) összes alfajának, köztük a *T. a. bakonyiensis* alfaj határozókulcsait. A legfontosabb jellemzők közé tartozik a szájpadráscsonti fogsorok szerkezete, a fej alakja, az orr alakja, a mellső végtagok hossza és a végtagok elhelyezkedése a test mentén visszahajtva. A *T. a. bakonyiensis* és a *T. a. alpestris* összehasonlítását Dely (1964) alapján az 5. táblázat foglalja össze, és lásd még Vörös és mtsai. 2021, S1-S4. ábrákon. Dely összesen 26 morfológiai és 24 csonttani jellemzőt használt az alfajok összehasonlítására.

Molnár (2001) doktori értekezésében szintén a magyarországi *Ichthyosaura alpestris* populációkat vizsgálta, és a Roček (1974) által bevezetett négy diagnosztikus index (L/LCd, L/Ltc, L/PA, L/Lie, ahol L=testhossz, LCd=farokhossz, Ltc=fejszélesség, Lie= elülső és hátsó végtagok közötti távolság) segítségével hasonlította össze őket más, a törzsalakot képviselő állományokkal. Ez a vizsgálat bizonyította, hogy az Őrségből és a Bakony-hegységből származó alpesi götje jelentősen különbözik a többi populációtól (L/Ltc és L/Lie mind a hímek, mind a nőstények esetében, valamint L/PA a hímek esetében), míg a Mátra, a Bükk és a Zemplénből származó götök az *I. a. alpestris* törzsalakot képviselő populációival mutattak hasonlóságot. Ezeket az eredményeket azonban óvatosan kell kezelni, mivel az élő példányokon végzett mérések és a formalinnal tartósított példányok összehasonlításán alapulnak.

Figyelembe véve a Dely (1964) és Molnár (2001) által megállapított morfológiai különbségeket, hozzáteve a Bakony + Őrség klád genetikai elkülönülését és hosszú, független evolúciós történetét, megállapíthatjuk, hogy ezek a populációk alfaji rangú, hivatalos elnevezésre érdemesek. Dely leírása azonban nem minősül publikált műnek a Zoológiai Nevezéktan Nemzetközi Kódexe (ICZN) alapján (1999, Art. 8), így tanulmányomban (Vörös 2022) javasoltam a Dely (1964) által használt elnevezést, mint új nevet, nevezéktanilag alkalmazható módon, eleget téve az ICZN megfelelő cikkének (1999, Art. 16). Ezzel, az alfaj tudományos neve alkalmazhatóvá vált a Vörös (2022) tanulmány megjelenése pillanatában, a szerző nevével. Ennek fényében Vörös és mtsai. 2021. tanulmányunkban angol nyelvű tükörfordításban közzeltük az alfaj Dely általi teljes leírását.

Ichthyosaura alpestris bakonyiensis subsp. n.

Triturus alpestris bakonyiensis: Dely (1964: 286). Nem alkalmazható, nem publikált név (ICZN 1999, Art. 11.1).

Ichthyosaura alpestris bakonyiensis: Vörös és mtsai. (2021: 188). Nem alkalmazható, mivel a nevet bevezető publikációban nem volt egyértelműen jelölve, hogy új taxon névként alkalmazta a szerző (ICZN 1999, Art. 16.1).

Holotípus: HNHM-HER-61.27.1., adult nőstény, gyűjtötte Dely Olivér 1961 május 7-12 között. Típuslelőhely: Ajka-Felsőcsinger, Bocskor-hegy, Bakony-hegység, Veszprém Vármegye, Magyarország (19. ábra).

Paratípusok: egy adult nőstény (HNHM-HER-2002.45.2.) gyűjtötte Dely Olivér 1961 május 7-12 között, és két adult hím (HNHM-HER-2002.45.1., HNHM-HER-2002.45.3.) gyűjtötte Dely Olivér 1961 május 9-12 között a holotípussal megegyező helyen.



19. ábra. A *Triturus* (= *Ichthyosaura*) *alpestris bakonyiensis* (Dely, 1964) holotípusa (HNHM-HER-61.27.1.) felülről (A), oldalról (B) és alulról (C). Fotó: Németh Tamás.

Diagnózis és (újra)leírás: magyar nyelven lásd Dely 1964, ennek angol nyelvű fordítását lásd Vörös és mtsai. 2021. leíráshoz tartozó ábrák: Vörös és mtsai. 2021, S1, S2, S3, S4.

Az *Ichthyosaura alpestris bakonyiensis*-t az *Ichthyosaura alpestris alpestris* törzsalaktól elkülönítő főbb bélyegeit Dely (1964) alapján az 5. táblázat foglalja össze.

	<i>I. alpestris alpestris</i>	<i>I. alpestris bakonyiensis</i>
Szájpadláscsonti fogsorok szerkezete	A szájpadláscsonti fogsorok “cukorfogó” alakúak, azaz utolsó harmadukban hátrafelé hirtelen kiszélesednek és végük többé-kevésbé befelé görbült	A szájpadláscsonti fogsorok kifejezetten V-alakúak, amennyiben elülső végük hegyes szöveget zár be, száraik pedig hátrafelé erősebben távolodnak egymástól.
Fej alakja	Fej keskeny, tojásdad alakú, sosem köralakú felülnézetben.	A fej vaskos, kb. olyan széles, mint a hónaljban mért törzsátmérő; legnagyobb szélességét a szemek mögött éri el.
Orr alakja	Orr hosszú, orrcsúcs előreugró vagy enyhén kiszélesedett (♂)	Az orr kissé elnyújtott, az orrcsúcs az orr külső széléig hol szélesen (♂), hol kevésbé szélesen (♀) lekerekített.
Melső végtag hossza	Az előrefektetett mellső végtag 1. ujjával valamivel túlér a szem elülső zugán, de sohasem nyúlik az orrlyukig, míg a 2. egészen az orrcsúcsig hatol.	Az előrefektetett mellső végtag 1. ujjával a szem elülső zuga és az orrlyuk közti távolság közepéig ér, a 2. valamivel túlnyúlik az orrcsúcsra.
Végtagok pozíciója a test mellett hajlítva	Ha az elülső végtagot hátra, a hátulsót előre hajlítjuk és a törzshöz szorítjuk, a lábfejek fedik egymást (♂), vagy a leghosszabb ujjak nem, vagy éppen csak érintkeznek (♀).	Ha az elülső végtagot hátra, a hátulsót előre hajlítjuk és a törzshöz szorítjuk, a mellső végtag 3. ujjával a hátsó láb tuberculumáig ér.

5. táblázat. A törzsalak *I. a. alpestris* (svájci – Neuchatel és/vagy németországi – Harz-hegység) és az *I. a. bakonyiensis* (Bakony – Ajka-Felsőcsinger, Németbánya, és/vagy Urkút) főbb elkülönítő bélyegei, Dely (1964) alapján.

Ismert előfordulás: Bakony-hegység és Őrség-Vendvidék régió, Magyarország.

Védelem és veszélyeztető tényezők: Az *I. alpestris* fokozottan védett Magyarországon (100/2012 (IX. 28.) VM Rendelet). A faj/alfaj legfontosabb veszélyeztető tényezői az élőhelyek tönkretétele, a szaporodóhelyek kiszáradása, ragadozók növekvő száma (pl. vaddisznó és betelepített ragadozó halak), nem megfelelő erdőgazdálkodás és földhasználat, turizmus, technikai sportok elterjedése (Vörös és mtsai. 2014) és a hirtelen felbukkanó fertőző betegségek, mint például a kitridiomikózis (Vörös és mtsai. 2018) vagy a ranavírusok (Vörös és mtsai. 2020).

2.2.2. A foltos szalamandra (*Salamandra salamandra*) filogeográfiája és populációstruktúrája

A foltos szalamandra, *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) (Caudata: Salamandridae) (20. ábra), egy széles elterjedésű faj, Észak-Afrikától a Kárpátokig előfordul (Sillero és mtsai. 2014). Nagyjából folytonos elterjedése a Kárpát-medencében megszakad, mivel a faj a Pannonsíkságon nem él (21. ábra). Több tanulmány is foglalkozott a *Salamandra*-nemzetség evolúciós történetével, és sokáig a fajszerű törzsfák sem mutattak teljesen egyértelmű topológiát (Steinfartz és mtsai. 2000, Veith és mtsai. 1998, Weisrock és mtsai. 2006). Ha pedig az alfajok filogenetikai kapcsolatait vizsgálták, eltérő genetikai markerek eltérő eredményt adtak (Vences és mtsai. 2014). Az eddigi legátfogóbb tanulmányt Gippner és mtsai. (2024) közölte nemrégiben, amelyben rekonstruálták a teljes *Salamandra*-nemzetség összes fajának (6) és alfajának (25) filogenomikai kapcsolatát, ddRAD genomadatok alapján. A törzsalak genetikai szerkezete kapcsán hasonló eredményre jutott a filogenomikai tanulmány, mint a korábbi, mtDNS- és allozim-alapú vizsgálat (Steinfartz és mtsai. 2000), miszerint a törzsalak két genetikai vonalra különül (keleti és nyugati). Ez a mintázat arra utal, hogy az LGM utáni rekolonizáció két forráspopulációból történt.

Tanulmányunk célja volt a *S. salamandra* genetikai szerkezetének feltárása a Kárpát-medencében és környékén, a Kárpátok északkelet-magyarországi peremvidékének elszigetelt populációira összpontosítva. Egy mitokondriális DNS-szakasz (D-loop) és tíz mikroszatellit-lókusz elemzésével szeretnénk volna 1) felmérni, hogy a *S. salamandra* különböző vonalai előfordulnak-e a Kárpát-medencében; 2) értékelni, hogy az LGM milyen hatással volt a populációk genetikai változatosságára és milyen mértékben okozta a populációk elszigetelődését egymástól; és 3) hozzájárulni a közép-kelet-európai foltos szalamandra-állományok posztglaciális biogeográfiai történetének pontosabb megértéséhez.



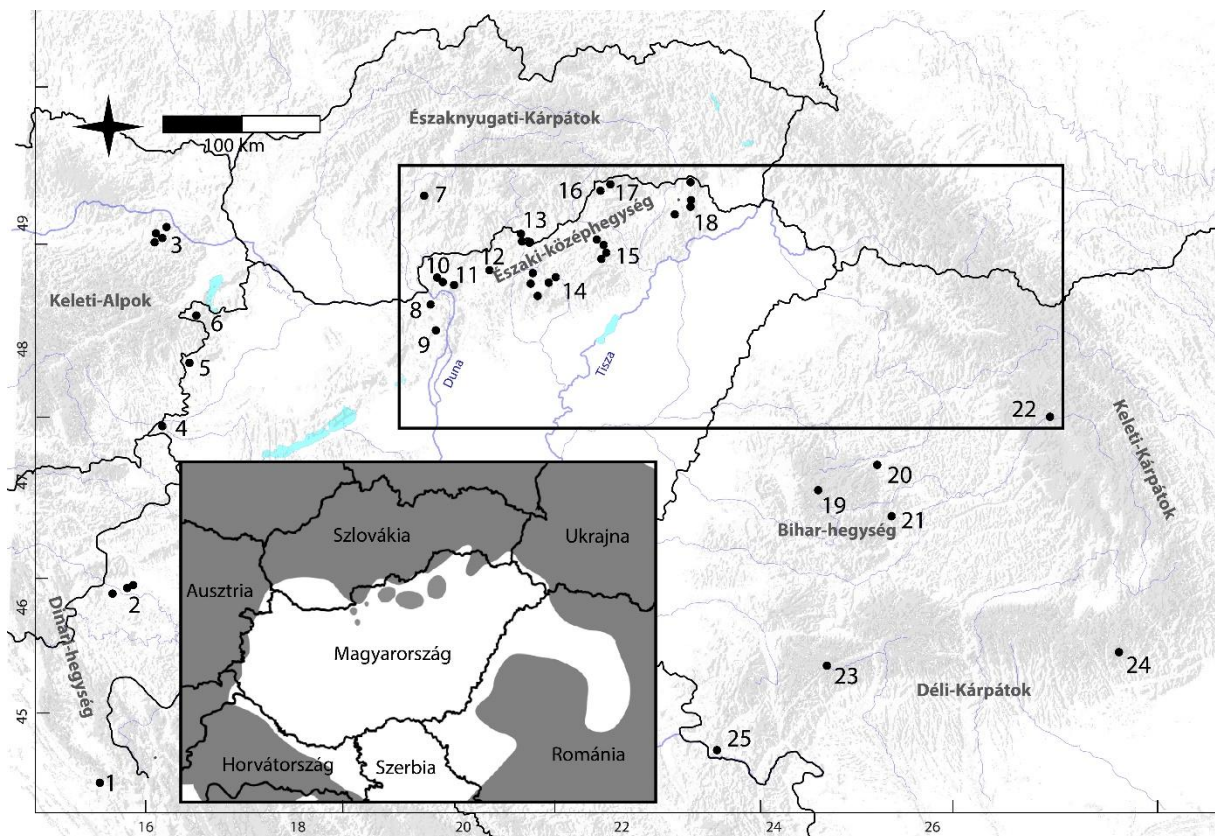
20. ábra. Foltos szalamandra (*Salamandra salamandra*) kifejlett példánya. Fotó: Vörös Judit.

Módszerek

Mintavétel és laboratóriumi elemzések

2009 és 2012 között 25 régió 53 helyszínén 349 *Salamandra salamandra* egyed mintáztunk a Kárpát-medencében és annak környékén (21. ábra, és Vörös és mtsai. 2016, 1. táblázat). Vizsgálatunkban Magyarország alacsony fekvésű hegyvidékeinek elszigetelt populációira fókuszáltunk. A mintavétellel lefedtük a *S. salamandra* teljes elterjedését a Kárpát-medencéből, minden olyan hegységből elemezve populációkat, ahol a faj jelen van. Az egyes hegységekben az állományok mérete nagymértékben különbözött. Míg vannak olyan régiók, ahol a *S. salamandra* egyetlen patakot vagy völgyet lakik (pl. Visegrádi-hegység, Budai-hegyek, vagy Naszály), más régiókban a faj gyakori és széles elterjedésű (pl. Mátra, Bükk vagy Zemplén).

Hogy az utóbbi régiókban a legnagyobb genetikai változatosságot tudjuk feltárni, több helyről gyűjtöttünk kevesebb mintát és azokat egy populációként kezeltük az elemzésekben. Referencia-populáció céljából gyűjtöttünk mintákat továbbá az Alpokból (Ausztria), a Medvednica- és Dinári-hegységekből (Horvátország), valamint a Kárpátokból (Nyugati és Északi-Kárpátok Szlovákiában, Keleti és Déli-Kárpátok, valamint Bihar-hegység, Románia) (21. ábra). A teljes genomi DNS-t etanolban tárolt vagy fagyasztott szövetekből (farokvég) a Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. Annak megállapítására, hogy populációink melyik mtDNS-vonalhoz tartoznak, a mitokondriális D-loop 725 bp hosszú szakaszát amplifikáltuk az L-Pro-ML (5'-GGCACCCCAAGGCCAAAATTCT 3') és a H-12S1-ML (5'-CAAGGCCAGGACCAAACCTTTA 3') primer párral (Steinfartz és mtsai. 2000). A PCR-reakciók és a szekvenálás részletes leírását lásd Vörös és mtsai. 2016, 4. oldal. Mivel korábbi vizsgálatokban a mtDNS nem hordozott elegendő felbontást a közép- és kelet-európai *S. salamandra* populációkon belüli genetikai szerkezet feltárásához (Steinfartz és mtsai. 2000), a nukleáris genom változatosságát 10 mikroszatellita-lókuszt segítségével vizsgáltuk, kilenc (Sal E2, Sal E6, Sal E7, Sal E8, Sal E11, Sal E12, Sal E14, Sal 3 és Sal 23) tetranukleotid és egy (Sal E5) dinukleotid ismétlődő motívummal (Steinfartz és mtsai. 2004). A mikroszatelliták bebizonyították, hogy potenciálisan alkalmasak a kétélűek közelmúltbeli (legalábbis az LGM óta tartó) evolúciós történetének leírására (pl. Vörös és mtsai. 2016, Zeisset & Beebe 2001). A PCR-reakciók és a fragmenthossz-elemzés részletes leírását lásd Vörös és mtsai. 2016, 4. oldal.



21. ábra. A Kárpát-medencét ábrázoló térkép, rajta a 25 *S. salamandra* mintavételi hellyel. Az Északi-középhegység populációi, és a referencia-populációként használt Selmeci-hegységből és a Kelemen-havasokból származó populációk keretbe foglalva részletesebben láthatóak a 23. ábrán. A bal alsó sarokba beékelte térképen sötétszürkével látható a foltos szalamandra nagyjából elterjedése a Kárpát-medencében.

Statisztikai elemzések

A mitokondriális D-loop szekvenciákat a STADEN csomag PREGAP4v1.6 és GAP4v11.2 szoftvereivel szerkesztettük (Staden és mtsai. 2003), és kézzel igazítottuk egymáshoz. A haplotípusok eredetének azonosításához és más *S. salamandra* genetikai vonalakkal (Najbar és mtsai. 2015, Steinfartz és mtsai. 2000) való összehasonlításához Maximum-likelihood törzsfát építettünk (1000 bootstrap ismétlés és a HKY+I+G szubsztitúciós modell) a MEGA6 program felhasználásával (Tamura és mtsai. 2013). Az NCBI Genbankból származó szekvenciák azonosító számai a Vörös és mtsai. 2016, S3 ábrán láthatók, az ebben a tanulmányban keletkező szekvenciák azonosító számai pedig KX951916-37.

Minden egyes mikroszatellita-lókuszt esetében először a MICROCHECKER 2.2.2 (Van Oosterhout és mtsai. 2004) segítségével ellenőriztük a null allélok lehetséges előfordulását minden olyan populációban, amit több, mint 4 egyed alkotott. Ezen kívül a lókuszek közötti kapcsolódási egyenlőtlenséget (LD) és a Hardy-Weinberg-egyensúlytól való eltérést az FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995) program segítségével (1000 permutáció) teszteltük. A genetikai változatosságot (allélgazdagság - A_r - és várható heterozigótaság) az FSTAT segítségével értékeltük.

Populáció	N	H_o	H_e	A_r	F_{IS}	Átlag F_{ST}
pop1	5	0.767	0.613	2.386	-0.198	0.249
pop2	30	0.602	0.607	2.366	0.017	0.190
pop3	33	0.549	0.569	2.256	0.043	0.236
pop4	8	0.452	0.458	2.016	0.045	0.338
pop5	15	0.563	0.573	2.289	0.035	0.253
pop6	10	0.552	0.520	2.158	-0.036	0.268
pop7	15	0.566	0.626	2.421	0.113	0.157
pop8	13	0.497	0.442	1.956	-0.103	0.236
pop9	45	0.333	0.351	1.712	0.055	0.298
pop10	23	0.526	0.555	2.234	0.063	0.158
pop11	16	0.354	0.422	1.888	0.175	0.216
pop12	8	0.381	0.452	1.967	0.190	0.207
pop13	8	0.546	0.546	2.188	0.033	0.243
pop14	22	0.410	0.417	1.894	0.028	0.230
pop15	16	0.403	0.396	1.840	-0.001	0.252
pop16	9	0.556	0.508	2.052	-0.065	0.221
pop17	6	0.444	0.461	1.982	0.082	0.206
pop18	15	0.490	0.487	2.044	0.010	0.231
pop19	23	0.507	0.518	2.096	0.033	0.272
pop20	2	0.611	0.431	1.932	-0.294	0.271
pop21	9	0.463	0.502	2.054	0.107	0.295
pop22	9	0.630	0.630	2.453	0.030	0.178
pop23	2	0.722	0.431	1.998	-0.592	0.287
pop24	5	0.493	0.643	2.498	0.290	0.205
pop25	2	0.444	0.306	1.606	-0.333	0.340

6. táblázat. A 25 *S. salamandra* populáció közötti genetikai változatosság mérőszámai. N=mintaszám; H_o =megfigyelt heterozigótaság; H_e =várható heterozigótaság; A_r =allélgazdagság; F_{IS} =fixációs index; Átlag F_{ST} =az összes F_{ST} érték átlaga az adott populációra.

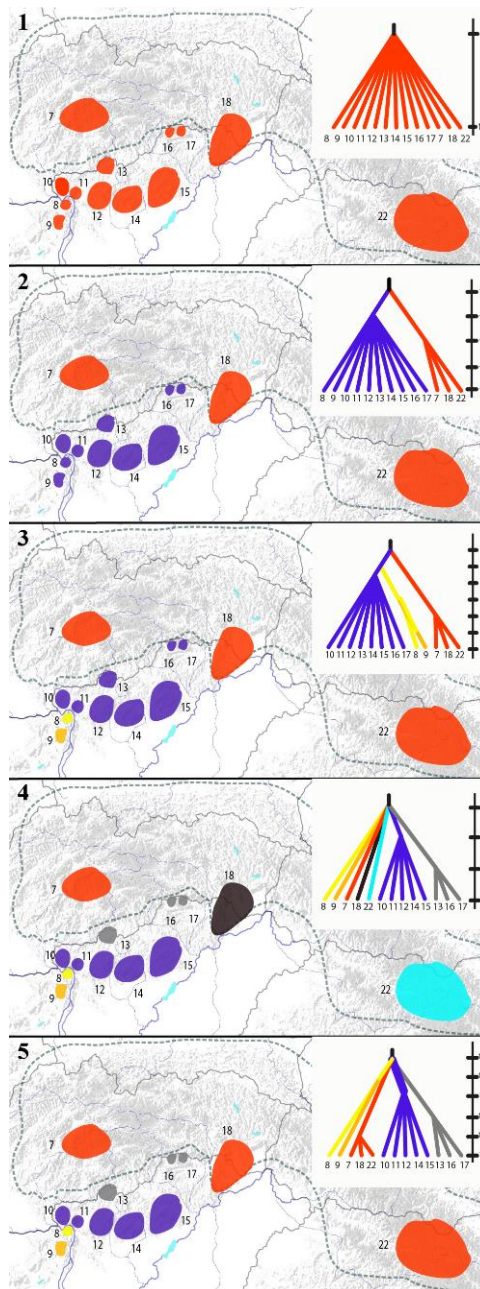
Helyi-szintű fixációs indexeket (F_{IS}) számoltunk, és permutációval (1000 ismétlés) teszteltük a nullától való szignifikáns eltérést az FSTAT segítségével. A molekuláris varianciaelemzést (9999 permutációval tesztelt AMOVA) a GENALEX 6.501 (Peakall & Smouse 2012) programmal végeztük el az öt fő régió (keleti populációk, Bihar-hegység, Nyugati-, Keleti- és Déli-Kárpátok) között és három különböző szinten (egyed, populáció és globális). A populációk differenciálódását az FSTAT programban számított F_{ST} -statisztikával (F_{ST}) vizsgáltuk, a páros összehasonlítások szignifikanciáját pedig egzakt teszttel (Goudet és mtsai. 1996) végeztük 1000 ismétléssel. Mantel-tesztet végeztünk annak értékelésére, hogy történt-e távolság-alapú izoláció, a korrigált genetikai [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] és földrajzi [$\ln(\text{távolság})$] távolságok felhasználásával, Rousset (1997) leírása alapján. A populációk közötti genetikai távolságot a Cavalli-Sforza és Edwards D_c távolság (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) segítségével is kiszámoltuk, a filogenetikai rekonstrukciót pedig a POPULATIONS 1.2.28 (Langella 1999) segítségével alkottuk. Hasonlóképpen, a GENALEX segítségével futtattunk főkomponens elemzést (PCoA), a populációk közötti rokonsági viszonyok 2D formátumban történő megjelenítése érdekében. A populáció-szerkezetre a STRUCTURE 2.2.3 (Pritchard és mtsai. 2000) programban implementált, több-lókuszú genotípusadatokon alapuló klaszterezési módszerrel következtettünk, nem-keveredési (non-admixture) modellel és 600 000 ismétléssel. Tíz független futtatást végeztünk K 1 és 25 közötti értékekre. A klaszterek számát (K) mind a legmagasabb $\ln\text{Prob}(D)$ érték, mind a másodrendű változásszám (second order rate of change value) értéke alapján határoztuk meg (Evanno és mtsai. 2005). Mivel a STRUCTURE érzékeny az egyes populációk mintaszám értékeire (Puechmaille 2016), ugyanazokat a szimulációkat lefuttattuk úgy, hogy populációnként maximum 12 mintát vettünk figyelembe. A tájgenetikai (landscape genetics) elemzéseket a Geneland 4.0 (Guillot és mtsai. 2005) segítségével is elvégeztük. Ezzel a módszerrel tíz független, 100 000 ismétlésből álló futtatást alkalmaztunk (ritkítás 100 szimulációnként), és az első 10%-ot elvetettük. Végül a BARRIER 2.2 szoftverbe (Manni és mtsai. 2004) beépített Monmonier-féle maximum-különbség algoritmust (Monmonier 1973) használtuk a mintavételi helyek közötti erős genetikai fragmentáltságból eredő lehetséges földrajzi akadályok azonosítására. Ehhez az elemzéshez egy Delanuy-háromszögelési hálózatot (Brassel és Reif 1979) építettünk a szomszédos populációk összekötésére, és a Monmonier-féle maximális különbség algoritmust (Monmonier 1973) használtuk a genetikai elhatárolások meghatározására a populációk páronkénti genetikai különbségei alapján. Az egyes mikroszatellita-markerek F_{ST} -értékeit külön számítottuk ki, és ezeket használtuk a konszenzushatárok meghatározásához.

Mivel fő kérdéseink az Északi középhegység és a szomszédos magyarországi területek (pop7-től pop18-ig) történetére irányultak, a Mantel-tesztet, a STRUCTURE és a Geneland elemzést elvégeztük megegyező beállításokkal, de csak ezen populációk adataival is, a Nyugati-, illetve a Keleti-Kárpátokból származó referenciapopulációkat (pop7 és pop22) is bevonva.

Hogy feltárjuk a foltos szalamandra kolonizációs történetét a Kárpát-medencében, több elméletet teszteltünk a közelítő Bayes-számítás (Approximate Bayesian Computation, ABC) segítségével, a DiyABC 2.1 szoftverrel (Cornuet és mtsai. 2008). Az ABC elemzés célja a genetikai és demográfiai paraméterek utólagos eloszlásának meghatározása, adott demográfiai modell mellett, szimulált genetikai adatsorok segítségével (Beaumont és mtsai. 2010; Beaumont és mtsai. 2002). Az ABC az összefoglaló statisztikák kiszámításán alapul (Csilléry és mtsai. 2010); ehhez a vizsgálathoz figyelembe vettük az átlagos allélszámot, az átlagos géndiverzitást, az átlagos méret-varianciát, a lókuszok közötti, valamint két minta közötti átlagos M -indexet (Garza és Williamson 2001), az F_{ST} -értékeket, az átlagos osztályozási indexet, a $(d\mu)^2$ távolságot, az átlagos allélszámot, az átlagos géndiverzitást, az átlagos allélméret varianciáját és a közös alléltávolságot. A legjobb elméletet direkt és logisztikus regressziós becsléssel választottuk ki.

A szimulációkat 5×10^6 ismétléssel végeztük és öt elméletet teszteltünk:

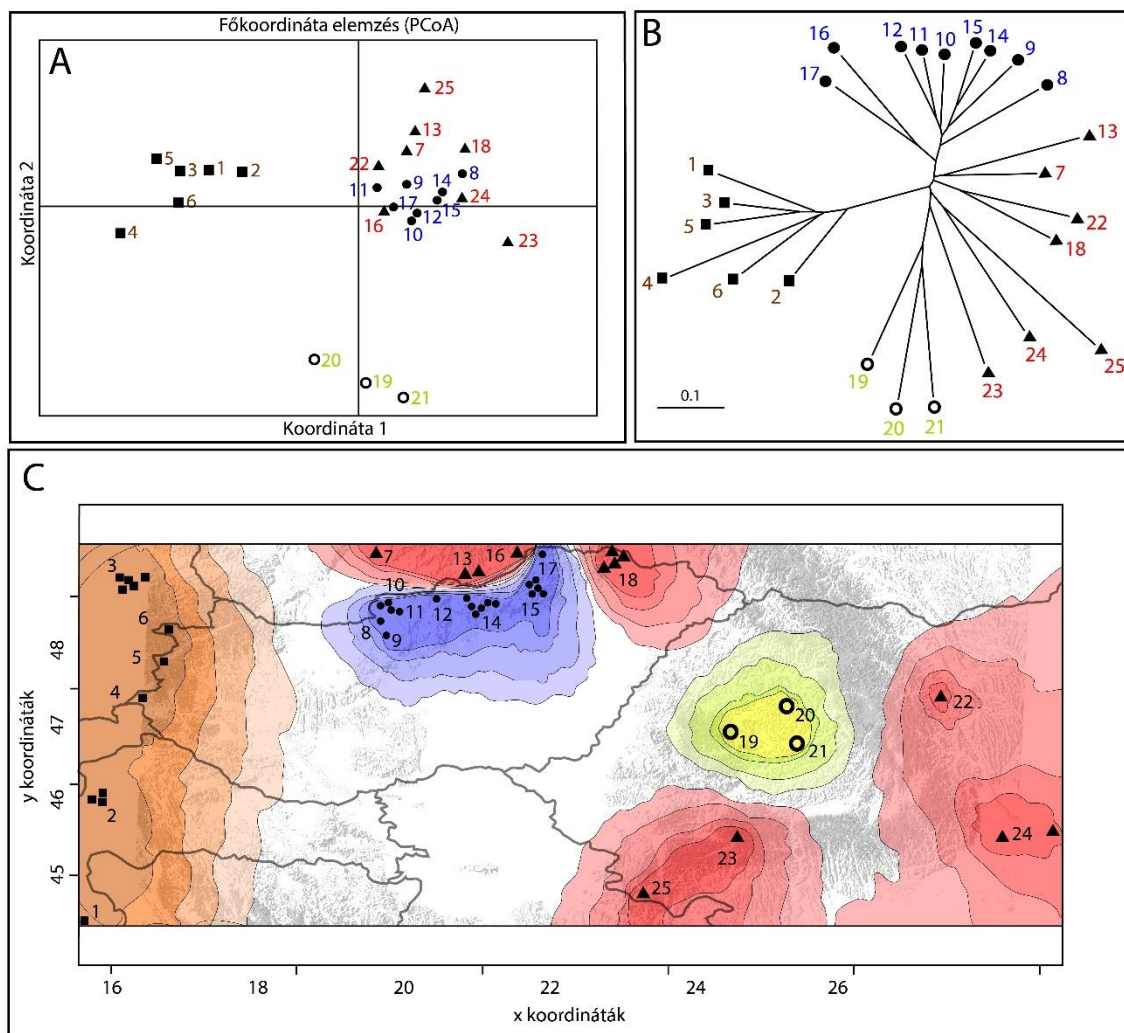
- 1) az Északi-középhegység és a Kárpátok populációi (pop7, 18 és 22) egyidejűleg váltak szét egymástól;
- 2) az összes izolált északi-középhegységi populáció egyszerre vált szét a Kárpátok populációitól (pop7, 18 és 22);
- 3) hasonló az előző elmülethez, azzal a különbséggel, hogy a Dunától nyugatra lévő két populáció (pop8 és pop9) előzetesen elszigetelődött az Északi-középhegységtől;
- 4) az összes Kárpátokból származó populáció (pop7, 18 és 22) és a Dunától nyugatra lévő két populáció (pop8 és pop9) egyidejűleg vált le az Északi-középhegység déli (pop10, 12 és pop14-15) és északi (pop13,16-17) részétől; és
- 5) hasonló az előző elmülethez, de pop8 és 9, valamint pop7, 18 és 22 közös őssel rendelkeznek (22. ábra). A teljes populációméret minden lépésben állandó volt, kivéve a pop9-et, ahol a 2) és a 3) szcenáriók során egy-egy populációméret-módosítás megengedett volt.



22. ábra. A DiyABC 2.1 (Cornuet és mtsai. 2008) szoftverrel tesztelt öt kolonizációs elmélet az Északnyugati- és Keleti-Kárpátok populációival. A szaggatott vonal a *S. salamandra* folytonos elterjedési területét jelöli a Kárpátokban. A populációk számozása a 21. ábra és Vörös és mtsai. 2016., 1. táblázat jelöléseit követi.

Eredmények

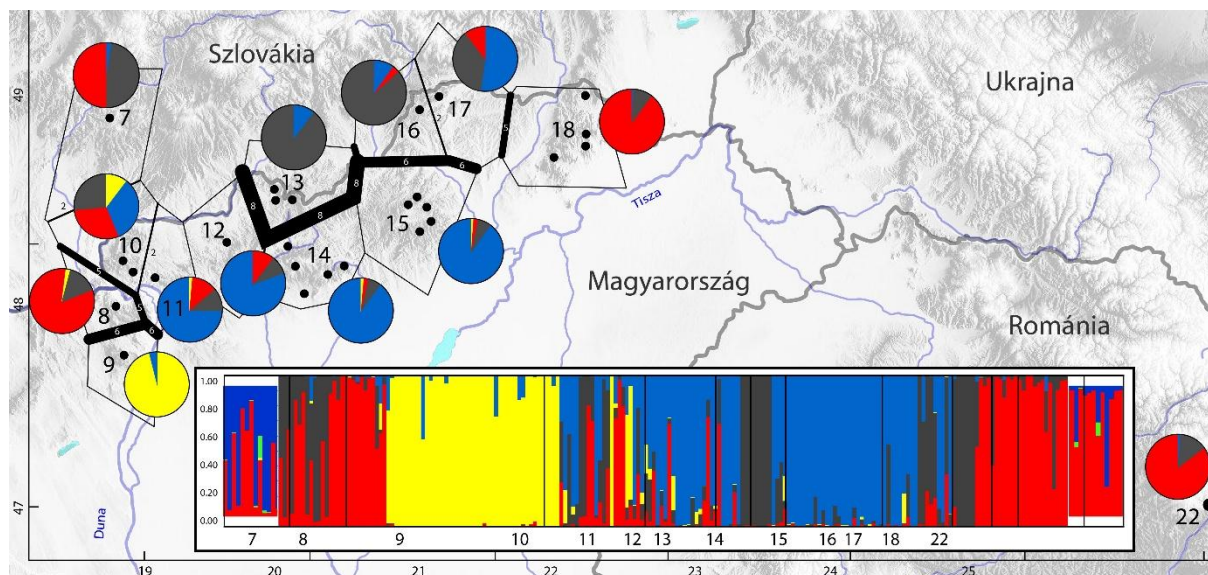
A mitokondriális D-loop nem bizonyult változatosnak a vizsgált populációkban. A 725 bázispárnyi szakaszon a 22 mintában csak egy variábilis pozíciót (T/C átmenet) találtunk, amely összesen két haplotípust határozott meg. Az egyedek túlnyomó többsége ugyanabból a mitokondriális (C vonalhoz tartozó) vonalból származott, amelyet más nyugat-európai foltos szalamandra-populációkban is találtak (Najbar és mtsai. 2015, Steinfartz és mtsai. 2000). Csak egy Bihar-hegységből származó példány (pop19) adott egy második haplotípust, amely szintén ugyanahhoz a vonalhoz tartozott (Vörös és mtsai. 2016, S1. ábra).



23. ábra. A mintázott populációk közötti elkülönülés **A**: Főkomponens-elemzéssel (PCoA), GENALEX programmal futtatva; **B**: Közös allélok alapuló szomszédösszevonó (neighbor-joining) törzsfák (a Cavalli-Sforza és Edwards *D_c* távolságok a POPULATIONS szoftverrel számolva); és **C**: A *S. salamandra* minták klaszterezése a Geneland által megállapított K=4 esetén (nem-korrelált allélgyakoriság és nem-keveredési modellel számolva). A populációk hovatartozásának valószínűsége a színárnyalat sötéttedésével növekszik (0.5, 0.45, 0.4 és 0.35 valószínűségi vonalak láthatók a pontok körül; az eredeti Geneland futási eredmények a Vörös és mtsai. 2016, S5 ábrán láthatóak). Az egy Geneland klaszterhez tartozó mintákat azonos szimbólummal jelöltük.

A 349 egyed tíz mikroszatellita-lókuszt elemzése során a Sal2 lókusztban null allélok (a 22 vizsgált helyből 8-ban) észleltünk; ennek következtében a további elemzéseket a kilenc másik lókuszzal végeztük. A kilenc mikroszatellita között nem találtunk kapcsoltságot. Az egyes populációk genetikai változatoságát a 6. táblázat mutatja be. Mivel az allélok számát erősen befolyásolja a minták száma, csak az allélgazdagság, valamint a megfigyelt és a várható heterozigótáság hasznos a populációk összehasonlításához. Néhány populáció alacsony genetikai változatoságot mutatott, különösen a pop9, amelynek *Ar* értéke 7,5-41%-kal, a várható heterozigótáság értéke pedig 13-78%-kal alacsonyabb volt, mint a középhegységből

származó többi populáció esetében. Némelyik régióban a beltenyésztettség (F_{IS} alapján) jelei mutatkoztak, de ez csak a pop24 esetében volt szignifikáns. Számos populáció egy vagy két privát allélt mutatott (3 a pop3-ban), de a pop7-ben különösen sok (4) privát allél volt. A változatosság legnagyobb része (63%) a populációkon belül volt megfigyelhető, míg a 11%-át a 25 mintavételezett földrajzi populáció, 26%-át pedig a régiók között mértük. A populációk közötti legtöbb páronkénti F_{ST} -összehasonlítás szignifikáns volt, az értékük $F_{ST}=0,034$ (pop3 és pop5 között) és $F_{ST}=0,479$ (pop4 és pop9 között; Vörös és mtsai. 2016, 3. táblázat) közé esett. Csak a 20., 23., 24. és 25. populációból származó F_{ST} -értékek nem voltak szignifikánsak az egyedek korlátozott száma miatt.



24. ábra. A 21. ábrán kerettel kijelölt mintavételi helyek a Kárpát-medencében, a STRUCTURE 2.3.3 szoftver által meghatározott klaszterezésük, és a BARRIER 2.2. szoftver által felrajzolt génáramlási akadályok. A számok a földrajzi populációkat jelölik (pop7 - 22). A kördiagrammok a STRUCTURE szoftver által meghatározott genetikai klaszterek arányát jelölik $K=4$ esetén. A STRUCTURE oszlopdiaagrammon minden oszlop egy egyedet jelöl ($n=205$), amelyek a genetikai klaszterek arányában vannak felosztva. A földrajzi populációk közötti fekete vonal vastagsága és a sarkokban lévő apró számok nagysága a BARRIER 2.2. szoftver által megadott genetikai szakaszosság (discontinuity) mértékét mutatja.

A teljes adatsorból épített, genetikai távolságon alapuló filogeográfiai rekonstrukciót a 23B ábra mutatja be. A nyugati állományok egy csoportot alkotnak, míg egyes északi és nyugati állományok keverednek egymással. A PCoA hasonló eredményeket mutatott (23A ábra). A STRUCTURE szimulációi 2 klasztert (delta K értéket használva) és 11 klasztert (a legmagasabb $\ln P(D)$ módszerrel; lásd Vörös és mtsai. 2016, S2. ábra) támogattak. A populációnként maximum 12 egyedet vizsgáló elemzések nagyon hasonló eredményt hoztak: 2 fő klaszter (delta K értéket használva) és 12 klaszter (a legmagasabb $\ln P(D)$ módszerrel). A Geneland-elemzés 4 klaszter előfordulását sugallta (23C ábra és Vörös és mtsai. 2016, S5. ábra). Az Északi-középhegységen belül a STRUCTURE-elemzésben a legnagyobb valószínűséget a $K=4$ képviselte, de a $K=5$ is hasonló értéket mutatott (Vörös és mtsai. 2016, S3 ábra). A 4 klaszter elkülönítette a pop11+12+14+14+15+17 (Északi-középhegység déli része), pop13+16 (Északi-középhegység északi része), pop8+18+22 (Pilis, Zemplén és Kelemen-havasok) és pop9 (Budai-hegység; 24. ábra) régiókat. A pop7 és pop10 több klád között keveredett. A populációnként maximum 12 egyedet tartalmazó adathalmaz felhasználásával az eredmények hasonlóak voltak, a legjobb valószínűséget a $K=5$ és $K=4$ kapták (Vörös és mtsai. 2016, S4. ábra). A Geneland nagyon hasonló mintázatot mutatott ebben a régióban, és 4 klasztert eredményezett (Vörös és mtsai. 2016, S6. ábra).

Szétválási esemény	Generációk	95% CI	Évek	95% CI
ta	5890	967 - 13300	41230	6769 - 93100
th	6900	1960 - 12900	48300	13720 - 90300
ti	1350	314 - 4130	9450	2198 - 28910
td	7870	2130 - 13800	55090	14910 - 96600
tc	16200	7750 - 27500	113400	54250 - 192500

7. táblázat. A régiók (13 populáció 349 mintája) közötti szétválás idejének becslése a DiyABC 2.1 (Cornuet és mtai. 2010) szoftver segítségével. A szétválási időpontokat a generációk számából kalkuláltuk, 7 éves generációs idővel számolva.

Végül, a BARRIER-elemzések megerősítették a pop10+11+12+14+15 (Északi-középhegység déli része) egy csoportba sorolását, és a szomszédos populációk (pop8, pop9, pop13, pop16 és pop18) határozott izolációját ettől a csoporttól (24. ábra).

Az ABC-elemzésekben mind a közvetlen, mind a logisztikus regresszió az ötödik elméletet választotta a legvalószínűbbnek (56,8%), a logisztikus regressziós becsléssel a második választás (33,3%) a negyedik elmélet volt (22/4 ábra). A szimuláció azt is megmutatta, hogy a szalamandra-populációkban jelentős állománynövekedés ment végbe ($N_{total} = 487.290$) a történelmi populációkhoz képest ($N = 63.100$). Az északi-középhegységi és a Kárpátok populációi közötti szétválást 16200 generációs időre (113400 év) becsültük. A pop8 és a pop9 elszigetelődése meglehetősen régi (kb. 7870 generációs idő (55900 év)). A legtöbb északi-középhegységi populáció közötti szétválás a déli részen 6900 generációs idő (48300 év) és az északi részben 1350 generációs idő (9450 év) között változik, míg a Kárpátok populációi közötti szétválás nagyjából az Északi-középhegység déli populációval egy időben történt (kb. 5890 generációs idővel ezelőtt (41230 év)). A generációs időt (a szaporodó nőstények átlagos életkora) 7 évben határoztuk meg Rebelo és Leclair (2003) szkeletokronológiai adatai alapján (7. táblázat). Végül, az átlagos mutációs rátát $7,30 \cdot 10^{-6}$ -ra becsültük ($2,90E-06 - 1,71E-07$).

Diszkusszió

A Kárpát-medencében és környékén élő *Salamandra salamandra* populációk átfogó genetikai vizsgálata jelentős, a közelmúltban történt szétválást mutatott ki. Míg a mitokondriális DNS kiválasztott szakasza a populációk hasonlóságát mutatta és ezzel a közös evolúciós eredetre utalt, addig a mikroszatelliták vizsgálata közelmúltbeli (jelen és 100.000 év közötti) elkülönülést sugallt. Az összes populációt egyben elemezve a minták két fő klaszterbe csoportosultak, egy nyugati (alpesi, beleértve az Alpokból, a Medvednica-hegységből és a Dinári-karsztból származó mintákat), és egy keleti (kárpáti, beleértve az Északi-középhegységből, valamint a szlovák és romániai Kárpátokból származó mintákat) klaszterbe. Ez tovább erősíti azt a mintázatot, amit számos más faj is képvisel, miszerint az Alpokból és a Kárpátokból származó populációk hosszú önálló evolúciós múlttal rendelkeznek (pl. *Bombina variegata*, Vörös és mtsai. 2006).

A keleti klaszteren belül a Geneland további három csoportot különböztetett meg: a Kárpátokhoz tartozó mintákat, az Északi-középhegység déli peremén elszigetelt populációkat és a Bihar-hegységből származó populációt, ami alátámasztja a perempopulációk elszigetelődésének elméletét. A Bihar-hegységben, ahogy az alpesi göte (*Ichthyosaura alpestris*) filogeográfiájáról szóló fejezetben is taglaltuk, magas az endemizmusok száma (pl. földigiliszták (Pop és mtsai. 2010), vízi rovarok (Bálint és mtsai. 2011), vagy a kékpettyes lábatlangyík esetében (Gvoždík és mtsai. 2013, Szabó és Vörös 2014)), ami annak köszönhető, hogy ez a hegység a Kárpátok hegyvonulatain belül egy a harmadidőszak óta földrajzilag elszigetelődött biogeográfiai egység.

Az Északi-középhegységen belül jelentős strukturálódást mutatott az összes klaszterezési módszer, a STRUCTURE, a DiyABC-vel végzett szimuláció és a Geneland, valamint a páronkénti F_{ST} -összehasonlítások, és több populáció elkülönülését a Barrier-elemzés is

megerősítette. Összegezve az eredményeket, a Visegrádi-hegység és a Budai-hegység, valamint az Északi-középhegység déli perempopulációi genetikailag elkülönülnek a többi populációtól. Szemben a Kárpátok fő vonulatával, ahol a mintázott populációk (7, 22-25) a nagy földrajzi távolságok ellenére jelentős genetikai hasonlóságot mutattak, az Északi-középhegység déli régiója rendkívül fragmentált genetikai struktúrával rendelkezik. Annak ellenére, hogy ezek a populációk közel vannak egymáshoz (10-30 km), a génáramlás korlátozott az Északi-középhegység déli (11, 12, 14, 15 és 17 populációk) és északi (13, 16 és 18 populációk) része között. Ez a differenciálódás a 16. és 17. populációk között volt a legkifejezettebb az Aggteleki-karszt területén. Ez a két vizsgált populáció 10 km-re fekszik egymástól, és egy összefüggő erdőrendszer köti össze őket, amely nagyon hasonló élőhelyeket biztosít a szalamandralárvák számára az állandó vízű patakokban. A két hely között nem található olyan nagyobb térbeli akadályok, amelyek gátolnák a kifejlett szalamandrák vándorlását. Az egyetlen földrajzi struktúra, amely befolyásolhatja az elterjedésüket az a Bódva-folyó völgye, ami egy potenciális terjedési folyosót jelenthet a szalamandrák számára. Steinfartz és mtsai. (2007) magas genetikai hasonlóságot mutatott ki egy 250 km² területen élő szalamandra-populációban a németországi Eifel erdőben, viszont jelentős genetikai különbséget állapított meg földrajzilag közel élő populációk esetében (Kottenforst). A szerzők azt vetették fel, hogy a különbséget okozhatja a specifikus élőhelyhez történő adaptáció, és az asszortatív párválasztás együttes hatása. Annak ellenére, hogy a Visegrádi-hegység a Dunától nyugatra fekszik, földrajzilag az Északi-középhegységhez tartozik. A Visegrádi-hegység és a Börzsöny közös vulkáni eredetű, nagyjából 15 millió évvel ezelőtt alakultak ki (Pécskay és mtsai. 1995). A két hegységet a pleisztocén végén a Duna-kanyar kialakulása választotta el egymástól (Karátson 2015). A nagy vízrendszerek nem igazán kedvező élőhelyek a szalamandra számára, és a folyókon való átkelés is akadályt jelent számukra, ez magyarázhatja a Visegrádi-hegység és a Budai-hegység szalamandra-populációinak genetikai differenciálódását.

A Budai-hegységben élő populáció mutatta a legalacsonyabb genetikai változatosságot. Ezt az elszigetelt kis populációt 2008-ban fedezték fel újra Budapest külterületén, ahol a fajt azelőtt utoljára 1918-ban látták (Méhely 1918). Bár a *S. salamandra* jó diszperziós képességgel rendelkezik (Schmidt és mtsai. 2007, Schulte és mtsai. 2007), és néha még az országutaknak sincs hatása a populációk differenciálódására (Bani és mtsai. 2015, Steinfartz és mtsai. 2007, Straub és mtsai. 2015), ezt a kis budapesti populációt, amely becslések szerint néhány ezer egyedből áll (Kiss és mtsai. 2021), teljesen körülzárja a város. Figyelembe véve a megfelelő élőhelyek hiányát, a legközelebbi, 21 km távolságban élő (Visegrádi-hegység) populációval nem valószínű a génáramlás. A kis maradványpopulációt veszélyezteti a főváros dinamikus fejlődése az elmúlt 150 évben, amely feldarabolta a faj elterjedését a Budai-hegységben. A génáramlás hiánya és a földrajzi elszigeteltség lehet a felelős a különösen alacsony genetikai változatosságért.

A Würm-eljegesedés utáni kolonizációs történet

Az Északi-középhegység és a vizsgált kárpáti *S. salamandra* populációk legvalószínűbb kolonizációs története az ABC-elemzés alapján négy független folyamattal írható le, amelyek az utolsó glaciális maximum (LGM) időszakára nyúlnak vissza. Az északi-középhegységi és a kárpáti szalamandra-populációk szétválása a középső pleisztocén vége körül kezdődhetett. A pleisztocén vége felé a Dunakanyar kialakulása elválasztotta a Visegrádi-hegységet és a Budai-hegységet, ami a szalamandra-populációk elszigetelődését is okozta. Míg a Kárpátok szalamandra-populációi közötti szétválás szintén a pleisztocén végére nyúlik vissza, addig az északi-középhegységi populációk közötti szétválás sokkal újabb keletű, és egybeesik az LGM végével (48300 év), ami megegyezik a Würm/Weichsel-jégkorszakok viszonylag enyhe interstadiális időszakával. Ezek az eredmények bizonyítékkul szolgálnak a *S. salamandra* eljegesedés alatti túlélésére a Kárpátok mérsékelt égövi erdeiben. Mivel a Kárpátok középső és alsó magaslati jégmentesek maradtak az LGM során (Reuther és mtsai. 2007), számos hidegkedvelő és mérsékelt égövi faj számára fontos extra-mediterrán menedékterületül

szolgáltak (Kotlík és mtsai. 2006, Pecsénye és mtsai. 2016, Schmitt & Varga 2012, Theissinger és mtsai. 2013). A gleccser visszahúzódását követően az éghajlat felmelegedése a szalamandrákat Magyarország alacsonyán fekvő hegységeinek magasabb régióiba mozgatta, földrajzilag elválasztva egymástól ezeket a marginális populációkat; ez a hatás nem következett be a magasabb fekvésű fő kárpáti hegyvonulatokban. A földrajzi és genetikai elszigetelődés tovább folytatódik a populációk antropogén tényezők miatti fragmentálódásával, különösen a Budai-hegység területén, amely jó példa arra, hogy az urbanizáció hogyan sodorja a kihalás szélére a kétélűpopulációkat.

A *S. salamandra* mikroszatellita-markerek által megrajzolt genetikai mintázata nagyon hasonlít a bükk (*Fagus sylvatica*, Linnaeus 1753) evolúciós történetére. Fossilis és genetikai adatokra alapozva Magri és mtsai. (2006) három jelentős menedékterületet határozott meg, ahonnan a populációk újra benépesíthették Közép-Európát. Az egyik menedékhely Szlovénia és az Isztriai-félsziget területén lehetett, ahonnan a bükk a Keleti-Alpok és Nyugat-Magyarország felé terjedhetett vissza. Dél-Csehország területe lehetett a Kárpátok bükkpopulációinak származási helye, a Bihar-hegységet pedig elszigetelt refúgiumként jellemezték, ahonnan a populációk nem terjedtek tovább.

Számos kontinentális faj elterjedését nem csak az alacsony hőmérséklet, hanem a pleisztocén jégkorszakok alatti csapadékhiány is korlátozta (Schmitt 2007). Ez igaz lehet a foltos szalamandrára is, amely a rendkívül hideg telekkel jellemezhető magashegységekben terjedt el (Cogălniceanu és mtsai. 2013). Így az Alpok és a Kárpátok, valamint a Kárpát-medencében kialakult mozaikos erdősztyepp vegetáció (Varga 2010), mint a hidegtűrő fajok legfontosabb menedékterületei megfelelő éghajlati és élőhelyi feltételeket biztosíthattak a foltos szalamandra-populációk számára az utolsó eljegesedési időszakban.



3. A barlangi vakgöte (*Proteus anguinus*) környezeti DNS-alapú kimutatása és populációstruktúrája a Balkán-félszigeten

A barlangi vakgöte, *Proteus anguinus* Laurenti, 1768, (Caudata: Proteidae) (25. ábra), az elsőként leírt barlangi állatfaj, és az egyetlen európai troglobiont (teljes mértékben a barlangi környezethez alkalmazkodott) gerinces faj. A Dinári-hegység szubterrán karsztrendszerében él az olaszországi Trieszt környékétől, Szlovénián és Horvátországon keresztül Bosznia-Hercegovináig (Kletecki és mtsai. 1996, Sket 1998). Betelepített állományai élnek a Francia Nemzeti Kutatóközpont (CNRS) földalatti laboratóriumának barlangrendszerében, és egy kisebb állománya található a németországi Hartz tartomány egy barlangjában (Parzefall és mtsai. 1993). Troglomorf tulajdonságai (Dumas & Chris 1998, Schlegel & Bulog 1997), hosszú élettartama (Voituron és mtsai. 2011), ökológiája (Durand & Delay 1981) és viselkedése (Uiblien és mtsai. 1992, Durand & Parzefall 1987) miatt a barlangi vakgöte már régóta vonzza a kutatók figyelmét. A faj védett Olaszországban, Szlovéniában és Olaszországban, az IUCN vörös listáján a veszélyeztetett fajok közé sorolják (Arntzen és mtsai. 2009) és 19. helyen szerepel az EDGE of Existence program listáján (a Londoni Zoológiai Társaság (ZSL) által vezetett globális természetvédelmi kezdeményezés, amelynek célja, hogy azonosítsa a világ evolúciós szempontból legkülönlegesebb és globálisan veszélyeztetett fajait (<http://www.edgeofexistence.org/>)) (Safi és mtsai. 2013).

A *Proteus* egy monotipikus nemzetség, amely a monofiletikus Proteidae családon belül mintegy 55,8 millió évvel ezelőtt differenciálódott legközelebbi rokonaitól, az észak-amerikai barázdásgötéktől (*Necturus*) (Zhang & Wake 2009). A *Proteus* nemzetség evolúciós történetéről a mai napig keveset tudunk. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy az elterjedési területén a Dinári-karszt különböző hidrográfiai területei között a barlangi vakgöte állományok között jelentős genetikai (mtDNS) különbség van (Gorički & Trontelj 2006, Trontelj és mtsai. 2007, 2009). A térben és időben eltérő kolonizációs események magyarázhatják a faj jelenlegi elterjedését és genetikai divergenciáját, hasonlóan ahhoz, amit az *Asellus aquaticus* esetében is megfigyeltek az északnyugat-Balkánon (Sket 1997, Verovnik, Sket & Trontelj 2004). A barlangi populációk közötti genetikai eltérés nagyobb volt, mint a felszíni formák közötti, mivel a különböző barlangrendszerek között nincs génáramlás (Bradic és mtsai. 2012).



25. ábra. Barlangi vakgöte, *Proteus anguinus*. Fotó: Dušan Jelić.

A faj evolúciós történetét az teszi izgalmassá, hogy délkelet Szlovéniában létezik egy pigmentált, funkcionális szemekkel rendelkező állománya (Bizjak Mali & Sket 2019, Gorički & Trontelj 2006, Ivanović és mtsai. 2013, Sessions és mtsai. 2015). A fekete színű barlangi vakgöte is szubterrán életmódú, de gyakran fordul elő karsztforrásokban, és inkább a felszínhez közeli élőhelyeket kedveli (Culver & Pipan 2014). Fosszilis leletekre alapozva nagy valószínűséggel az ősi *Proteus* gőték a jelenleginél jóval szélesebb elterjedésűek voltak Euráziában (Estes & Darevsky 1977, Venczel & Codrea 2018), és felszíni vizekben fordultak elő (Venczel & Codrea 2018). Bár a *Proteus* teljesen eltűnt a felszíni vizekből, feltételezhető, hogy az őse éjszakai életmódú és a fekete színváltozatú vakgötéhez hasonló morfológiával rendelkezhetett. Recknagel és mtsai. (2023) mtDNS és genomszintű SNP-vizsgálatok alapján azt valószínűsítette, hogy a *Proteus* ősi, felszíni formája egy lépéses tranzíció során alakult át a barlangi formává, majd egy újabb evolúciós lépéssel alakult vissza a fekete színváltozatú formává. A felszíni populációk eltűnését a pliocén száraz időszakához és a pleisztocén ciklikus eljegesedéseikhez kötik, csakúgy, mint számos egyéb édesvízi csoport esetében (Harzhauser & Mandić 2010).

3.1. A barlangi vakgöte környezeti DNS-alapú kimutatása

A szubterrán fauna megfigyeléséhez, különösen a ritka vagy nehezen hozzáférhető fajok esetében, elengedhetetlenek a hatékony felmérési módszerek. Mivel a barlangi élőhelyeken a hagyományos felmérési technikák gyakran nem alkalmazhatóak, érzékenyebb és kevésbé inváziós módszerekre van szükség (Jerde és mtsai. 2011). Az élőlények környezeti DNS (eDNS)-alapú kimutatását jelenleg széles körben alkalmazzák vízi környezetben, de a gerinces fajok elterjedésének felmérésében rejlő előnyeit kevesebb, mint két évtizeddel ezelőtt ismerték csak fel (Ficetola és mtsai. 2008). Azóta az eDNS alkalmazása népszerűvé vált (Rees és mtsai. 2014), különösen, hogy genom- és közösségi-szintű szekvenálási módszerekkel való párosítása bonyolultabb biológiai kérdésekre is választ adhat (Cristescu 2014, Shaw és mtsai. 2016, Takahashi és mtsai. 2023, Thomsen és mtsai. 2012a). Nagy érzékenységének és specifikusságának köszönhetően a módszer különösen előnyös a ritka vagy szaporodási időszakon kívül nehezen észlelhető kétélűfajok kimutatására (Dejean és mtsai. 2011, Ficetola és mtsai. 2008, Goldberg és mtsai. 2011, Pilliod és mtsai. 2014, Thomsen és mtsai. 2012b). Az eDNS-módszer kivételesen hasznos a szubterrán kutatásokban, mert lehetőséget teremt a nehezen megközelíthető élőhelyeken előforduló állatok felmérésére.

Irodalmi adatok, hagyományos felmérési módszerek (például a vizuális felmérésen alapuló megfigyelések), barlanglátogatások, barlangi búvárok által végzett felmérések vagy barlangi áradáskor felszínre mosott példányok alapján Horvátországban 76 barlangból ismerik ezt az emblemikus fajt (Jelic és mtsai. 2012). Mivel ez csak egy kis töredéke az országban található mintegy 7000 barlangnak (Božić 2014) - amelyek többsége ember számára megközelíthetetlen -, a *P. anguinus* valószínűleg az eddig ismertnél jóval elterjedtebb. Vizsgálatunk célja volt egy hatékony eDNS-alapú módszer kidolgozása a barlangi vakgöte kimutatására és ismert vagy feltételezett előfordulási helyek mintavételezése a Dinári-karszt barlangjaiból Horvátországban, hogy a faj megőrzéséhez egy nem-inváziós módszert tegyünk elérhetővé.

Módszerek

Markerfejlesztés

Első lépésben fajspecifikus primereket terveztünk a mitokondriális DNS kontroll-régiójának 60-80 bázispár hosszú szakaszára az NCBI Genbankban található összes elérhető, a faj ismert elterjedési területét lefedő, *P. anguinus* szekvencia (DQ494754.1 - DQ494786.1) felhasználásával. Hogy csökkentsük a barlangi vakgötével együtt potenciálisan előforduló kétélűfajok DNS-ével való keresztamplifikáció esélyét, a primerek kötőhelyeinek kiválasztásakor figyelembe vettük a foltos szalamandra (*Salamandra salamandra*) (EU880331.1), sárgahasú unka (*Bombina variegata*) (AY971143.1) és barna varangy (*Bufo bufo*) (EU627147.1) kontroll-régióit. A szekvenciákat a BioEdit szoftver 7.0.9.0 verziójával

(Hall 1999), kézzel illesztettük össze. A megfelelő primerpár kiválasztása során a primerek specifikusságát az ecoPCR szoftverrel (Ficetola és mtsai. 2010) „in silico” ellenőriztük a következő kritériumok alapján:

- 1) csak három eltérést engedélyeztünk a primerek és a célszekvenciák között,
 - 2) a primerek 3' végén két tökéletes illeszkedésű nukleotidot engedélyeztünk, és
 - 3) az amplikonok minimális és maximális számának 50 illetve 1500 bázispárt állítottunk be
- A legmegfelelőbb, általunk „mini-bárkód”-nak nevezett primer párt (Paf8 5'-GTGGCATATATAAATCTATATGTC-3' és Par8 5'-TRTTATTCGTTTTCTCTAGAG-3') amely egy 64 bázispár hosszú fragmentumot szaporított fel, ezután több lépésben teszteltük. A kiválasztott oligonukleotidok fizikai-kémiai paramétereinek kiszámításához az OligoCalc (Kibbe 2007) programot használtuk. A 64 bp hosszú *Proteus* célszekvencia specifikusságát az NCBI-GenBank Blast funkciójának (Altschul és mtsai. 1990; Benson és mtsai. 2009) segítségével értékeltük.

A primerek „in vitro” tesztelése

A horvátországi Miljacka-barlangból származó *Proteus* szövetmintákból DNS-t izoláltunk a QIAamp DNAMicrokit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártó utasításait követve. Ugyan ezt a módszert alkalmaztuk a gőtével egy élőhelyen leggyakrabban előforduló halfajok (*Phoxinus phoxinus* és *Squalius illyricus*) és azon kételtűfajok (*Bufo bufo*, a *Bombina orientalis* és a *Salamandra atra*) DNS-izolálására, amelyek a leggyakoribbak azokon a területeken, ahol a gőte a felszín alatti vizekben előfordul, és amelyek esetében a legnagyobb az esélye a forrásvíz „szennyezésének”. A PCR-reakciók részletes leírását lásd Vörös és mtsai. 2017 tanulmány 14. oldalán.

A módszer „in situ” tesztelése

A módszer teszteléséhez első lépésben a zágrábi állatkert (Zágráb, Horvátország) akváriumából származó vízmintát használtuk. A mintázott 80 x 50 x 30 cm méretű akváriumban körülbelül 60 liter vízben tartottak egy egyed. A tesztelésbe egy a horvátországi Miljacka-barlangból gyűjtött vízmintát is bevontunk, ahol a *Proteus* jól ismert, jelentős állománya él. A 2 liter vízmintát HydroTech vákuumszivattyúval (Biorad, Hercules, USA) steril 0,45 µm-es cellulóz-nitrát szűrőpapíron (Kipszer Paraplan, Budapest, Hungary) szűrtük le. A szűrőt apró darabokra vágtuk és steril elszívófülke alatt megszáritottuk. A DNS izolálását a fent említett módon végeztük a gyártó protokolljának kisebb módosításával, kétszeres mennyiségű ATL puffer, proteináz K, AL puffer és etanol hozzáadásával, valamint a proteináz-K emésztési lépés után QIAshredder oszlopok (Qiagen, Hilden, Németország) használatával.

A fragment-elemzés érzékenységének fokozása érdekében a Goldberg és mtsai (2011) által javasolt stratégiát alkalmaztuk és a forward primert fluoreszcens festékkel (FAM) jelöltük meg. Az amplifikációt követően 1 µl PCR-terméket GS500 méretstandarddal és Hi-Di Formamiddal (Applied Biosystems, Foster City, USA) kevertünk, és egy ABI3130 Genetic Analyzer gépen (Applied Biosystems, Foster City, USA) futtattunk le. A 60 bp hosszúságú fragmentet a GeneMarker v.1.80 szoftver (Softgenetics, State College, USA) segítségével azonosítottuk. Mivel a célfragment hossza a Sanger-módszer felbontóképességének alsó határán volt, az amplifikált termék megerősítése nem volt lehetséges direkt szekvenálással, ezért a fragmentumot a pGEM-T Easy plazmidvektorba klónoztuk (Promega, Madison, USA), majd újraszekvenáltuk. Minden egyes minta esetében négy PCR-ismétlést végeztünk. A kimutatás érzékenységét ismert mennyiségű *Proteus*-DNS hígítási sorozatán is teszteltük (1X (50 ng/µl), 10X (5 ng/µl), 100X (0,5 ng/µl), 1000X (0,05 ng/µl) és 10000X (0,005 ng/µl)).

A módszer alkalmazása terepi mintákon

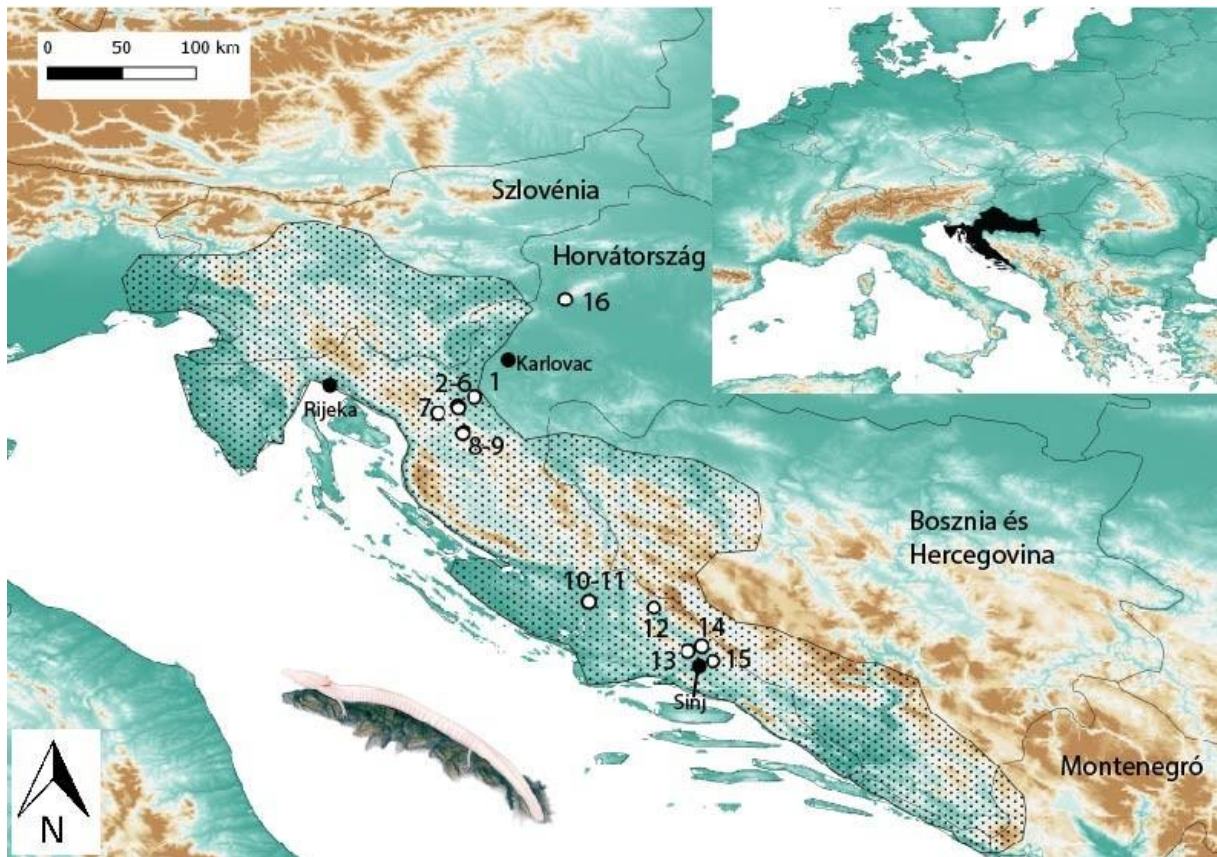
Horvátország 15 barlangjából gyűjtöttünk vízmintákat 2014 nyarán, amellyel lefedtük a főbb régiókat, ahol a faj irodalmi vagy friss észlelési adatok alapján előfordul vagy potenciálisan előfordulhat (Fitzinger 1850, Gottstein Matočec és mtsai. 2002, Kovačević 1984). A 15 mintavételi helyszínt úgy választottuk meg, hogy mindegyik egy különálló barlangrendszer képviseljen (26. ábra, 8. táblázat). A mintákat vagy a barlang belsejében található vízből, vagy ha ez nem volt megközelíthető, akkor a felszíni forrásból vettük, ahol a víz elhagyta a barlangot. Mind a 15 helyszínen kétféle mintavételi módszert alkalmaztunk. Először, a kicsapás módszerhez 15 ml vizet merítettünk, amit 5-ször ismételtünk. Ezeket 5 x 50 ml-es Falcon-csővekbe gyűjtöttük, összekevertük 3 M nátrium-acetát és 33 mL abszolút etanol-oldattal (Ficetola és mtsai. 2008). A mintákat azután laboratóriumba szállítottuk és feldolgozásig -20 °C-on tároltuk.

A kicsapódott DNS és/vagy sejttörmelék visszanyerésére a Falcon-csőveket 10 °C-on, 8000 g-vel centrifugáltuk egy órán keresztül. A fölülúszót óvatosan eltávolítottuk, és a maradék 5 ml mintán 10 °C-on, 10 percig, újabb centrifugálást végeztünk. A fölülúszót újra eltávolítottuk, és a maradék egy mL mintát átpipettáztuk egy új 1,5 ml-es csőbe és 10 °C-on, 10 percig egy utolsó centrifugálást végeztünk. Miután a fölülúszó nagy részét eltávolítottuk, a csőben maradt oldatot szobahőmérsékleten kiszáritottuk, hogy a maradék EtOH elpárologjon. Ezután QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk a DNS-t. A DNS-amplifikációt és a fragmentelemzést az „A módszer „in situ” tesztelése” című fejezetben taglaltak szerint végeztük.

Ezzel párhuzamosan minden helyszínen 2 liter vízmintát gyűjtöttünk steril műanyag tartályokba, és a szűrősig jégen tároltuk. A szűrést a gyűjtéstől számított legfeljebb egy órán belül elvégeztük egy közeli szálláshelyen. Minden egyes szűrőpapírt 96%-os etanolban külön steril 2 ml-es csővekbe helyeztünk, és feldolgozásig -20 °C-on tároltuk. Miután a szűrőpapírt apró darabokra vágtuk és sterilizált elszívófülke alatt megszáritottuk, a fent részletezett DNS-kivonási, DNS-amplifikációs és a fragmentelemzési protokollok alapján dolgoztuk fel.

Minőségi és negatív kontrollok

Annak érdekében, hogy elkerüljük a keresztszennyeződést a terepi mintavételek során, a mintavételi helyszínek között az eszközöket EtOH-val és lánggal (olló és csipesz) vagy Alconox (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oldat (szűrőberendezés) segítségével fertőtlenítettük, majd csapvízzel előblítettük. Negatív mintavételi helyszíneként a Zágráb melletti Veternica-barlangból (Medvednica-hegység) vett vízmintát használtuk (16. minta a 8. táblázatban), amely nem része a Dinári-karsztrendszernek, és messze kívül esik a faj elterjedési területén. Minden egyes DNS-izolálás alkalmával 2 liter steril vizet szűrtünk át steril szűrőpapíron, amelyet a többi mintával párhuzamosan dolgoztunk fel. Minden reakcióban szerepelt negatív extrakciós kontroll, negatív PCR kontroll (azonos reagenskészletet használva, de templát helyett 1 µl steril vizet adtuk a reakcióhoz) és pozitív PCR kontroll (10 ng/µl *Proteus*-szövetmintából izolált DNS-oldat).



26. ábra. A 16 mintázott barlang Horvátország területén. A lelőhelyszámok megegyeznek a 8. táblázatban foglaltakkal. A jobb felső sarokban látható Horvátország (feketével) elhelyezkedése Európában. A pöttyözött terület a faj elterjedésének határait mutatja. *Proteus* rajz: Marija Crnčec.

Statisztikai módszerek

A barlangok foglaltsági valószínűségének (occupancy probability – OP) és kimutathatósági valószínűségének (detection probability – DP) becsléséhez hierarchikus foglaltsági modellt használtunk (Schmidt és mtsai. 2013). A modell több vízmintát és vízmintánként több PCR-t használ, hogy a kimutatási valószínűséget két összetevőre bontsa. Az első összetevő az eDNS elérhetőségi valószínűsége a vízmintában, a második összetevő pedig a PCR-ben való kimutathatósági valószínűség (Schmidt és mtsai. 2013). Mindkét valószínűség hozzájárul a hamis negatív hibaarányokhoz. A WinBUGS Bayes-szoftverrel és a ^aR2WinBUGS^o R-csomaggal illesztettük a modellt az adatokra. A WinBUGS és az R-kódokat Schmidt és mtsai. (2013) tanulmánya alapján alkalmaztuk, és az elemzést a Kéri és mtsai. (2012) tanulmányban ajánlott módon végeztük, egységes bizonytalan priorokat (uniform vague priors) (Schmidt és mtsai. 2013) használva. Az OP és DP modellezését a módszer funkciójaként végeztük (kicsapás vs. szűrés). A felhasznált adatsor a Vörös et. al 2019, S1 táblázatában elérhető.

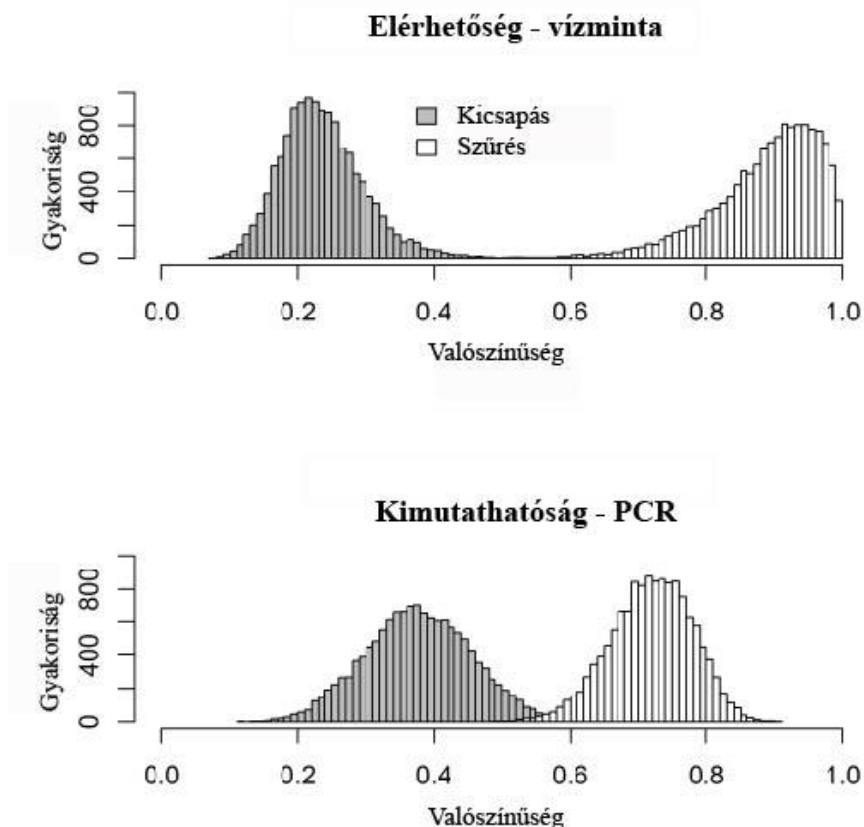
Pop.	Barlang vagy víztest neve	Helysége	Hidrogeológiai szerep	Lat.	Long.	Kicsapás	Szűrés
1	Tounjčica Izvor špilja Rupečica, Ponor Rupečica -	Tounj	Forrás, barlang	45.24	15.32	1/20	1/4
*2	Zeleno jezero	Zagorje,Ogulin	Forrás, víznyelő	45.18	15.22	1/20	-
*3	Zeleno jezero	Zagorje,Ogulin	Forrás, víznyelő	45.18	15.22	1/20	3/4
*4	Izvor Bistrac Izvor Zagorske	Desmerice, Ogulin	Forrás	45.19	15.22	-	1/4
*5	Mrežnice	Desmerice, Ogulin	Forrás	45.19	15.22	-	3/4
*6	Klisura	Perakovići, Ogulin Drežničko field,	Víznyelő	45.18	15.22	1/20	4/4
7	Zečev studenac Markarova	Drežniča	Forrás	45.14	15.10	-	1/4
*8	špilja Izvor u Stajničkom	Stajnica,Jezerane Stajničko field,	Időszakos forrás	45.03	15.25	14/20	4/4
9	polju	Stajnica	Forrás Barlang és	45.02	15.25	-	1/4
*10	Miljacka II Špilja kod mlina	Kistanje, Šibenik	időszakos forrás	44.00	16.01	2/20	4/4
*11	na Miljacki	Kistanje,Šibenik	Barlang	44.00	16.01	1/20	3/4
12	Vukovića vrelo Goručica, izvor	Cetina, Cijvljane	Forrás	43.96	16.41	-	4/4
13	potoka	Sinj	Forrás	43.70	16.61	1/20	4/4
14	Kosinac	Han, Sinj	Forrás	43.73	16.70	-	4/4
*15	Izvor Grab	Grab, Trilj Medvednica,	Forrás	43.64	16.77	2/20	3/4
16	Veternica	Zagreb	Barlang	45.84	15.87	-	-

8. táblázat. Mintavételi helyek, a mintázott víztestek hidrogeológiai szerepe, földrajzi koordináták, és a pozitív/összes mintaszám mindkét módszer esetén. A csillaggal* megjelölt lelőhelyeken a *Proteus* előfordulását irodalmi adatok bizonyítják vagy nemrégiben észlelték a fajt vizuális megfigyeléssel. A felméréseket barlangi búvárok végezték.

Eredmények

Annak ellenére, hogy a 64 bp-os célszekvencia rövidebb volt, mint az ajánlott 90 ± 120 bp (Pilliod és mtsai. 2013), mind az in silico, mind pedig az in vitro tesztek a primerek specifikusságát mutatták. A fluoreszcens jelölésű primerekkel végzett PCR pedig egyértelműen kimutatta a felszaporított génszakaszt (Vörös és mtsai. 2017, 2. ábra). A szekvenálással történő validálás során a 64 bp-os fragmentumot sikeresen klónoztuk az eDNS-mintákból, és a *Proteus*-specifikus génszakasz kiolvasható volt a plazmid-szekvenciából (Vörös és mtsai. 2017, S1 ábra). A klónozás során sem primer-dimereket, sem nem-specifikus szekvenciákat nem észleltünk. Az általunk keresett génszakasz 10000-szeres (0,005 ng/μl) DNS-koncentrációig kimutatható volt. A barlangi vízmintákból sikeresen felszaporítottuk a *Proteus* DNS-ét 9 helyről a kicsapásos, és 14 helyről a szűrési módszerrel (8. táblázat), és egyszer sem mutattuk ki a *Proteus* DNS-ét a negatív lelőhelykontrollból, a negatív extrakciós vagy negatív PCR-kontrollból.

A hierarchikus foglaltsági modell (Schmidt és mtsai. 2013) segítségével végzett statisztikai elemzés azt mutatta, hogy mind az OP és a DP a mintavételi módszertől függött (27. ábra). Az utólagos (poszterior) eloszlások kis mértékben fedték egymást. Az elérhetőség 3,78-szor nagyobb volt a szűrési vett mintákban, mint a falkoncsóbe gyűjtött mintákban, és a PCR kimutathatóság 1,90-szer nagyobb volt a szűrési vett minták esetében, mint a falkoncsóbe gyűjtött minták esetében (kicsapás). A modell szerint az elfoglalt barlangok becsült száma 15 volt (95%-os konfidencia intervallum: 15 ± 15 ; véges mintabecslés alapján (Royle & Kéry 2007)).



27. ábra. A modell-paraméterek utólagos eloszlása az elérhetőségi és a kimutathatósági valószínűségekre mindkét módszer esetében.

Diszkusszió

Munkánk során sikeresen kifejlesztettünk egy nem-invázív módszert a veszélyeztetett és nehezen megfigyelhető *Proteus anguinus* kimutatására, környezeti-DNS felhasználásával. Bár a DNS-metabarkódolás alkalmazása több céltaxon egyidejű kimutatására alkalmas és jóval költséghatékonyabb (Thomsen & Willerslev 2015), mivel a *P. anguinus* DNS-ének környezeti mintából való azonosításához nagyfokú specifikusságra van szükség, egy fajt célzó és egy markerrel történő kimutatás mellett döntöttünk. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a környezeti viszonyok, a biomassa és az egyedek produkciós rátája erősen befolyásolják a kimutathatóságát (Klymus és mtsai. 2015, Pilliod és mtsai. 2014, Schmidt és mtsai. 2013). Barnes és mtsai (2014) áttekintették az eDNS jelenlétét befolyásoló környezeti tényezőket, és azt találták, hogy az abiotikus tényezők, pl. a hőmérséklet, az ultraibolya sugárzás és a fényerősség felgyorsítja a DNS degradációját. Az abiotikus és biotikus tényezők kimutathatóságra gyakorolt hatásai barlangi élőhelyeken nem ismertek, és csak nagyon kevés tanulmány vizsgálta az eDNS dinamikáját barlangokban (Hofreiter és mtsai. 2003). A *P. anguinus* által használt barlangok azonban nincsenek kitéve klimatikus ingadozásoknak, állandó sötétség uralkodik és alacsony a víz hőmérséklet, amely tényezők elősegíthetik az eDNS hosszabb ideig való fennmaradását, ellentétben a felszíni vizekkel.

Klymus és mtsai. (2015) kimutatta, hogy a halak (pettyes busa és fehér busa) esetében a nagyobb vízhozam akadályozhatja az eDNS kimutathatóságát áramló vizekből. Ezért fontos, hogy gondosan megválasszuk a mintavétel időpontját. A *Proteus* esetében az adott barlangrendszer vízszintjének előzetes ismerete szükséges az eDNS vizsgálatához. Előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy a természetes körülményekből adódó magas vízszint, mint pl. hóolvadás vagy főként tavasszal lezúduló heves esőzések, amelyek a szubterrán vízfolyások gyors áramlását eredményezik, csökkenthetik az eDNS kimutatásának esélyét (Gál 2013).

Továbbá, a *P. anguinus* alacsony energiaigényű gerincesnek számít, amely jól bírja a hosszú távú éhezést a hipogén környezetben tapasztalható szórványos táplálékellátás miatt (Hervant és mtsai. 2001), ráadásul lassabb a vedlési rátája is, mint a felszínen élő kétéltűeknek. Ez azért fontos tényező, mert a gerincesek esetében a vedlett sejtek az eDNS fontos forrásai (pilliod és mtsai. 2013), és egyes tanulmányok összefüggést találtak a vedlés mértéke és a nagyobb mennyiségű táplálékfelvétel között (Klymus és mtsai. 2015). Mivel a barlangokban korlátozott a táplálékforrás, kevesebb gerincesből származó úszó sejtet tartalmaz a víz, mint az epigén környezetben.

Amikor eDNS-alapú monitorozó munkát tervezünk, számos körülményt kell számításba vennünk. Ki kell választanunk a legjobb mintavételi módszert, és kitalálni a megfelelő ismétlések számát (pl. vízminták száma, PCR-ismétlések száma). Tanulmányunkban mi a kicsapási és a szűréssel történő módszerek hatékonyságát vizsgáltuk limitált mintavételi körülmények között. Azt találtuk, hogy habár magasabb PCR-ismétlést alkalmaztunk, a kicsapásos módszer hat lelőhelyről nem mutatta ki a faj jelenlétét, ahol a szűrési módszer egyértelmű pozitív reakciót adott. Ez megerősíti a sok más tanulmányban közölt tényt, hogy az eDNS-sel végzett kimutatások adhatnak fals negatív eredményt (Kéry & Schmidt 2008, Schmidt és mtsai. 2013). Ezért egy hierarchikus foglaltsági adatmodellt alkalmaztunk a detektálási hiba figyelembevételére (Schmidt és mtsai. 2013). A modell eredményei számszerűsítették a fals negatív arányokat (azaz a rendelkezésre állás és a felderítés valószínűségét) és statisztikailag megerősítették, hogy barlangi környezetben a *Proteus*-eDNS elérhetősége és kimutathatósági valószínűsége egyaránt a szűrés módszerrel magasabb, mint a kicsapásos módszerrel. Eredményeink arra is utalnak, hogy a detektálási hiba nagyjából ugyanolyan valószínűséggel fordul elő a vízmintázási fázisban, mint a PCR-reakció fázisban (27. ábra). Bár a hibaarányok alacsonyak a szűrési módszer alkalmazása esetén, fontosnak tűnik mindkét fázisban a megfelelő számú ismétlés beiktatása. Ezek az eredmények egybecsengenek más tanulmányokkal, amelyek azt találták, hogy folyóvizekben a szűrési, míg állóvizekben a kicsapásos módszerrel lehetett több DNS-t felszaporítani (Jerde és mtsai. 2011, Thomsen és mtsai. 2012a, 2012b). A szűrés sikeressége nagyban függ a DNS elérhetőségétől a környezetben (az intra- és extracelluláris-DNS aránya) és a nagyobb vízmennyiség által összegyűjtött esetleges inhibitorok jelenléte Herder és mtsai. 2014). Az eDNS mennyiségét befolyásolhatja az egyedsűrűség (Dejean és mtsai. 2011, Ficaretola és mtsai. 2008, Thomsen és mtsai. 2012b), de mivel a *Proteus* (és a legtöbb más szubterrán állatfajra) vonatkozóan hiányoznak ezek az adatok, nem állt módunkban ezt a tényezőt tesztelni. Összefoglalva, úgy véljük, hogy a lehető leggondosabban kell dolgozni mind a terepen, mind a laboratóriumban, hogy a lehető legkisebbre csökkentsük az észlelési hiba arányát. A tapasztalatok azonban azt mutatják, hogy a felmérések során szinte mindig van valamilyen szintű észlelési hiba, ami fokozottan igaz az eDNS-alapú felmérésekre (Kéry & Schmidt 2008, Schmidt és mtsai. 2013). Ezért javasoljuk a hierarchikus modellek alkalmazását az eDNS-adatokra, amelyek hasznosak lehetnek a fals pozitív hibaarányok becslésére is (Lahoz-Monfort és mtsai. 2016).

Gyakorlati szempontból a két mintavételi módszer (kicsapás és szűrés) közötti különbség az eDNS-minta fragmentdarabjaiban és a kiindulási vízminta térfogata között van, végeredményben pedig a végső, teljes DNS-mennyiségben, amellyel dolgozunk. A kicsapás módszer még az extracelluláris DNS-darabokat (általában $< 0,2 \mu\text{m}$) is képes összegyűjteni, de kis vízmennyiségből (15 ml). Ezzel szemben a szűrési módszer képes az eDNS-t százszor nagyobb kiindulási mintatérfogatban (2 L) keresni, de egy szűkebb, intracelluláris részecskeméret-spektrumra fókuszálva, a szűrő porusátmérőjétől függően. A fals negatív eredmények minimalizálása (amikor a faj jelen van a környezetben, de a használt módszer nem képes kimutatni azt) a ritka, veszélyeztetett és/vagy invazív fajok megfigyelése során az eDNS-vizsgálatok legnagyobb kihívása. Deiner és mtsai. (2015) összehasonlító tanulmányukban azt a következtetést vonták le, hogy a szűrési technika és a megfelelő DNS-izolálási módszer megválasztása hatékonyan csökkentheti ezt a problémát.

Az újonnan kifejlesztett eDNS-alapú módszerünkkel megerősítettük a *P. anguinus* jelenlétét tíz horvátországi barlangból, öt másikban pedig először mutattuk ki a fajt. Minden új lelőhely a *P. anguinus* általánosan ismert elterjedési területén belül található, de új adatot biztosít a faj jelenlétéről egyes barlangokban. Az 1. lelőhely (Tounčica), a 7. lelőhely (Zečev studenac) és a 9. lelőhely (Izvor u Stajničkom polju) a Gorski kotar (Karlovac és Rijeka közötti hegyvidéki terület) populáció részét képezik (26. ábra), amely a Zagorska Mreznica folyó medencéje körül összpontosul. Itt a *P. anguinus* jelenléte már régóta ismert, ezért az új előfordulási adatok nem okoztak akkora meglepetést. A 12. lelőhely (Vukovića vrelo) egyike a Cetina folyó két legfontosabb fő forrásának, és korábban barlangi bűvárok 105 m mélységig is lemerültek, de mostanáig a *Proteus* mégsem tudták kimutatni. A 14. lelőhely (Kosinac) ugyanezen folyó bal oldali kis mellékfolyójának egyik forrása. A bűvárok itt is keresték a fajt, de nem találtak egy egyedet sem. Mind a 12. és a 14. lelőhelyen is jelen van a *Salmo farioides*, a *Proteus anguinus* egyik ragadozója, ez lehet a magyarázata annak, hogy miért nem észlelték korábban a vakgőtét ezekben a barlangokban. Valószínűleg a barlangrendszer mélyebb részeibe húzódhattak vissza, ahol biztonságban vannak a nagyméretű halaktól és az ember számára sem megközelíthetőek. A 13. lelőhelyről (Goručica) a *Proteus* csak korai adatokból ismert, és itt a friss felmérések sem jártak sikerrel. A Goručica forrás jelentős emberi zavarásnak volt kitéve a közelmúltban, mivel ez lett Sinj város egyik fő ivóvízforrása. Ennek következtében a forrás nagy kövekkel telt fel, és teljesen megközelíthetatlenné vált. Eredményeink azonban azt mutatják, hogy a szubterrán rendszerben még mindig él *Proteus*. Ez az alpopuláció, amely a 12., 13. és 14. lelőhelyeket foglalja magában, az elszigetelt, Cetina- populációhoz tartozik.

A ritka vagy veszélyeztetett fajok természetvédelmi kezelési tervének kidolgozása érdekében megbízható és pontos elterjedési adatokra van szükség (Boitani és mtsai. 2011, Hoffmann és mtsai. 2010). Ezek az adatok lehetőségeket nyújtanak például a fajok elterjedésének modellezéséhez és az klímaváltozás fajokra gyakorolt hatásainak értékeléséhez. Ebben a tanulmányban egy olyan eszközt tettünk elérhetővé, amely segíthet a nehezen kimutatható *P. anguinus* új élőhelyeinek felkutatásában, ami aztán értékes adatokat szolgáltathat a faj védelméhez.

3.2. A barlangi vakgöte populációstruktúrája Horvátországban, és tíz variábilis, fajspecifikus mikroszatellita-marker fejlesztése

A mikroszatelliták hatékony molekuláris markerek a genetikai változatosság méréséhez (Bruford és Wayne 1993, Jehle és Arntzen, 2002, Sunnucks, 2000). Bár előnyeik miatt (pl. magas információtartalom, rossz minőségű minták felhasználhatósága) az egyponos nukleotid-polimorfizmus (SNP) markereket széles körben használják a populációgenetikai elemzésekhez, megvannak a korlátaik (pl. nagy adathalmazok bonyolult számítógépes elemzése vagy referenciagenom hiánya), ami a mikroszatellita-markerek alkalmazását erősíti, különösen a nem-modellfajok vizsgálatakor (Helyar és mtsai. 2011). Az újgenerációs szekvenálási technológiák forradalmával a mikroszatellita-markerek fejlesztése egyszerűbbé vált, ami a veszélyeztetett fajok populációgenetikai vizsgálatainak robbanásszerű növekedéséhez vezetett (pl. Adamson és mtsai. 2016, Faucher, Godé & Arnaud 2016, Gardner és mtsai. 2011). Ezek a taxon-specifikus markerek segítenek továbbá a populációk közötti genetikai távolságok leírásában, a globális klímaváltozás hatásának dokumentálásában, vagy olyan populációgenetikai mérőszámok becslésében, mint pl. a beltenyésztéses vagy túltenyésztéses leromlás, és megkönnyítik a veszélyeztetett fajok és populációk természetvédelmi kezelését (Frankham 2010). A közelítő Bayes-számítás (ABC) (Cornuet, Ravigné & Estoup 2010) alkalmazásával pedig ezek a markerek lehetővé tehetik, hogy különböző biogeográfiai elméleteket tesztelhesünk a fajok vagy populációk kialakulásának megértéséhez.

Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy 454-es szekvenálással variábilis mikroszatellita-markereket fejlesszünk ki a *P. anguinus* számára, és megkönnyítsük a faj konzervációgenetikai kutatását. A kifejlesztett markereket négy horvátországi *Proteus*-populáción teszteltük. Feltételeztük, hogy a hosszú ideje izolált populációk között nincs génáramlás, és jelentős

genetikai távolság van közöttük. Továbbá, ABC-elemzés alkalmazásával megpróbáltuk feltárni a négy horvátországi barlangi vakgöte-populáció közötti evolúciós kapcsolatot.

Módszerek

Mintavétel és laboratóriumi feldolgozás

A mikroszatellita-marker fejlesztéshez egy *P. anguinus* egyed mintáztunk a Miljačka II. barlangban (Šibenik, Dalmáciai régió). A populációgenetikai elemzéshez 96 egyed mintáztunk 4 különböző barlangból a Dinári-karszt területéről Horvátországban, 2013-2014 között (32 a Pincinova barlangból - Poreč, Istriai-félsziget, 26 a Rupečica-forrás és víznyeléből - Ogulin, Gorski Kotar régió, 32 a Markarova barlangból - Brinje, Lika régió, és hat a Vedrine forrásból - Sinj, Dalmácia régió) (28. ábra, 9. táblázat). A Rupečica és a Markarova barlangok kevesebb, mint 15 km-re vannak egymástól, és a Duna vízgyűjtő-területéhez tartoznak, míg a Pincinova, Miljačka II. és Vedrine barlangok teljes mértékben különálló rendszerek és a vizük az Adriai-tengerbe folyik.

A példányokat barlangi bűvárok fogták meg és hozták a "felszínre". A szövetminta vétele a barlangban, sötétben történt, hogy a mintavétel végeztével a bűvárok azonnal szabadon tudják engedni a példányokat. Steril ollóval 2 mm szövetet távolítottunk el a göte farokvitorlájából és 96% EtOH-ban tároltuk feldolgozásig. A DNS-izolálást Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával végeztük. Az izolálás után a DNS-t (nagyjából 1.6 mg) a Macrogen biotechnológiai vállalathoz (Szöul, Dél-Korea) küldtük random 454 pyroszekvenálásra és könyvtárépítésre. A visszkapott genomikai adatokat a MSATCOMMANDER v1.0.8 (Faircloth 2008) szoftverrel kutattunk mikroszatellita-lókuszek után. Ezekből kiválasztottuk a di-, tri- és tetranucleotidokat amelyekben legalább 10, 6 és 6 repetíciót találtunk. Mivel a farkos kétélűekben gyakori, hogy a polimorf nukleáris szekvenciák több kópiában vannak jelen (O'Neill és mtsai. 2013), leellenőriztük, hogy a forward és reverz primerek ne legyenek hasonlóak, nehogy bekössenek a genom hasonló régióiba. Összesen 120 lókuszt választottunk ki, és a MSATCOMMANDER segítségével primereket terveztünk amplifikációjukhoz. Mindegyik vizsgálni kívánt *Proteus*-populációból 3 egyed mintáztunk ki a primerek tesztelésére. A PCR-reakciók részletes leírását lásd Vörös és mtsai. 2019 tanulmány 213. oldalán. A kapott termékeket 2% agarózgélen futtattuk és variabilitásukat itt ellenőriztük. A 120 primerpárból 13 bizonyult variábilisnak, ezek forward primereihez fluoreszcens jelölést (FAM, VIC, NED) (10. táblázat) adtunk. A 13 lókuszt ezután mind a 95 egyed esetében amplifikáltuk. A fargmenthossz-elemzést egy Applied Biosystem/Hitachi 3130 Genetic Analyzer szekvenátoron futtattuk a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában. A fragmenthosszak leolvasását a Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) szoftverrel végeztük.

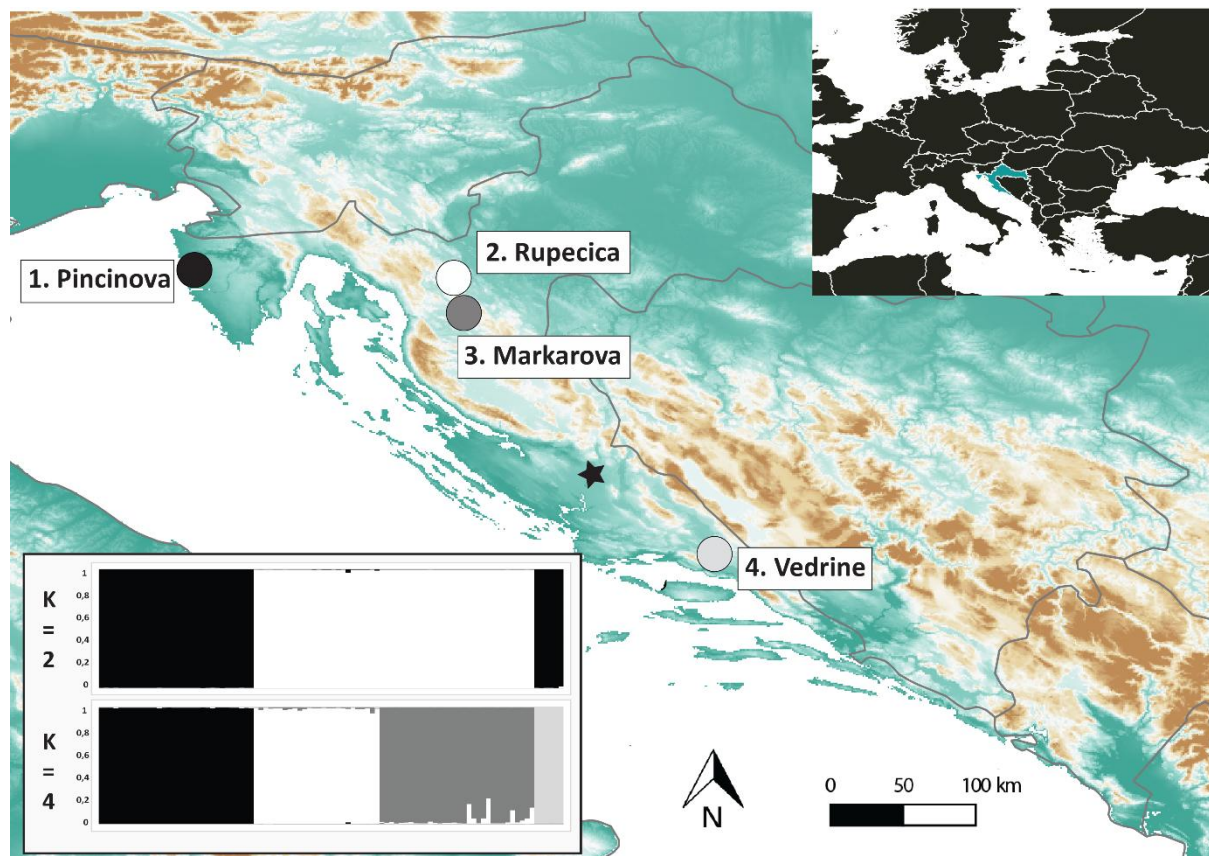
Populációméret felmérése

A populációméretet sáv-menti mintavétellel mértük fel négy év alatt. Mindegyik barlangrendszer évente négyszer látogattuk meg, júniustól szeptemberig alacsony vízállás mellett. A felmérés kezdete előtt mindegyik barlangban transzektvonalakat helyeztünk el (4mm vastag barlangáskötél) a barlang addig feltárt területeit lefedve. A Vedrine barlang kimaradt a felmérésekből, mert ez egy csupán időszakos forrás formájában hozzáférhető barlang, ahol a *Proteus* előfordulása a barlangi áradások során kimosott egyedek alapján ismert. A Pincinova, Rupečica és Markarova barlangokban minden alkalommal két professzionális barlangi bűvár végezte a felméréseket, követve a transzektvonalakat, feljegyezve minden észlelt egyed. Az egyik bűvár a merőleges távolságot mérte (legközelebbi méterig), a másik pedig biztosította a merülést. A protocol tervezése és a populációméret-becslés a DISTANCE 7.0 (Thomas és mtsai. 2010) szoftver segítségével történt.

Populációgenetikai elemzések

Allélszámot, allélfrekvenciát, várható és megfigyelt heterozigótaságot, és Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést (HWE) számoltunk a GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse 2012) szoftverrel, míg az allélgyakoriság (A_r) megállapítására az FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995) programot használtuk. A null allélok előfordulását MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout és mtsai. 2004) szoftverrel ellenőriztük minden egyes populációra és markerre. A lókuszok közötti kapcsoltsági egyensúlytalanság (LD) tesztelésére az FSTAT programot használtuk, 1,000 permutációt alkalmazva. A három nagy egyedszámú populáción belül (Markarova, Pincinova és Rupečica) az egyedek közötti rokonsági kapcsolatokat az ML-RELATE (Kalinowski, Wagner & Taper 2006) szoftverrel néztük.

A populációk közötti genetikai távolságokat (F_{ST}) és heterozigóta-hiányt (F_{IS}) az FSTAT programmal számoltunk. Filogenetikai rekonstrukciót a POPULATIONS 1.2.28 (Langella 1999) szoftverrel végeztünk, amely a Cavalli-Sforza és Edwards D_c távolságokon alapult (Cavalli-Sforza & Edwards 1967). Populációszerkezet-elemzést a STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly 2000) programmal futtattunk, modell-alapú klaszterező módszert és multi-lókusz genotípus-adatokat használva. Admixture modellt és független allélfrekvenciát állítottunk be, 10 ismétléssel, $K=1-8$ értékkel és 1,500,000 iterációval (500,000 levágva). A valid klaszterszámot először a legjobb Ln érték alapján állapítottuk meg, de alkalmaztuk Evanno és mtsai. (2005) módszerét is.



28. ábra. A négy vizsgálati hely Horvátországban. Bal alsó sarokban a STRUCTURE oszlopdiagram $K=2$ és $K=4$ esetén. Fekete csillaggal Miljacka II barlangot jelöltük, ahonnan a genomsekvenáláshoz gyűjtött minta származik.

Kolonizációs elméletek tesztelése

A különböző kolonizációs elméleteket az Approximate Bayesian Computation (ABC) elemzéssel teszteltük (DiyABC 2.1.0 szoftver, Cornuet és mtsai. 2010). Ugyan ezzel a szoftverrel állapítottuk meg a populációk szétválásának időpontját is (elemzés részleteit lásd Vörös és mtsai. 2019, 215. oldal). A következő három elmélet között próbáltunk meg differenciálni (30. ábra):

- 1) az összes populáció egyidőben vált szét egymástól;
- 2) a populációk egyidőben váltak szét, kivétel a Markarova és Rupečica, amelyek egy barlangrendszerhez tartoznak;
- 3) Markarova és Rupečica egy csoportot alkotva vált szét a Vedrine és Pincinova által alkotott csoporttól.

Eredmények

A 454-es szekvenálás 82915 génszakaszt eredményezett, és az MSTAT-COMMANDER 178 mikroszatellita-lókuszt talált. Ezek között hasonló mennyiségű di- és trinukleotid volt, de nagyon kevés (9) tetranukleotid. Az ismétlődések száma átlagosan 13 (minimum-maximum: 10-37) volt a dinukleotidok esetében, 7 a trinukleotidok esetében (6-11) és 6,9 a tetranukleotidok esetében (6-13). A 120 megtervezett mikroszatellita-lókuszból csupán három esetében nem kaptunk PCR-terméket. Az első tesztek után 23 lókuszt választottunk ki, ezeket fluoreszcens festékkel jelöltük meg. Végül 13 lókusztól bizonyosodott be, hogy polimorf, ezeket használtuk az összes egyed elemzéséhez.

A teljes adathalmaz esetében az allélok száma lókuszonként 2 (Pa68) és 14 (Pa52) között változott, a várható heterozigótasági értékek 0,000-0,505 közé estek (Vörös és mtsai. 2019, 2. táblázat). A Pa100 és Pa111 lókuszból két populációban, míg a Pa8, Pa31, Pa52 és Pa106 lókuszból egyetlen populációban mutattak null allélokot. A Pa100 és Pa111 lókuszból három populációban, a Pa106 esetében két populációban, a Pa8, Pa20, Pa48 és Pa52 esetében pedig egyetlen populáción belül volt HWE eltérés. Továbbá, a Pa88 és a Pa20 között szignifikáns LD-t találtunk. Ezért minden további populációgenetikai elemzést a Pa88, Pa100 és Pa111 nélkül, csak a fennmaradó 10 lókuszból felhasználásával végeztünk.

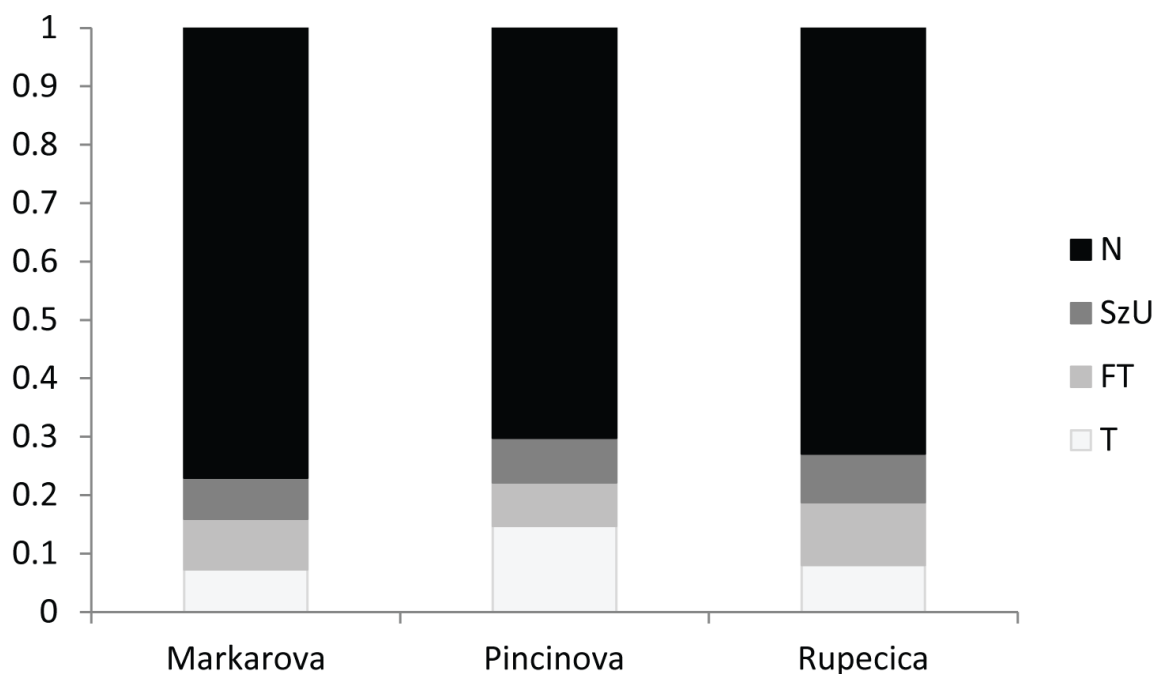
Populációk	N	Lat	Long	Populációsűrűség	Populációméret
Pincinova cave	32	45,28	13,63	1,12 – 1,38	235 – 291
Rupečica cave	26	45,18	15,22	0,45 – 1,08	113 – 269
Markarova cave	32	45,03	15,25	7,00 – 11,45	1820 – 2795
Vedrine cave	6	43,62	16,74	unknown	unknown

9. táblázat. Mintavételi helyek, mintaszámok (N), földrajzi koordináták (WGS84), populációsűrűség a transekt mentén felmérés alapján számolva (ind / 10 m²) és a becsült populációméret a barlang ismert területein.

A rokonsági kapcsolatok aránya mind a négy vizsgált populációban alacsonynak bizonyult; Markarova: átlag=0,15, range=0-0,75, Pincinova: átlag=0,16, mintaterjedelem (range)=0-0,84, Rupečica: átlag=0,12, range= 0-0,8. Elemzésünk azt mutatta, hogy az egyedek többsége nem volt rokon, és nagyon kevés egyed volt féltestvér, testvér vagy állt szülő-utód kapcsolatban (29. ábra). Az összes populáció genetikai diverzitását a Vörös és mtsai. 2019, 3. táblázat mutatja be. Globálisan a genetikai diverzitás alacsony (He 0,249 és 0,280 között) volt, és a populációk között nem volt statisztikai különbség (ANOVA Ho: F=0,78, p=0,513; He: F=0,03, p=0,993; Ar: F=0,05; p=0,985). A négy populáció közötti genetikai differenciáltság nagyon magas (0,306 és 0,7333 között) és szignifikáns volt. A genetikai differenciálódás értékelésére használt különböző módszerek azt mutatták, hogy a Markarova- és a Rupečica-barlangban szorosabb rokonságban álló populációk találhatóak, mint a többi vizsgált barlangban (11. táblázat). Hasonlóképpen, a STRUCTURE segítségével végzett szimulációk az Evanno és mtsai. (2005) módszerrel megállapítva két klaszter előfordulását javasolták, míg a legjobb Ln-értéket K=4 esetén figyeltük meg. A Markarova- és a Rupečica-barlangok egy csoportba kerültek a K=2 esetén, míg a négy populációt a legjobb Ln-értéket figyelembe véve az elemzés különálló klasztereknek tekintette (28. ábra). Érdekes módon K=4 esetén a Markarova-barlang néhány egyedének egy része (4 egyed több mint 10%-kal, egy egyed>20%-kal) a Rupečica-barlang egyedeivel közös klaszterbe került.

Populációk	N	Allélszám	Ar	Ho	He	F _{IS}
Markarova cave	32	2.700	1.8218	0.172	0.250	0.325
Pincinova cave	32	2.600	1.9546	0.314	0.280	-0.106
Vedrine cave	6	1.900	1.8354	0.385	0.265	-0.355
Rupečica cave	26	2.600	1.8162	0.251	0.249	0.009
Miljačka cave	1	NA	NA	NA	NA	NA

10. táblázat. A genetikai változatosság jelzőszámai a négy vizsgált *Proteus anguinus* állományban. N=egyedszám, N alleles=allélok száma, Ar=allélgyakoriság, Ho=megfigyelt heterozigótaság, He=várható heterozigótaság, F_{IS}=fixációs index. A szignifikáns értékeket vastagon szedve jelöltük.

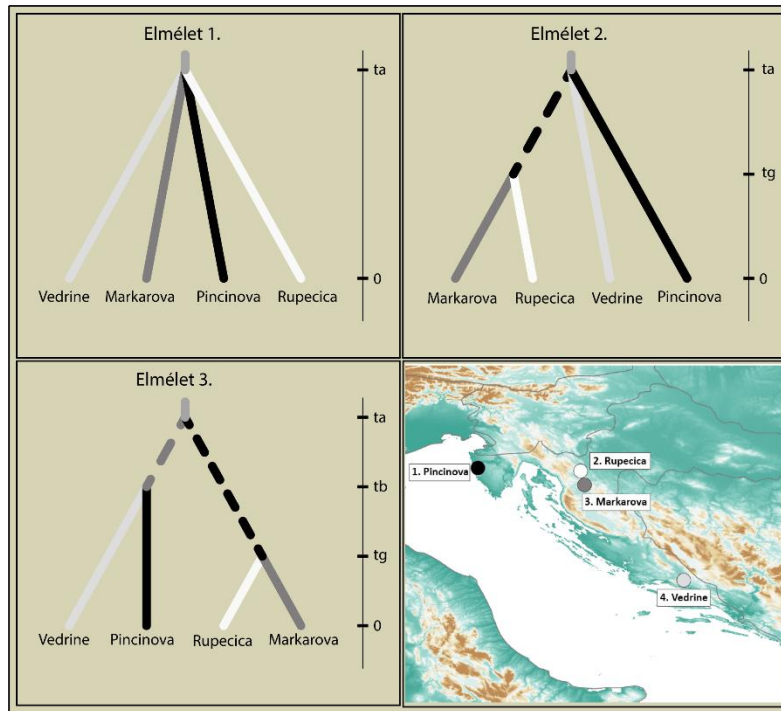


29. ábra. Egymással különböző rokonsági kapcsolatban lévő egyedek aránya. U=nem rokon, PO=szülő-utód, HS=féltestvér, FS=testvér

A DiyABC-vel végzett szimulációk szintén szoros kapcsolatot mutattak a Markarova- és a Rupečica-barlang populációi között, amelyeket körülbelül 13 500 generáció (95%-os konf. intervallum: 3 660-24 100 generáció), vagy 540 000 év (73 200 - 1 446 000) választott el egymástól. A forgatókönyvek összehasonlítása azt mutatta, hogy a 2. és a 3. forgatókönyv a legvalószínűbb, ezen belül a logisztikus megközelítés (logistic approach) a 3. forgatókönyvet választotta (a szimulációk 55,12%-a) (30. ábra). A Pincinova-barlang és a Vedrine-barlang szétválása nagyon régi (180.000 és 455.000 generáció között, tehát több millió év). Mind a négy vizsgált populáció effektív populációmérete hasonló értéket mutatott (10 500 és 17 500 egyed között), és ez a méret hasonló volt a Markarova- és a Rupečica-barlang klaszterezésekor is.

	Markarova	Pincinova	Vedrine
Markarova	0		
Pincinova	0.6926	0	
Vedrine	0.7331	0.6622	0
Rupečica	0.3062	0.6895	0.7333

11. táblázat. A négy *Proteus anguinus* állomány közötti páronkénti F_{ST} genetikai távolság-mátrix. A szignifikáns értékeket vastaggal szedve jelöltük.



30. ábra. A négy *Proteus*-populáció kialakulására felállított három elmélet, amelyet a DiyABC 2.1 (Cornuet és mtsai. 2008) szoftverrel teszteltünk.

Populációméret becslés

A sáv menti mintavétellel végzett populációfelmérés a Markarova-barlangban mutatta a legnagyobb egyedsűrűséget (7-11,45 egyed/10 m²), ennél jóval kisebbet a Pincinova-barlangban (1,12 - 1,38 egyed/10 m²) és a Rupečica-barlangban (0,45 - 1,08 egyed/10 m²) (Vörös és mtsai. 2019, 1. táblázat).

Diszkusszió

Tanulmányunkban a nehezen megfigyelhető barlangi életmódú farkos kétéltűfaj, a *Proteus anguinus* populációgenetikai jellemzését mutattuk be, nukleáris markereket felhasználva. Tizenhárom variábilis mikroszatellita-markert fejlesztettünk ki, amelyek közül tíz hasznosnak bizonyult az összes általunk vizsgált populáció genetikai diverzitásának becsléséhez. Ezzel eszközt biztosítottunk a konzervációgenetika számára, hogy a jövőben a faj más populációit is értékelni tudja.

Eredményeink azt mutatták, hogy a *P. anguinus* vizsgált négy populációja általánosságban alacsony genetikai változatossággal rendelkezik. Ez lehet egyes barlangi populációkra jellemző populációméret-csökkenés (Borowsky és Vidthayanon 2001), vagy ember okozta élőhelyszennyezés következménye, ahogyan azt például az *Asellus aquaticus* szlovéniai és olaszországi barlangi populációi esetében tapasztalták (Verovnik és mtsai. 2003). Az ipari szennyezés által érintett két populáció a nem szennyezett barlangokból származó többi

populációhoz képest (86-91%) a polimorf RAPD-fragmentumok csökkent százalékos arányát mutatta (49%). A környezetszennyezés a Dinári-karszt területén is jelentősen megterheli a szubterrán élőhelyeket (Jelić és mtsai. 2012).

Érdekes módon beltenyésztettség jeleit csak a Markarova-barlang esetében figyeltünk meg, ahol állomány nagyság-felméréseink a legnagyobb populációt valószínűsítették. Ezek a becslések azonban csak a barlang ismert szakaszaira vonatkoznak, és alábecsülhetik a teljes populáció méretét. Egy olyan fajnál, amely ilyen lassan válik ivaréretté (Voituron, és mtsai. 2011) és extrém helyhűség jellemez (Balázs, Lewarne & Herczeg 2015), azt várnánk, hogy az egy barlangon belül mintavételezett egyedek genetikailag hasonlóak. Ennek ellentmond az összes vizsgált populációban talált alacsony rokonsági kapcsolat aránya. Mind ez, mind pedig az ABC-elemzés eredményei népesebb populációkra és a barlangi vízrendszereken belüli lehetséges génáramlásra utalnak. Hasonló mintázatot figyelt meg Zakšek, Konec & Trontelj (2017), amikor a *P. anguinus* Postojna (Szlovénia) közelében található két hidrológiailag összekapcsolt barlang állományát vizsgálta. A két barlang között a *Proteus* hasonlóan alacsony genetikai diverzitást ($H_o=0,149-0,687$, $H_e=0,151-0,771$) és viszonylagos homogenitást mutatott (barlangok közötti variancia=0,24%, $F_{ST}=0,0024$, $P>0,05$), ami arra is utal, hogy a faj képes több kilométeres mozgásokra ugyanazon hidrológiai rendszeren belül. A négy horvátországi *Proteus*-populáció közötti markáns genetikai különbség érthető, figyelembe véve a szlovéniai barlangok közötti genetikai differenciálódásról, valamint a Dinári-karszt kialakulásáról és a barlangi fauna evolúciós történetéről szóló ismereteinket. A Pincinova-barlang az Istra-karsztvidékhez tartozik, a Rupečica- és a Markarova-barlang a Lika-karsztvidékhez, míg a Vedrine a Dalmácia és Hercegovina-karsztvidéken található (Sket 1997). Ez a három régió hidrogeográfiailag elszigetelt egymástól. Sket (1997) szerint az ősi Proteid göték a késő oligocén környékén hatolhattak be az elszigetelt Dinári-karsztvidékre a felszíni vizekből - valószínűleg a dinári tórendszer kialakulásához kapcsolódóan (Krstić és mtsai. 2003) - a felszíni vizekbe szétválva, jóval azelőtt, hogy a karsztosodás előrehaladt volna és a hipogén élőhelyekre való bevándorlás megkezdődött volna.

Sket és Arntzen (1994) nukleáris markerek (allozimek) felhasználásával négy szlovéniai lelőhelyről származó állomány szétválását kalibrálta, és azt találta, hogy valószínűleg az első *Proteus*-vonalak elkülönülése 9-5 millió évvel ezelőtt kezdődhetett. Ez összhangban van a mi eredményeinkkel, amelyekben a Pincinova-barlang (Istra karsztrendszer) és a Vedrine-barlang (Dalmácia és Hercegovina karsztrendszer) közötti szétválást néhány millió évre (7,2-18,2 Mya a miocénben), valamint a Markarova- és a Rupečica-barlang (mindkettő a Lika karsztrendszerben) közötti szétválást körülbelül 540 000 évre kalibráltuk. Ezt egészíti ki Recknagel 2023-ban megjelent friss tanulmánya, ami mtDNS- és SNP-markerek felhasználásával kilenc divergens genetikai vonalat különített el a fajon belül, és az első genetikai vonal (Istra-félsziget – ide tartozik a Pincinova barlang is) leválását 17-15 millió évvel ezelőttre teszi. A következő szétválási esemény során a Vedrine-barlangot magába foglaló Littoral genetikai vonal leválását 13 millió évvel ezelőttre becsüli.

A STRUCTURE-analízis által kimutatott genetikai keveredés a Rupečica és Markarova barlang közötti szoros (feltehetően múltbéli) kapcsolatára utal. Hasonló genetikai szerkezetet figyeltek meg ugyanebben a régióban (Lika karsztrendszer) Marčić és mtsai. (2011) az endemikus édesvízi halfaj, a *Telestes polylepis* Steindachner, 1866 tanulmányozása során. A teljes mitokondriális citokrom-b gén elemzését követően egy új fajt - *T. karsticus* Marčić és Mrakovčić, 2011 - írtak le a régió délnyugati részéből, beleértve a közeli Markarova-barlangot is. Annak ellenére, hogy a két lelőhely (Rupečica és Markarova) földalatti vízfolyásokon keresztül kapcsolódik egymáshoz, ami elméletileg lehetővé tenné a génáramlást, a két halfaj nem mutatott keveredésre utaló jelet. Az északi- és közép-Balkánon előforduló, a barlangi vakgötééhez hasonló elterjedésű *Telestes*-fajok (Buj és mtsai. 2017) közötti molekuláris kalibráció megerősítette az ABC-elemzésünk által megállapított diverzifikációs idősávot, még ha ezt a becslést óvatosan is kell kezelni.

3.3. Új, víz alatti mintavételi módszer kifejlesztése a barlangi vakgöte populációgenetikai vizsgálatához

A DNS-alapú elemzések az evolúcióbiológia és konzervációbiológia fontos eszközei. Amikor egy populációt jellemezni szeretnénk, elsőként a populációgenetikai paramétereit térképezzük fel. Az elmúlt évtizedekben tapasztalt jelentős módszertani fejlődéseknek köszönhetően kis mennyiségű és gyenge minőségű DNS-mintákból akár genomikai léptékben is gyűjthetünk információkat (Chiou és Bergey 2018, Helyar és mtsai. 2011, Perry és mtsai. 2010). Sok esetben a mintázott példány pusztulásával járó mintavételezés nem lehetséges, és még az invázív módszerek, köztük a szövet- vagy vérmintavétel sem elfogadhatók etikai (pl. veszélyeztetett, kisméretű populációk) vagy tudományos (pl. a mintázott egyedek zavarása torzíthatja az eredményeket) szempontból. Az elmúlt néhány évtizedben számos nem-invázív DNS-mintavételi módszert vezettek be, amelyek minimalizálják a vizsgált populációkra gyakorolt hatást (Lefort és mtsai. 2019), ilyen például a kihullott toll (Presti és mtsai. 2013), ürülék (Mannise és mtsai. 2018) vagy nyálkahártya (Domingues és mtsai. 2019) mintázása.

A legkevesebb zavarással járó, nem-invázív módszer az első alfejezetben (3.1) bemutatott környezeti DNS-en (eDNS) alapul. Itt ugyebár a környezetből vesznek mintát (pl. víz, talaj, levegő) a vizsgált egyedek helyett. A legmodernebb eDNS-megközelítések nem csak egy adott faj jelenlétének vizsgálatát, hanem a biológiai sokféleség értékelését is lehetővé teszik (Cristescu és Hebert 2018, Ruppert és mtsai. 2019). A jövőben elképzelhető, hogy az eDNS módszert széles körben fogják alkalmazni populációgenetikai kérdések megválaszolására is (Adams és mtsai. 2019), azonban ehhez még számos módszertani fejlesztés szükséges. Az egyedek mintavételére pedig továbbra is szükség lehet azokban az esetekben, ahol egyéb jellemzőket kell gyűjteni az adott példányról (Adams és mtsai. 2019). Az egyedek nem-invázív mintavételezése vízi környezetben azonban gyakran nem egyszerű, különösen a nehezen megközelíthető élőhelyeken, ahol ráadásul a mintavételezett egyedek ideiglenes mozgása vagy eltávolítása is elfogadhatatlan. Legjobb példa erre a víz alatti, barlangi élőhelyek, amelyek csak búvártechnikával érhetők el.

A barlangi vakgöte (*Proteus anguinus*) az IUCN alapján sérülékenynek minősül (Arntzen és mtsai. 2009), ökológiájáról és viselkedéséről rendkívül korlátozottak az ismereteink (Balázs és mtsai. 2020). Ezért nagy érdeklődésre tarthat számot egy olyan nem-invázív DNS-mintavételi módszer, amely az egyedek minimális zavarásával jár. A bőrnyálkahártyakenet vétele kételtűeknél a nem-invázív DNS-mintavételezés egyik elterjedt eszköze (Pichlmüller és mtsai. 2013, Ringler 2018).

Jelen tanulmányunkban egy nem-invázív, bőrkenetvételen alapuló DNS-mintavételi módszer kifejlesztését és tesztelését tűztük ki célul, amely búvárkodás közben, az egyed tartózkodási helyén, in situ alkalmazható. A cél egy olyan protokoll létrehozása volt, amellyel a minta gyűjtése és konzerválása rövid idő alatt (néhány percnél rövidebb idő alatt) elvégezhető, és amely megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t biztosít a populációgenetikai elemzésekhez. Egy ilyen módszer rendkívül előnyös lehet, mivel különböző vízi ökoszisztémákban - például víz alatti barlangokban vagy veszélyeztetett korallzátonyokon - és számos, a bőrfelületen nyálkával rendelkező taxonra is alkalmazható. Egy korábban genetikailag nem vizsgált hercegovinai barlangi vakgöte (*Proteus anguinus*)-populációt használtunk fel a módszer hatékonyságának bemutatására. További célunk volt az is, hogy a faj jelenleg ismert földrajzi elterjedésének legdélebbi határához közel elhelyezkedő populáció első populációgenetikai értékelését adjuk.

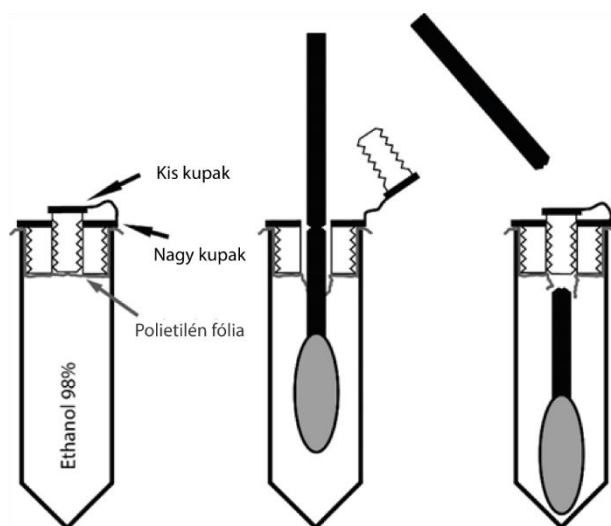
Módszerek

Terepi mintavétel

Vizsgálati populációnk a Vruljak 1 barlangban, Trebinje Gorica körzetében, Kelet-Hercegovinában található. Barlangi kutatók több mint 10 éve dolgoznak a területen, így ezt a populációt választottuk a viszonylag magas *P. anguinus* egyedsűrűség és a könnyű megközelíthetőség miatt. A barlangban 2016. május 07 és 11 között ötször merültünk (mindig

két személy egyszerre), és 22 kifejlett egyedét mintáztunk. Mivel ebben a populációban a felnőtt egyedek jelölve vannak (Balázs és mtsai. 2015, 2020a), ezzel az ismételt mintavételt elkerültük. Az egyik bűvár befogta az állatot, a másik pedig elvégezte a bőrtamponálást, amely kevesebb, mint egy percet vett igénybe, és jellemzően csak 20-30 másodpercig tartott (a folyamatról készült videót lásd Balázs és mtsai. 2020b elektronikus kiegészítő információk között). Minden állatot pontosan a befogás helyén engedünk szabadon.

A mintavételhez egy standard szájnyalókahártya mintavevő pálcát (Isohelix SK-2S, Cell Projects Ltd., Kent, Egyesült Királyság) használtunk, amelyet kissé módosítottunk három lépésben (31. ábra, Balázs és mtsai. 2020b, elektronikus kiegészítő file). Első lépésben a pamut mintavevő részt egy vékony selyemszállal rögzítettük a pálcához, hogy elkerüljük a pamut víz alatti leválását. Másodszor, a pálcát félbevágtuk a víz alatti könnyebb kezelhetőség érdekében (ez a pálcát végén található pamut mintavevő eppendorf csőbe töréséhez szükséges). Harmadszor, egy darab polietilén fóliát helyeztünk az etanollal töltött cső és a fedőkupakja közé (31. ábra), hogy a vízszennyezést és az etanol hígulását a minimális szinten tartsuk, miközben a fedőkupakot a víz alatt kinyitjuk a minta csőbe helyezésekor. A DNS-mintát tartalmazó pálcát a mintavétel után azonnal az etanollal töltött, dupla kupakkal ellátott csőbe helyeztük. A gyakorlatban 1) kinyitottuk a kis kupakot (31. ábra), és a pálcát végén lévő pamut mintavevővel átszúrtuk a polietilénfóliát, 2) a pálcát úgy törtük el, hogy a teljes minta a csőben maradjon, és 3) lezártuk a kis kupakot. Ezzel a technikával minimálisra csökkentettük a vízből történő kontaminációt és a hígítást.



31. ábra. Dupla-fedeles műanyag cső, a mintavevő pálcát és annak elhelyezése az etanolban a mintavétel során (sematikus rajz).

Mivel a nem-inváziós DNS-mintavételi módszerek az alacsony DNS-mennyiség miatt gyakran kérdéses eredményeket adnak (Broquet és mtsai. 2007, Ficetola és mtsai. 2019, Taberlet és mtsai. 1999), célunk az volt, hogy módszerünket egy nagyobb DNS-mennyiséget biztosító mintavételi technikával szemben validáljuk. Ezért egy egyedtől mintát gyűjtöttünk mind a fent részletezett pálcás módszerünkkel, és ezzel párhuzamosan egy interdentális kefe (Curaprox CPS Prime, Curaden AG, Svájc) segítségével is. Ez a módszer az érzékeny kétélűek bőrére gyakorolt hatása miatt félig inváziós tekinthető, de több DNS-t eredményez (lásd az eredményeket), ezért hasznos a mennyiségi problémák ellenőrzésére, amely az állatok jólétét minimálisan veszélyezteti. A mintákat az Eötvös Loránd Tudományegyetemre (Budapest, Magyarország) szállítottuk és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. 2017 júliusában a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában, a DNS-kivonásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on helyeztük el.

Laboratóriumi elemzések

A DNS-t a mintavevő pálcák pamut végéből a QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk a gyártó protokolljának megfelelően, és a proteináz-K emésztési lépés után a QIAshredder oszlopokkal (Qiagen, Hilden, Németország) tisztítottuk tovább. A DNS-koncentrációt NanoDrop1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mértük. Tíz fajspecifikus mikroszatellita-lókuszt egyedileg felszaporítottunk a Vörös és mtsai. (2019) tanulmányban részletezett laboratóriumi protokoll szerint. Egy korábbi, négy horvátországi *P. anguinus*-populáción végzett vizsgálat során (lásd 3.2 alfejezet) az allélok száma ezeken a lókuszon 2 és 14 között mozgott (Vörös és mtsai. 2019, 1. táblázat), a várható heterozigótási értékek pedig 0-0,505 között voltak (Vörös és mtsai. 2019). A polimeráz láncreakció (PCR) termékeit 1,4%-os agaróz gélen ellenőriztük. A fragmentumhossz-elemzést Applied Biosystem/Hitachi 3130 Genetic Analyzer szekvenátorral végeztük a FragmentAnalysis 36_POP7 protokoll szerint. A fragmenthosszak leolvasáshoz pedig a Peak Scanner v1.0 szoftvert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) használtuk. Annak tesztelésére, hogy vajon eredményeink nem a mintavétel során a környezetben jelen lévő *P. anguinus* DNS-sel való keresztkontaminációt tükrözik-e, a tíz mikroszatellita-lókuszt a pálcával vett mintákkal párhuzamosan a vízből izolált környezeti DNS-t mint templátot használva is amplifikáltuk. Ennek első lépéseként 3x1,5 liter barlangi vizet gyűjtöttünk ugyanarról a helyről, és a laboratóriumba szállítottuk. A környezeti mintákat a 3.1. alfejezetben bemutatott, Vörös és mtsai. (2017) tanulmányban közölt protokoll szerint gyűjtöttük és dolgoztuk fel. A *P. anguinus*-DNS jelenlétét minden egyes eDNS-mintából a mitokondriális kontroll régió 64 bp hosszúságú fragmentumának kimutatásával igazoltuk (Vörös és mtsai. 2017). A tíz mikroszatellita-lókuszt ezután ezeken a templátokon teszteltük, beleértve egy pozitív kontrollt (a horvátországi Markarova-barlangból befogott példányból származó, szövetmintából izolált DNS, amelyet 100%-os sikerrel amplifikáltunk (Vörös és mtsai. 2019)) és egy negatív kontrollt (ugyanazzal a reagenskészlettel, de templát helyett 1 µl steril vizet alkalmazva). A PCR-reakciót, a PCR-termékek ellenőrzését, a fragmenthossz-elemzést és az adatok leolvasását ugyanúgy végeztük, mint a 22 hercegovinai vakgöte-egyed esetében.

Statisztikai elemzés

A populáción belüli genetikai változatosság hiánya miatt (lásd Eredmények fejezet) nem lehetett alapvető populációgenetikai mutatókat számolni. A Vörös és mtsai. (2019) által már leközölt adathalmaz segítségével azonban össze tudtuk hasonlítani a mi populációnkát négy horvátországi populációval. A GENEPOP (Raymond és Rousset 1995) segítségével páronkénti F_{ST} -t számoltunk a populációk között. Az öt populáció távolság szerinti elkülönülését a Mantel-teszt (Mantel 1967) segítségével vizsgáltuk a páros $F_{ST}/(1-F_{ST})$ értékek és a páros földrajzi távolságok logaritmusának összehasonlításából az ISOLDE in GENEPOP on the Web program segítségével (Raymond és Rousset 1995). Az öt *P. anguinus*-populáció közötti genetikai szerkezet további értékeléséhez PCoA (főkoordináta) elemzést végeztünk a kovarianciamátrixból generált genetikai távolságmátrixon a GenAlEx 6.5 program (Peakall & Smouse 2006) alkalmazásával.

Eredmények

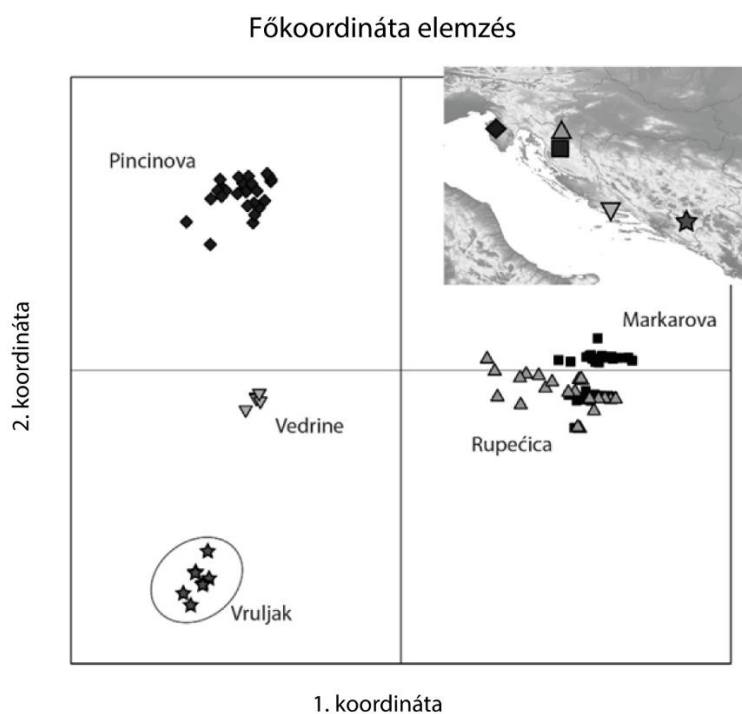
A 22 izolált DNS-minta spektrofotométerrel mért DNS-koncentrációja 15-73 ng/µl közé esett ($29,29 \pm 14,82$ ng/µl, átlag \pm SD). Az abszorbanciaarányok 1,69-2,12 (260nm/280nm) és 0,9-2,1 (260nm/230nm) között voltak. A 10 mikroszatellita-lókuszt PCR-reakciók 60-100%-a volt sikeres. Kilenc lókuszon tudtunk fragmenthossz-elemzést végezni, amelyek minden egyedben homozigóták voltak (Lásd Balázs és mtsai. 2020b - 1. táblázat). A kilenc allélból ötöt korábban már leírtak a *P. anguinus* esetében, három (Pa48, Pa52, Pa107) a leírt alléltartományon belül, egy (Pa106) pedig azon kívül volt (Vörös és mtsai. 2019) (Lásd Balázs és mtsai. 2020b, 1. táblázat).

Nem kaptunk amplifikált terméket a tíz mikroszatellita-lókuszra a környezeti DNS-t templátként használva, és a negatív PCR-kontrollok is tiszták maradtak. A pozitív PCR-kontrollból sikeresen amplifikáltuk a *P. anguinus* DNS-ét mind a tíz mikroszatellita-lókusz esetében. A szájnyálkahártya mintavevő-pálcával és az interdentális kefével történő mintavétel ugyanattól az egyedtől 73 ng/μl, illetve 503 ng/μl DNS-t eredményezett. Az interdentális kefével vett mintával is elvégeztük az összes lókusz amplifikációját, és ezek az amplifikációk számban és méretben pontosan ugyanazokat az allélokat adták, mint a szájnyálkahártya-minta. Az öt populáció összehasonlítása jelentős genetikai struktúrát mutatott, az F_{ST} 0,31 és 0,92 között mozgott (átlag = 0,71; mindegyik $P < 0,0001$; 11. táblázat). A páros F_{ST} -értékek a Vruljak 1 barlangi populáció és a négy horvátországi populáció között voltak a legmagasabbak (11. táblázat). A földrajzi távolság-alapú elkülönülés nem volt szignifikáns (Mantel-teszt, $P = 0,09$).

	Markarova	Pincinova	Vedrine	Rupećica
Markarova	0			
Pincinova	0.67	0		
Vedrine	0.72	0.66	0	
Rupećica	0.31	0.67	0.73	0
Vruljak	0.82	0.82	0.92	0.83

11. táblázat. Az öt vizsgált populáció közötti, kilenc mikroszatellita-lókuszon alapuló, páronkénti F_{ST} értékek. A jelen tanulmányban vizsgált Vruljak1 populációt érintő értékeket vastagon szedett számokkal jelöltük.

A főkoordináta-elemzés jelentős struktúrát mutatott a különböző hidrogeográfiai rendszereket képviselő populációk között. A PC1 és PC2 által magyarázott variancia 35,83% és 24,6% volt. A két főkoordináta diagramja egyértelmű elkülönülést mutatott az összes populáció között, kivéve a Rupećica- és a Markarova-barlangot, amelyek genetikailag közelebb állnak egymáshoz, mint a többi populációhoz (32. ábra).



32. ábra. A hercegovinai (Vruljak 1) és a horvátországi (Pincinova, Vedrine, Rupećica és Markarova barlangok) *Proteus anguinus* egyedek közötti, főkoordináta-elemzéssel kapott genetikai szerkezete. A beillesztett térképrészlet az öt állomány előfordulását mutatja.

Diszkusszió

Tanulmányunkkal bebizonyítottuk, hogy a nem-invázív, in situ víz alatti DNS-mintavétel és a kereskedelmi forgalomban kapható, általunk enyhén módosított, szájnyalvákhártya mintavevő alkalmazása a legnehezebb környezeti körülmények között is sikeres lehet. A mintavételi eljárás kevesebb, mint egy percet vett igénybe anélkül, hogy a vizsgált egyedeket el kellett volna mozdítani a környezetükből. A nyert minták elegendő minőségű és mennyiségű DNS-t tartalmaztak kilenc mikroszatellita-lókuszt elemzéséhez. A fragmenthossz-elemzések azt mutatták, hogy a vizsgált *P. anguinus*-populáció nem mutat genetikai változatosságot a vizsgált lókuszon.

DNS-elemzéseket rutinszerűen végeznek a legkülönbözőbb kutatási területeken. Bizonyos körülmények között azonban, például ha a vizsgált élőhely, populáció vagy egyedek sérülékenyek, a DNS-mintavétel nem feltétlenül egyszerű folyamat, mivel az állatok elpusztítása etikai, természetvédelmi vagy tudományos okokból gyakran elfogadhatatlan (Ficetola és mtsai. 2019, Taberlet és mtsai. 1999). Az egyik lehetőség az állatok begyűjtése és ideiglenes eltávolítása az élőhelyükről, egy invázív vagy lehetőleg nem-invázív mintavételi eljárás elvégzése, majd szabadon engedése. Ez a megközelítés még mindig problémás lehet, mivel sok esetben nem rendelkezünk adatokkal az ideiglenes eltávolítás rövid- és hosszútávú hatásairól, különösen, ha invázív mintavétellel párosul. Jó példa erre az ujjperclelvágás, ami széles körben alkalmazott módszer volt a kétéltűek egyedi jelölésére, és sokáig azt feltételezték, hogy ártalmatlan. Később kiderült, hogy ez a feltételezés jónéhány faj esetében tévesnek bizonyult (McCarthy & Parris 2004). Még ha a mintázott példányok látszólag probléma nélkül vészelték át a folyamatot, az élőhelyükről kiemelés és az áttelepítés befolyásolhatta jövőbeni fitnesszüket. Számos, különböző taxonon végzett kísérlet kimutatta, hogy a kifejlett egyedek territóriumokból történő ideiglenes eltávolítása átrendezheti a populációk szociális hálózatát, az áttelepítésük pedig tovább bonyolítja a helyzetet (pl. Shutler & Weatherhead 1992, Stiver és mtsai. 2006, Thompson 1977). A legjobb megoldásnak egy in situ, nem-invázív, minimális kezelést és időt igénylő mintavételi módszer tűnik. Kashiwagi és munkatársai (2015) fogkefével gyűjtöttek in situ nyálkát manta rájáktól (*Manta birostris*), majd a mintát a szárazföldön konzerválták. Később sikeresen használták a mintákat mitokondriális DNS, nukleáris DNS és mikroszatellita-lókusztok amplifikálására. A manta ráják abban az értelemben különlegesek, hogy nagyok (méretük > 5 m lehet és súlyuk akár 2-3000 kg-ot is elérheti) és viszonylag szelídek, így befogás nélkül megközelíthetőek és mintázhatóak, ha sekély vízben tartózkodnak és sikerül erősen súrolni őket a nagy mennyiségű bőrminta gyűjtéséhez. Ugyanez a megközelítés azonban nem alkalmazható a kistestű és félnék fajok esetében, ahol csak kis mennyiségű bőrnyalvákhártya gyűjthető, vagy az érzékenyebb bőrű fajoknál (pl. kétéltűek). Ezenkívül a minta degradálódhat vagy megsemmisülhet olyan élőhelyeken, ahol a szárazföld eléréséhez időre van szükség, mint például a barlangok nehezebben megközelíthető részei vagy nagy mélységekben. A mi innovációnk megoldja ezeket a problémákat, mivel a pamut pálcavég nem sérti meg az érzékeny bőrt, és - az azonnali mintakonzerválási folyamatnak köszönhetően - kis mintamennyiségek és hosszú merülések esetén is működőképes. Az általunk nyert minták mennyisége és minősége megfelelő volt a mikroszatellita-elemzésekhez, és valószínűleg más megközelítésekhez, például mtDNS-szekvenáláshoz vagy SNP-alapú populációszerkezeti elemzésekhez is megfelelő lenne.

Korábbi tanulmányunkban (3.2 alfejezet) négy horvátországi *P. anguinus*-populáció között jelentős genetikai elkülönülést és változatosságot találtunk, ugyanazokat a fajspezifikus markereket használva, mint amelyeket a jelen tanulmányban is alkalmaztunk. Ezzel szemben a hercegovinai populáció a vizsgált markerekben a genetikai változatosság teljes hiányát mutatta; mind a 22 egyedben, mind a kilenc lókuszt, egyetlen allélt adott. A talált allélok közül négy hiányzott a horvát populációkból, közülük három az ismert fragmenthossz-tartományon belül, egy pedig azon kívül volt (Lásd Balázs és mtsai. 2020b - 1. táblázat). A Vruljak 1 barlangi populáció genetikai változatosságának teljes hiányát az alapító (founder) hatás, palacknyak-effektus, alacsony effektív populációméret vagy beltenyésztés okozhatja. A Vruljak-

barlangrendszer hidrológiailag elszigeteltnek tekinthető a *P. anguinus* által lakott más barlangi ökoszisztémáktól (Lewarne és mtsai. 2010), ahol 2010 óta minden évben stabilan magas felnőtt egyedszámot és sok fiatal egyedét figyeltünk meg. Jelölés-visszafogás adatok (Balázs és mtsai. 2015, 2020) bizonyítják, hogy a *P. anguinus* ebben a populációban extrém helyhűséget mutat, azaz jellemzően néhány métert mozog több év alatt. A génáramlás hiánya növeli a beltenyésztettség valószínűségét (Frankham 2015), míg az extrém helyhűség és ivarérett kor késői elérése (átlagosan 12,5 év, Voituron és mtsai. 2011) alacsony effektív populációméretet eredményezhet. Együtt elemezve a négy horvátországi populációval azt találtuk, hogy bár valamennyi populáció jelentősen különbözik genetikailag, a Vruljak 1 populáció áll legtávolabb az összes többi populációtól. A földrajzi távolság-alapú elszigetelődést (IBD) nem támasztottuk alá, azonban ezt a megállapítást a vizsgált populációk alacsony száma miatt óvatosan kell kezelni.

Azt, hogy egy természetes populációban gyakorlatilag nincs genetikai változatosság, több módszertani probléma is okozhatja. Az első a mintaszám. Bár 22 egyed és kilenc mikroszatellita-lókuszt nem tekinthető jelentős mintaszámnak, a mintavételünk kiterjedése önmagában nagy valószínűséggel nem okoz különösebb hibát (Hale és mtsai. 2012). Előző tanulmányunkban (3.2 alfejezet) négy horvátországi populációban találtunk jelentős genetikai változatosságot hasonló mintaszámmal, még egy mindössze hat egyed által reprezentált populációban is. A második lehetséges probléma főként a nem-invázív módszerekkel gyűjtött DNS esetében releváns. Ha az izolált DNS túlságosan kis mennyiségű, az allélkiesés (allelic dropout), azaz amikor a heterozigóta egyedek egyik allélja nem amplifikálódik, lefelé torzíthatja a heterozigótaság és az alléldiverzitás becsléseket (pl. Broquet és mtsai. 2007, Taberlet és mtsai. 1999). Mi azonban minden vizsgált lókuszt esetében egyetlen allélt találtunk minden egyedre vonatkozóan, ami nem valószínű, hogy pusztán allélkiesés okozta volna, hacsak a genetikai változatosság nem extrém alacsony már eleve. Továbbá, amikor összehasonlítottuk ugyanannak az egyednek két DNS-mintáját, az egyiket a tanulmányunkban bemutatott mintavételi módszerrel, a másikat pedig dentális kefével (amelyből hétszer több DNS-t nyertünk) gyűjtöttük, az eredmények nem változtak. Harmadszor, fennáll annak a lehetősége, hogy nem a legmegfelelőbb DNS-markert használtuk. Olyan fajspecifikus primereket választottunk, olyan protokollokkal, amelyeket már sikeresen teszteltünk a *P. anguinus* több állományán, és negatív és pozitív kontrollok segítségével a vízben lévő környezeti DNS-en. Végül, felmerülhet az egyenőtlen mintázási stratégia. A Vruljak 1 barlangban egy 270 m hosszú járatból vettünk mintát. A barlang ennél hosszabb, és nem tudtuk megközelíteni a szűk hasadékokban tartózkodó egyedeket. Ugyanakkor valószínűtlen, hogy éppen egy beszűkült genetikai állományú szubpopulációt sikerült megmintáznunk egy változatos állományon belül. Összefoglalva, sikeresen kifejlesztettünk és teszteltünk egy alacsony költségű és megbízható módszert a kistestű állatok in situ víz alatti DNS-mintavételére azoknál a fajoknál, ahol a bőrkenetmintavétel alkalmazható. Reméljük, hogy a módszer lehetővé teszi az ilyen fajokkal foglalkozó más kutatók számára is, hogy genetikai elemzéseket végezzenek anélkül, hogy szükségtelenül veszélyeztetnék a sérülékeny populációkat és élőhelyeket. Módszerünk nyilvánvalóan nem barlangspecifikus, hanem bármilyen vízi élőhelyen, például korallzátonyokon is alkalmazható, és nemcsak kétélűeknél, hanem halaknál, puhatestűeknél, férgeknek vagy bármely olyan fajnál, amelynek a bőrfelületén mintázható nyálkaréteg található. A vizsgált *P. anguinus* populációban kilenc mikroszatellita-lókuszon a genetikai változatosság teljes hiányát tapasztaltuk. Bár ezek a lókusztok a genomnak csak kis részét képviselik, más populációkban nagyfokú variabilitást mutattak. Eredményeink azért is meglepőek, mert a barlang évtizedek óta tartó megfigyelései során minden évben stabil számú felnőttel és sok fiatal egyeddel találkoztunk. A genetikai változatosság hiányának okai és következményei további vizsgálatokat igényelnek.

4. Két levelibékafaj (*Litoria aurea* és *Litoria raniformis*) filogeográfiája és molekuláris szisztematikája Óceániában

4.1. A két levelibékafaj betelepítésének története Ausztráliából Új-Zélandra

Két levelibékafajt (*Litoria aurea* (Lesson, 1829) és *Litoria raniformis* (Keferstein, 1867)) (Amphibia, Anura, Hylidae, Pelodriadae), az 1800-as évek végén Ausztráliából telepítettek át Új-Zélandra (Thomson 1922) azért, hogy táplálékot biztosítsanak a kacsáknak, és hogy gyérítsék a szúnyoglárvaakat (Druett 1983, McCann 1961). Ausztráliában a *Litoria aurea* Új-Dél-Wales Állam (ÚDW) keleti és délkeleti részén és Victoria Állam keleti részén fordul elő (33a. ábra), míg a *L. raniformis* ÚDW délkeleti lejtőitől Victoria Államon keresztül Dél-Ausztrália délkeleti részéig terjed, de előfordul Tasmániában is (Cogger 1975) (33b. ábra). Míg Ausztráliában mindkét faj veszélyeztetett (Pyke 2002, Pyke és mtsai. 2002), sikeresen elterjedtek Új-Zélandon (Gill & Whitaker 1996), ahol jelentős állományok alakultak ki az eredeti élőhelyeikhez hasonló területeken (Pyke 2002, Pyke és mtsai. 2002). A *Litoria aurea* Új-Zélandon az Északi-sziget északi felén (33a. ábra), míg a *L. raniformis* az egész Északi- és Déli-szigeten elterjedt (33b. ábra). A két faj együtt fordul elő Northlandben, az Északi-sziget északi csücskén (Bell 1982).

Kevés információ áll rendelkezésre a két faj betelepítésének idejéről és helyéről. Thomson (1922) szerint a „*Hyla aurea*”-t az Auckland Acclimatization Society hurcolta be Sydneyből (Új-Dél-Wales) Aucklandbe (Új-Zéland, Északi-sziget). További feljegyzések szerint a Canterbury Acclimatization Society 1867-ben Tasmánia fővárosából, Hobartból szállította be Canterbury-be (Új-Zéland, Déli-sziget) a „*Hyla aurea*”-t (ez valószínűleg a *L. raniformis* lehetett, mert csak ez a faj él Tasmániában), majd a Southland Acclimatization Society szállított békákat Southlandbe (Wallacetown) 1868-ban. Később több regionális áttelepítés is történt Új-Zélandon belül; például, 60 „*Hyla aurea*”-t szállítottak Southlandbe Napierből 1888-ban (Thomson 1922).

Tanulmányunkban a jelenleg Új-Zélandon megtalálható *L. aurea* és *L. raniformis* populációk eredetét próbáltuk azonosítani, megvizsgálva a közöttük lévő genetikai kapcsolatokat. Megvitattuk továbbá a betelepítés ökológiai és evolúciós következményeit Új-Zélandon.

Módszerek

Terepi mintavétel

Hét populációt mintáztunk Új-Zélandon és 13 helyről gyűjtöttünk mintát Ausztráliában (12. táblázat, 33. ábra) 2002 és 2005 között. Mintavételünk során nagyjából 1 mm²-es szövetdarabot csíptünk le a békák ujjpercéről steril olló segítségével majd 98%-os etanolban konzerváltuk őket. Közvetlenül a mintázás után az állatokat a befogás helyén szabadon engedték. További szövetmintákat igényeltünk a Dél-Ausztráliai Múzeumtól, Geoffrey Heard (La Trobe University) és Emma Burns (University of New South Wales) kutatóktól. Négy ismeretlen eredetű, alkoholban konzervált példányt is elemeztünk.

Laboratóriumi módszerek

A DNS-t egy módosított Cetiltrimetil-Ammónium-Bromid (CTAB) protokoll (Cullings 1992) segítségével izoláltuk. A citokróm-oxidáz I (cox1) gén egy szakaszát szaporítottuk fel a Vörös és mtsai. 2009 tanulmányban részletezett protokollokat használva (lásd 624-625 oldal). A PCR-termékeket egy ABI 3100-as automatizált szekvenátorral (Applied Biosciences) elemeztük a Canterbury Egyetem Biológiai Tudományok Iskolája laboratóriumában (Christchurch, Új-Zéland).

Statisztikai elemzések

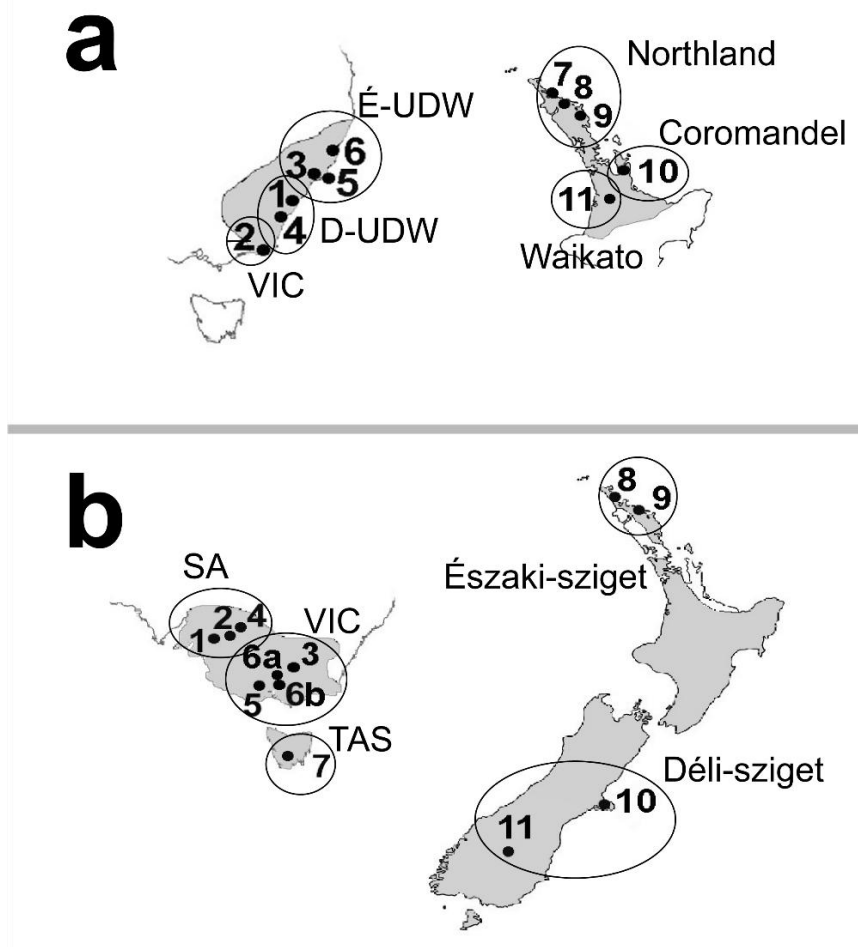
A cox1 szekvenciákat a Bioedit (Hall 1999) szoftver segítségével illesztettük és a variábilis pozíciókat egyesével, manuálisan vizsgáltuk át a kromatogramok szemrevételezésével. A mintákat ezután földrajzi régiók szerint a következő módon csoportosítottuk: *L. aurea* - Northland, Coromandel-félsziget - Waikato régió Új-Zélandon belül, valamint Új-Dél-Wales és Victoria Ausztrálián belül; *L. raniformis* - Északi-sziget és Déli-sziget Új-Zélandon belül,

valamint Victoria, Dél-Ausztrália és Tasmánia Ausztrálián belül (34. ábra). A haplotípusok közötti kapcsolatokat statisztikai parszimónia-hálózat építésével vizsgáltuk (TCS, 1.21-es verzió, Clement és mtsai. 2000), amely a haplotípusokat elválasztó mutációs különbségeken alapul. A populációk egymásba ágyazott genetikai szerkezetének vizsgálatához és az Ausztrália és Új-Zéland különböző régióiban található haplotípusok közötti kapcsolat feltárásához a BAPS 3.2 szoftvert (Corander és mtsai. 2006) alkalmaztuk. A betanított klaszterezést (trained clustering) alkalmaztuk, amelyben az ausztrál populációkat tekintettük referencia csoportoknak amelyek lehetséges kolonizációs források lehetnek, és az Új-Zélandon mintázott egyedekre pedig ismeretlen eredetű mintázási egységekként tekintettünk.

Eredmények

A végső illesztés 27 *L. aurea* és 32 *L. raniformis* egyed mitokondriális *cox1* génjének 594 bázispár hosszú szakaszát eredményezte (12. táblázat). Hat haplotípust képviselt a *L. aurea* és 11-et a *L. raniformis*. A *L. raniformis* két mitokondriális vonalra vált szét. A *L. aurea*n belül négy variábilis pozíciót találtunk (három parszimónia-informatív), a *L. raniformis*on belül pedig 50 variábilis pozíció volt (43 parszimónia-informatív).

A *L. aurea* esetében gyenge földrajzi strukturáltságot figyeltünk meg (34. ábra). Hat haplotípus fordult elő a két fő régióban (34a. ábra). Két haplotípus (La1 és La2) Ausztráliában és Új-Zélandon is előfordult. Az La1 haplotípuson Northland és Új-Dél-Wales állományai osztoztak, míg az La2 haplotípus a Coromandel-félszigetről és Waikatóból származó egyedekből került elő. A Victoria Államban gyűjtött békákban egy egyedi haplotípust (La5), Új-Dél-Wales-ben pedig két egyedi haplotípust (La4 és La6) találtunk, és a Coromandel-félszigeten is csak egy egyedi haplotípus (La3) fordult elő, amelyek egy mutációs lépésre voltak csak egymástól.



33. ábra. Ausztrália és Új-Zéland térképe a *Litoria aurea* (a) és *L. raniformis* (b) előfordulásával (szürke terület). A számokkal jelölt pontok a 10 *L. aurea* (a) és a 11 *L. raniformis* (b) mintavételi helyet jelzik. A mintavételi helyek kódjai és a régiók megegyeznek a 12. táblázatban foglaltakkal.

Ezzel szemben a *L. raniformis* jelentős genetikai struktúrát mutatott (34b. ábra). Egyetlen közös és hat egyedi haplotípus volt a Victoria Államból származó és a Déli-szigetről származó mintákban (Lr2-Lr7). Három mutációs lépés választja el a Tasmániából származó egyedeket (Lr8) a leggyakoribb haplotípustól. Egy Victoria Államból származó (Lr9) és két Dél-Ausztráliából származó (Lr10-Lr11) haplotípus 38 mutációs lépésre van a többi haplotípustól, így a statisztikus parszimónia haplotípus-hálózatba nem volt illeszthető 95%-nál nagyobb valószínűséggel.

A populációstruktúra elemzés a *L. aurea* esetében az összes Northlandből származó egyedeket Új-Dél-Wales északi részének állományaival egy klaszterbe sorolta, míg a Coromandel-Waikato régió egyedei Új-Dél-Wales déli részének állományaival mutattak rokonságot (34a. ábra) (optimális partíció marginális valószínűsége = -11,21). Az egyik ismeretlen egyed a northlandi egyedekkel mutatott egyezést (La1 haplotípus), míg három egyed pedig nagy valószínűséggel a Coromandel-Waikato régióból származott (La2 és La3 haplotípusok). A *L. raniformis* esetében az összes egyed a Victoria Államból gyűjtött egyeddel került egy klaszterbe (Lr1-Lr7 haplotípusok). A dél-ausztráli csoport különálló klaszter maradt az Lr9 és az Lr11 egyedi haplotípusokkal, és a Victoria Állammal közös Lr10 haplotípussal (34b. ábra; optimális partíció marginális valószínűsége = -146,7). Az egy egyed által képviselt Lr8 haplotípus Tasmániából nem került be az elemzésbe.

Faj, lelőhely és csoport neve	Leelőhely kódja		N	Haplotípus	Génbank kódok
<i>L. aurea</i>					
Homebush (D-UDW, Aus)	1	2	La2, La6	EU043182, EU043183	
Point Hicks (Vic, Aus)	2	2	La5	EU043185, EU043186	
Sandgate, Newcastle (É-UDW, Aus)	3	2	La1	EU043177, EU043184	
Lake Meroo (D-UDW, Aus)	4	2	La2, La4	EU043178, EU043179	
Broughton Island (É-UDW, Aus)	5	2	La1	EU043187, EU043188	
Crescent Head (É-UDW, Aus)	6	2	La1	EU043180, EU043181	
Karikari peninsula (Northland, NZ)	7	4	La1	EU043166 - EU043169	
Kerikeri (Northland, NZ)	8	2	La1	EU043162, EU043163	
Whangarei (Northland, NZ)	9	2	La1	EU043164, EU043165	
Te Aroha (Coromandel, NZ)	10	2	La2, La3	EU043171, EU043172	
Otorohanga (Waikato, NZ)	11	1	La2	EU043174	
Ismeretlen lelőhelyek (Unknown, NZ)		4	La1, La2, La3	EU043170, EU043173, EU043175, EU043176	
<i>L. raniformis</i>					
Waikerie (DA, Aus)	1	1	Lr10	EU043219	
Murtho Park (DA, Aus)	2	1	Lr11	EU043220	
Strathbogie (Vic, Aus)	3	1	Lr9	EU043215	
Chowilla (DA, Aus)	4	1	Lr10	EU043216	
Colac (Vic, Aus)	5	1	Lr6	EU043218	
Donnybrook, Melbourne (Vic, Aus)	6a	1	Lr3	EU043201	
Campbellfield, Melbourne (Vic, Aus)	6b	3	Lr1, Lr7	EU043202 - EU043204	
Gretna, Tasmania (Tas, Aus)	7	1	Lr8	EU043217	
Karikari peninsula (Északi-sziget, NZ)	8	2	Lr3	EU043197, EU043198	
Whangarei (Északi-sziget, NZ)	9	2	Lr3	EU043199, EU043200	
Christchurch (Déli-sziget, NZ)	10	8	Lr1, Lr4, Lr5	EU043189 - EU043196	
Alexandra (Déli-sziget, NZ)	11	10	Lr1, Lr2	EU043205 - EU043214	

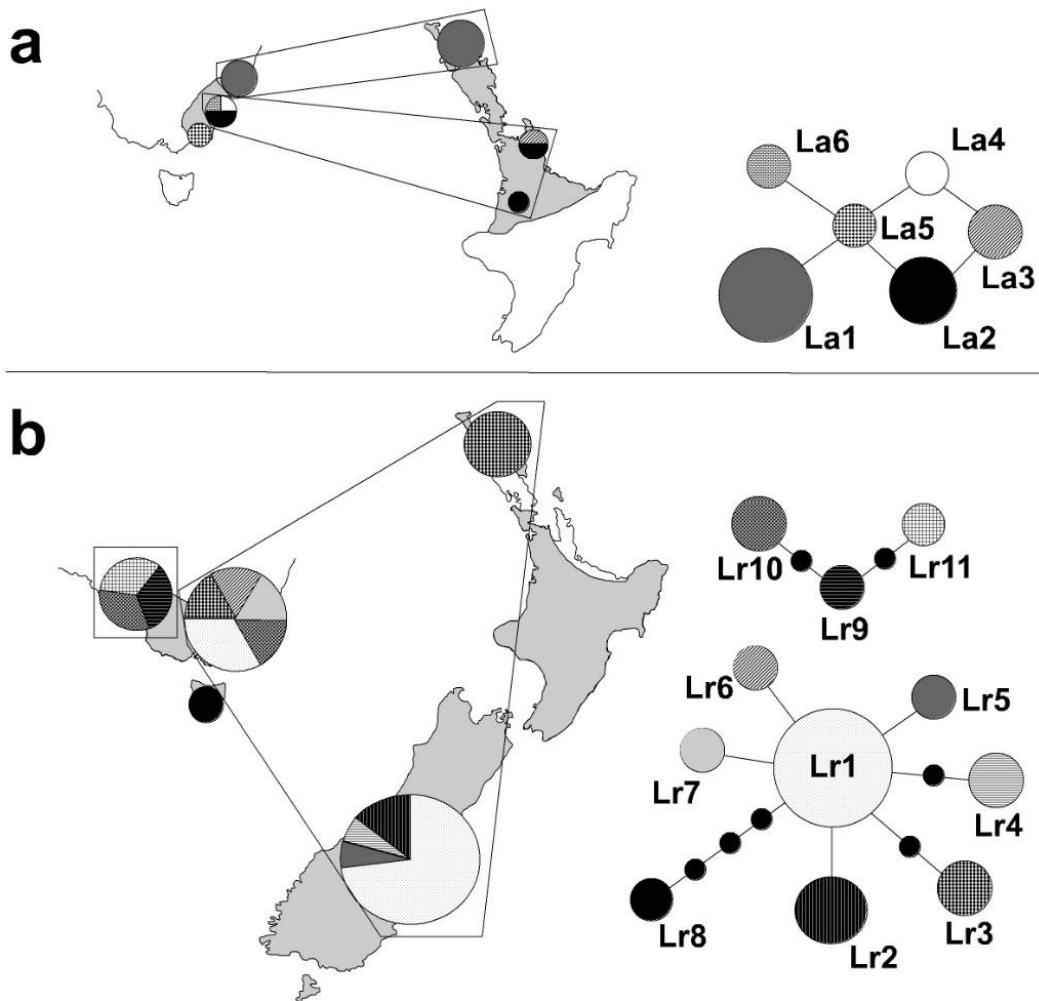
12. táblázat. Leelőhelyek és csoportkódok, amelyeket az elemzésben alkalmaztunk, mintaszámok (N), a mitokondriális cox1 haplotípus kódok. A lelőhelykódok megegyeznek a 33. ábrán feltüntetett számokkal, a haplotípus kódok pedig a 34. ábrán jelzett kódokkal. A Génbank kódok a NCBI adatbázis kódszámokat jelölik.

Diszkusszió

Litoria aurea

Az mtDNS-szekvencia adatok azt mutatták, hogy a *L. aurea* fajt nagy valószínűséggel Új-Dél-Walesből telepítették át Új-Zéland Északi-szigetére. A statisztikus parszimónia-hálózat (34a. ábra) alapján a northlandi (Kerikeri) és az Új-Dél-Wales északi részéről (Sandgate, Crescent Head, Broughton-sziget) származó egyedek osztoztak a leggyakoribb haplotípuson (La1). Az La2 haplotípus pedig a Coromandel-félszigetről - Waikato régióban illetve Új-Dél-Wales déli részén (Lake Meroo, Homebush) került elő. Ez azt valószínűsíti, hogy két betelepítés történhetett, egy Új-Dél-Wales északi részéről Northlandbe, és Új-Dél-Wales déli részéről a Coromandel-félszigetre - Waikato régióba. Az utóbbi esemény alátámasztja az irodalmi feljegyzéseket, amelyek szerint a *L. aurea*-t Sydneyből hurcolták be Új-Zélandra (Thomson 1922).

Mitokondriális DNS-en alapuló filogenetikai elemzése alapján Burns és mtsai. (2007) két különböző pleisztocén refúgiumterületet azonosított a *L. aurea* faj esetében: Új-Dél-Wales déli partvidékén és Victoria Államban. A két elszigetelődött állomány az elterjedés déli és középső régióiból aztán másodlagosan találkozott, ami megmagyarázza az La5 centrális pozícióját a haplotípus hálózatban. Ez lehetett az egyik alapító haplotípus ami aztán északra vándorolt és végül visszaszorult. A legnagyobb haplotípus-diverzitást a Coromandel-félszigeten és Új-Dél-Walesben találtuk. Az La3 a Coromandel-félszigeten egy olyan elkülönült haplotípus Új-Zélandon, amit elképzelhető, hogy nem sikerült megmintáznunk Ausztráliában, illetve találtunk még egyedi haplotípusokat Victoria Államban (La5) és Új-Dél-Walesben (La4, La6). Ezen eredmények összhangban vannak Burns és mtsai. (2004) mikroszatellita-lókuszokon alapuló populációgenetikai vizsgálatával, amely jelentős genetikai strukturáltságot mutatott ki a faj teljes elterjedési területén, de homogenitást talált az összefüggő élőhelyeken belüli egyes állományok között. Burns és mtsai. (2004) szerint a populációk fragmentálódása a közelmúltban – mindössze 30-40 évvel ezelőtt – kezdődhetett de már ez is jelentős genetikai sodródást okozhatott a fragmentált élőhelyeken élő populációk esetében. Új-Dél-Wales és Victoria Államok összefüggő élőhelyein viszont a meglévő genetikai áramlás miatt alacsonyabb mértékű a genetikai strukturáltság.



34. ábra. A mitokondriális *cox1* haplotípusokból épített statisztikus parszimónia-hálózat a *L. aurea* (a) és *L. raniformis* (b) esetében. A vonalakkal összekötött körök egy mutációs lépést mutatnak. A körök nagysága az adott haplotípust reprezentáló egyedek számával arányos. A kis méretű fekete pontok (•) hipotetikus hiányzó haplotípusokat jelölnek. A haplotípusok előfordulását térképen is ábrázoltuk. A klaszterek a BAPs program segítségével kapott csoportosítást mutatják.

Litoria raniformis

Ez a faj jelentősebb genetikai változatosságot mutat Új-Zélandon, mint a *L. aurea*. A statisztikus parszimónia-hálózat azt mutatja, hogy a *L. raniformis* Victoria Állam déli részéről (Melbourne környékéről) került be Új-Zéland Déli-szigetére. Új-Zélandon pedig emberi segítséggel terjedt szét (Pyke 2002) és telepedett meg mindkét fő szigeten. A mi eredményeink nem támasztják alá, hogy a Canterbury-be telepített állomány Tasmániából származik (Thomson 1922). A Tasmániában megtalált haplotípus (Lr8) három mutációs lépéssel különült el a leggyakoribb haplotípustól (Lr1), ami azt sugallja, hogy a tasmán klaszter egy genetikailag elkülönült állomány, ami a sziget kontinentstől való elszakadása óta, nagyjából 14 000 éve önállóan fejlődik (Lambeck & Chappell 2001). A tasmán haplotípus genetikai távolsága a többi haplotípustól olyan jelentős, hogy nem valószínű, hogy az új-zélandi populációk innen származnak, habár előfordulhat, hogy nem sikerült minden haplotípust megtalálnunk Tasmániában. Az Lr9-Lr11 haplotípusok mindegyike legalább 38 mutációs lépéssel különült el a leggyakoribb haplotípustól (Lr1) (34. ábra), amely Kelet-Ausztráliában és Új-Zélandon található. Ez a két távoli haplotípus-vonal akár egy eddig ismeretlen, kriptikus faj jelenlétét is jelezheti. Az északi haplotípus-vonalon belül a Lr9-Lr11 haplotípussal rendelkező négy mintavételi hely közül három a Murray-folyó völgyében fekszik, ami azt sugallja, hogy ez a kelet-nyugat irányú folyó szerepet játszhat a két vonal allopatrikus fragmentációjában. Jóllehet,

a negyedik állomány amelyik szintén a Lr9-Lr11 haplotípusokkal rendelkezik (Strathbogie), Victoria Állam területén található, nem a Murray-folyó völgyében, és földrajzilag elkülönül a többi állománytól. Az, hogy ez az állomány ilyen mértékben különbözik genetikailag a többi Victoria Állambeli populációtól azt mutatja, hogy ezen állam síkvidéke (Victorian Plains) milyen változatos szerkezetet mutat. Hasonlóan összetett genetikai diverzitást ismertek fel az itt élő vízi szink (*Eulamprus tympanum*) populációin belül is Nyugat-Viktóriában (Scott & Keogh 2003). Tanulmányunk mintaszáma és az általunk használt egy mitokondriális marker nem elegendő arra, hogy határozott filogeográfiai leírást adjunk a *L. raniformis* esetében, ehhez szükséges lenne a faj további, mélyrehatóbb vizsgálata.

Biotikus homogenizáció

A fosszilis leletekből következően az endemikus kétéltűfajok (*Leiopelma* spp.) széles elterjedésűek voltak Új-Zélandon, de az ember 1000-1200 évvel ezelőtti érkezésével az egzotikus ragadozók behurcolása, valamint az élőhelyek átalakítása az őshonos fajok elterjedési területének beszűküléséhez vagy a fajok kipusztulásához vezetett (Thurley és Bell 1994). Az európai telepesek érkezése tovább fokozta az őshonos fauna pusztulását az idegenhonos kártevő emlősök (patkányok, macskák, menyétfélék), egzotikus gerinctelenek és gyomnövények (Veitch & Clout 2002) behurcolása által. A *Litoria aurea* és a *L. raniformis* nagyjából 140 éve került Új-Zélandra és terjedt szét mindkét szigeten. Az új területekre betelepülő egyedek genetikai változatossága gyakran alacsony az alapító hatás (founder effect) miatt, de a békák későbbi ember általi mozgatása Új-Zélandon belül tovább homogenizálta a haplotípus-polimorfizmust. Mivel egyik faj sem védett Új-Zélandon, gyakoriak a lokális áttelepítések. Az állatkereskedelem a legfőbb mozgatója a két sziget közötti mozgatásnak, ami azzal jár, hogy a békákat az eredeti állománytól távoli élőhelyeken engedik szabadon (Waldman és mtsai. 2001). Az idegenhonos *Litoria*-fajok és az endemikus *Leiopelma*-fajok ritkán lépnek egymással kölcsönhatásba természetes körülmények között, mert más mikroélelőhelyet foglalnak el (Bell 1982). Habár, Thurley és Bell (1994) említést tesz egy esetről amely során *L. aurea* fogyasztott el egy *Leiopelma archeyi* példányt a Whareorino-erdőben (Waikato régió), ahol *Litoria aurea*, *Leiopelma archeyi* és *L. hochstetteri* szimpatrikusan fordulnak elő. Habár az idegenhonos *Litoria*-fajoknak nincs jelentős közvetlen ökológiai hatása az őshonos új-zélandi kétéltűfajokra, potenciális vektorai lehetnek a kétéltűbetegségeknek (Bell és mtsai. 2004, Waldman és mtsai. 2001). Az Új-Zélandon élő őshonos fajok között, alacsony prevalencia értékekkel ugyan, de jelen van a kitrid gomba (*Batrachochytrium dendrobatidis*) amely a kitridiomikózis megbetegedést okozza (Eda és mtsai. 2023).

A biotikus homogenizáció egyik fő oka az urbanizáció. A lakott települések terjeszkedése hozzájárul az őshonos fajok eltűnéséhez és az urbán élőhelyekhez alkalmazkodni képes fajok megtelepedéséhez. Ausztráliában a *L. aurea* és a *L. raniformis* még előfordul olyan víztestekben, ahol nagy a zavarás, de távol esik a lakott településektől, míg új-Zélandon többnyire kertekben vagy mezőgazdasági területeken élnek (Pyke és mtsai. 2002). Az áttelepített állományok az elmúlt 140 évben alkalmazkodtak új környezetükhöz, és nagyobb populációkkal vannak jelen, mint eredeti élőhelyükön, Ausztráliában. Ez a két levelibékafaj ma már Új-Zéland kétéltűfaunájának teljes értékű tagja. Jóllehet állományaik nagyobbak Új-Zélandon, mint Ausztráliában, számuk itt is csökken (Waldman és mtsai. 2001).

4.2. A *Litoria raniformis* molekuláris szisztematikája Ausztráliában

Kelet-Ausztráliában a pelodyadid *Litoria aurea* csoportot (sensu Tyler & Davies 1978) három faj alkotja: *Litoria aurea* (Lesson, 1829), *Litoria raniformis* (Keferstein, 1867), és *Litoria castanea* (Steindachner, 1867). A háromból két faj (*L. raniformis* és *L. castanea*) szisztematikája sokáig problémás volt, főleg történelmi okokra visszavezethetően, mint például a típuslelőhely ismeretének hiánya, a típuspéldányok eltűnése (Mahony és mtsai. 2013, Thomson és mtsai. 1996) valamint az állományok eltűnése, amelyek egyre kevésbé tették lehetővé a biológiai változatosság összehasonlító vizsgálatát (Mahony 1999, Mahony és mtsai. 2013). Nem igaz ugyan ez a *L. aurea* esetében, amelynek a közelmúltban végzett molekuláris genetikai populációelemzése azt sugallták, hogy a jelenlegi populációszerkezetet távolság általi izoláció alakította ki, és amely populációszerkezet egyértelműen mutatja a faj stabil rendszertani státuszát (Burns és mtsai. 2004, 2007).

Ahogy korábbi tanulmányomban (4.1 alfejezet) is bemutattam, a *Litoria raniformis* Ausztrália délkeleti részén honos, és Dél-Ausztrália déli részétől Új-Dél-Wales (NSW) Alsó Murray Darling-medencéjén keresztül Victoria és Tasmánia Államokig terjed. Betelepítették Új-Zélandra, ahol sikeresen elterjedt a két nagyobb szigeten (Thomson 1922, Vörös és mtsai. 2008). Miközben a faj betelepítésének történetét vizsgáltuk, jelentős szekvencia-divergenciát észleltünk a mitokondriális citokrom-oxidáz I génben a Murray-Darling medencében élő és Dél-Ausztrália partmenti populációi között, ami ismeretlen, kriptikus fajok jelenlétére utalt.

A *Litoria castanea*-t Steindachner (1867) írta le típuslokalitás megjelölése nélkül, de feltehetően Új-Dél-Walesből (Cogger és mtsai. 1983, Häupl & Tiedemann 1978, Häupl és mtsai. 1994). Courtice & Grigg (1975) leírt egy másik, hasonló taxont, a *Litoria flavipunctata*-t, a *L. castanea* említése nélkül, egy földrajzilag elszigetelt területről Guyra-tól nyugatra, Új-Dél-Wales északi hegyvidékén. Ezt követően Cogger és mtsai. (1983) feltámasztotta a *L. castanea* taxont, és megállapította, hogy a *L. flavipunctata* a *L. castanea* junior szinonímja. Ezt Thomson és mtsai. (1996) morfológiai és hívóhangelemzések alapján megerősítette. Irodalmi adatok alapján valaha a *L. castanea* néhány kisebb populációja volt ismert Új-Dél-Wales északi, középső és déli fennsíkain és az Ausztráliai Fővárosi Területről (Australian Capital Territory) (Mahony és mtsai. 2013, White & Pyke 1999).

Az 1970-es évek vége óta Kelet-Ausztráliában valamennyi *Litoria*-faj jelentős állománycsökkenést szenvedett el mind az eredeti előfordulási területén, mind pedig az új területeken, ahová ember által behurcolva jutott el (Heard és mtsai. 2012, Mahony és mtsai. 2013, Pyke 2002, Waldman és mtsai. 2001, Wassens 2008). Eredetileg a *L. raniformis* gyakori és széles elterjedésű faj volt a kontinensen Dél-Új-Dél-Walesben és Victoria Államban, de ismert volt a King-szigeten, a Flinders-szigeteken, és Tasmánia keleti és északi részén (DEWHA 2009, Pyke 2002, Sadlier & Pressey 1994, Wassens 2008). Jóllehet a tudományos szakirodalom csak 1990 után említi a fajt, valószínűleg az 1970-es évek végére, 1980-as évek elejére kihalt Új-Dél-Wales délkeleti hegyvidékéről (Osborne és mtsai. 1996). Hasonló lokális kihalások okozhatták a faj eltűnését 1989 előtt Új-Dél-Wales nyugati részén, Victoria középső részén és Tasmánia és Dél-Ausztrália egyes részein (DEWHA 2009, Pyke 2002, Sadlier & Pressey 1994, Tyler 1997, Schultz 2008, Wassens 2008). A *L. raniformis* természetvédelmi helyzetének legutóbbi értékelése az IUCN vörös listájának kritériumai alapján a fajt a veszélyeztetett (VU) kategóriába sorolta (Gillespie és mtsai. 2020), és öt fő veszélyeztető tényezőt határozott meg: betegségek (főképpen a kitridiomikózis), éghajlatváltozás, élőhelyek eltűnése, invázió fajok (halak), és a helytelen vízgazdálkodás. Ausztráliában a faj szintén a veszélyeztetett fajok listáján szerepel (EPBC Act 1999).

A *L. castanea* esetében is hasonló állománycsökkenés következett be, és mivel az 1970-es évek eleje óta Új-Dél-Walesben az északi- és a középső-fennsíkon (Tablelands), 1980 óta pedig a déli-fennsíkon sem figyelték meg a fajt, kihaltak tekintették (Mahony 1999). 2010-ben azonban felfedeztek egy kis populációt a déli-fennsíkon, amelyet *Litoria castanea* fajként azonosítottak a lágyéktájékon és a combokon található foltok mintázata alapján (Hunter és mtsai. 2018). A felfedezés lehetővé tette, hogy molekuláris vizsgálatokkal összehasonlítsuk a

L. aurea fajcsoporton belüli genetikai távolságokat. Jóllehet az újrafelfedezés óta a populáció drámai csökkenésen ment keresztül, és nagy valószínűleg eltűnt a természetes élőhelyéről (Hunter és mtsai. 2018, Geyle és mtsai. 2021), a sydneyi Taronga Állatkertbe sikerült egy kisebb állományt megmenteni a déli-fennsík egyik populációjából. Az IUCN vörös listáján a fajt a kritikusan veszélyeztetett kategóriába (CR) sorolták (Gillespie és mtsai. 2020), és az ausztrál védett fajok listáján is a kritikusan veszélyeztetett fajok között szerepel (EPBC Act 1999).

Tanulmányunkban a korábban a *L. raniformis* fajon belül tapasztalt jelentős genetikai távolság szisztematikai jelentőségét vizsgáltuk, felhasználva ezt a *L. aurea* fajcsoport szisztematikai revíziójára genetikai, morfológiai és bioakusztikai adatok elemzésével.

Módszerek

Mintavétel

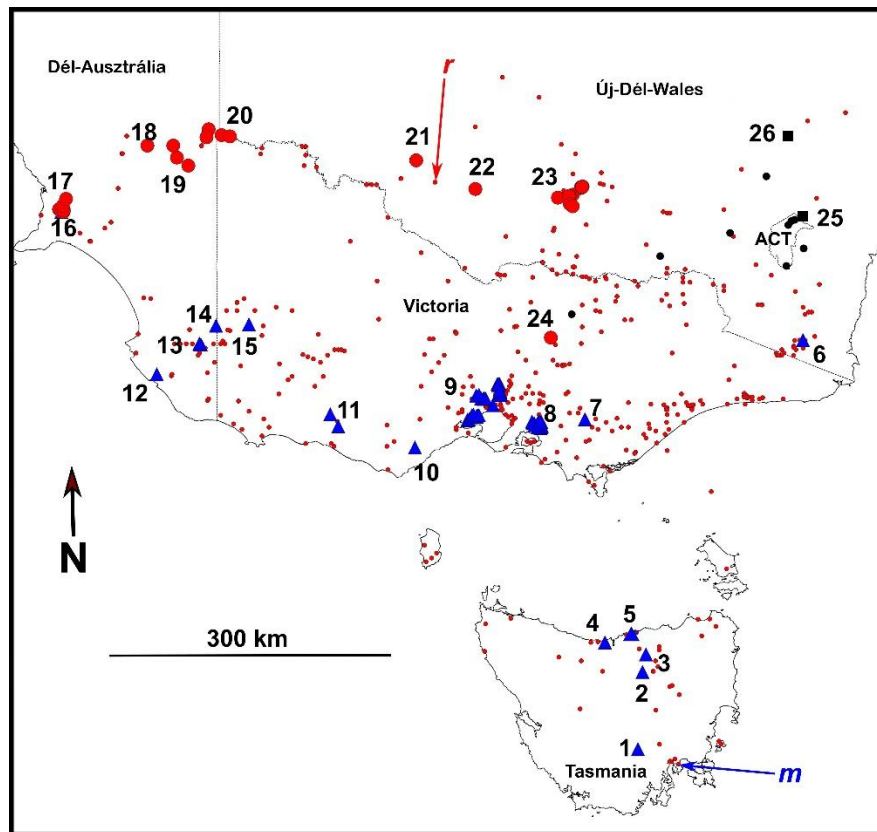
A vizsgált fajok elterjedési területéről a Murray Darling-medencéből, Dél-Ausztrália délkeleti részéről, Victoriából és Tasmaniából gyűjtöttünk lábujjperc, bőrkenet vagy májmintákat, de Victoria Állam középső részéről csak kevés minta állt rendelkezésre (35. ábra, Vörös és mtsai. 2023, 4-8. oldalak, 1. táblázat). A filogenetikai elemzésekhez és haplotípus hálózatok építéséhez letöltöttünk Victoria Állam déli részén 73 lelőhelyről gyűjtött példány elemzéséből származó 377 *cox1* és 112 *ND4* szekvenciát az NCBI GenBank-ból (Keely és mtsai. 2015) (Vörös és mtsai. 2023, 4-8. oldalak, 1. táblázat). Bőrkenet- és szövetmintákat gyűjtöttünk az újrafelfedezett *L. castanea* állományból a Lachlan folyó vízgyűjtőjének felső részén, Yass településtől északra, Új-Dél-Wales déli-fennsíkján (Hunter és mtsai. 2018). A *L. raniformis* és a *L. castanea* elterjedésének potenciális érintkezési területéről Új-Dél-Wales délkeleti részén nem tudtunk friss szövetmintát gyűjteni mivel ezek az állományok nagy valószínűséggel kihaltak. Mintáztunk továbbá alkoholban őrzött múzeumi példányokat is olyan lokalitásokról, ahonnan a faj már eltűnt, ezeket a modern mintáknál érzékenyebb ősi-DNS-elemzésnek (arche DNS, aDNS) vetettük alá.

Mitokondriális DNS

A DNS-izoláláshoz a Puregene izoláló kitet használtuk (Gentra Systems, Minneapolis, MN) követve a gyártó által javasolt protokollt. A *tRNA^{Ser}* egy részét, a *tRNA^{His}* gént és az *ND4* gén egy részét (a továbbiakban: *ND4* gén) PCR-rel felszaporítottuk és közvetlenül szekvenáltuk az *ND4* és *Limno2* primerekkel (Vörös és mtsai. 2023, S1 táblázat) az Anstis és mtsai. (2016) közleményben részletezett protokollt követve. A szekvenciákat a Geneious Pro v8.1.4-ben (Kearse és mtsai. 2012) implementált Muscle v6.814b (Edgar 2004) szoftverrel illesztettük (GenBank számokat lásd Vörös és mtsai. 2023, 1. táblázat). Azokat a bőrkenet vagy múzeumi példányokból származó mintákat, amelyekből alacsony DNS-koncentrációt vártunk, aDNS-elemzés protokollok segítségével izoláltuk egy külön erre a célra kialakított tiszta laboratóriumban (clean lab), egy PCR-gépek nélküli épületben. A mintákat először foszfátpufferes sóoldatban (PBS puffer) áztattuk, hogy eltávolítsuk a szövetekből az etanolt, majd a QIAGEN DNeasy izoláló kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország) dolgoztuk fel. A standard protokollt két ponton módosítottuk (carrier-RNS-lépés hozzáadása (3 µl 1 µg/µl mellett) és guanidiniumot tartalmazó extra AL-puffer hozzáadása). A mitokondriális szekvenciákat átfedő rövid fragmentumokból állítottuk össze, amelyeket általános belső (custom internal) primerek segítségével amplifikáltunk (Vörös és mtsai. 2023, S1. táblázat). Összesen 23 mintából sikerült *cox1*-fragmentet (minták ACAD előtag kóddal a Vörös és mtsai. 2023, 1. táblázatban), 14 mintából pedig *ND4*-gént amplifikálni (ABTC108426-108438 bőrkenet; SAMA R42007-42008 szövetminták). PCR-reakció és szekvenálás részleteit lásd Vörös és mtsai. 2023.

A modellalapú filogenetikai elemzéshez az 1., 2. és 3. kodonpozíciók adatsorából megbecsültük a legjobb szubsztitúciós modellt és partíciós sémát a ModelFinder (Kalyaanamoorthy és mtsai. 2017) segítségével, a Bayes információs kritérium (BIC) kritériumait követve. A maximum likelihood filogenetikai megközelítéshez az IQ-tree (Nguyen és mtsai. 2014) alkalmazást használtuk az IQ-TREE webserveren keresztül (Trifinopoulos és mtsai. 2016). Az

ágtámogatást (branch support) 100 standard bootstrap pszeudoreplikációval (Hoang és mtsai. 2017) értékeltük. A Bayes-féle elemzést a MrBayes v3.1.2 programmal végeztük. (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Az elemzés részletes leírását lásd Vörös és mtsai. 2023, 15. oldal.



35. ábra. Térkép a mintavételi pontokkal a genetikai elemzésekhez (nagy szimbólumok: piros körök = északi csoport (*L. r. raniformis*), kék háromszögek = déli csoport (*L. r. major*), fekete négyzetek = *L. castanea*). Múzeumi példányok előfordulási adatai (kis méretű piros körök = *L. raniformis*, kis méretű fekete körök = *L. castanea*). A neotípusok lelőhelyeit színes nyilak mutatják.

Molekuláris diagnosztika

Renner és mtsai. (2016) javaslatát követve először megkerestük az ND4 génszakaszokon a diagnosztikus egyponos polimorfizmusokat (SNP) a MEGA v11 (Tamura és mtsai. 2021) szoftver segítségével. Kulcsoportokat használva azonosítottuk az apomorf karaktereket mindhárom faj esetében.

Nukleáris intronok

Két nukleáris intront (Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase Intron 4 - GAPD Intron4 és Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6 Intron 6 - PDIA6 Intron6) amplifikáltunk a Vörös és mtsai. 2023, S1. táblázatban található primer párok segítségével. PCR-reakció és szekvenálás részleteit lásd Vörös és mtsai. 2023, 15. oldal. A HaplotypeViewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>) segítségével haplotípus-hálózatot építettünk a Jukes-Cantor távolságokon alapuló szomszéd-összevonó (neighbour-joining) módszerrel épített törzsfából kiindulva.

SNP-adatok kinyerése

A mintákat DNS-izolálás és DArTseq™ 1.0 genotipizálásra a Diversity Arrays Technology PL céghez küldtük (Canberra, ACT, Ausztrália). A DNS-mintákat aztán restriktions enzim emésztés/kötődés reakciókkal dolgoztuk fel a PstI/SphI enzimkombinációt használva és a kötődött fragmenteket a Kilian és mtsai. (2012) és a Mahony és mtsai. (2020) tanulmányokban leírtak alapján PCR-amplifikáltuk egyvégponos szekvenáláshoz 77 cikluson keresztül egy

Illumina HiSeq2500 szekvenátoron. A szekvenciaadatokat fastq fileokká alakítottuk az Illumina HiSeq2500 szoftver segítségével. A szekvenciákat a DArT hivatalos pipeline leírását használva dolgoztuk fel. A szekvenciák szétválogatását, tisztítását, minőségi ellenőrzését részletesen lásd Vörös és mtsai. 2023, 16-17. oldal.

Morfológiai elemzés

Összesen 149 *L. raniformis* példányon 19 morfometriai mérést végeztünk a South Australian Museum (SAMA), Museum Victoria (NMV), Australian Museum (AMS) és a Tasmanian Museum and Art Gallery (TMAG) Kétéltű- és Hüllőgyűjteményeiben (Vörös és mtsai. 2023, S2 táblázat), hogy a korábban felfedezett (Vörös és mtsai. 2008) két divergens mitokondriális DNS-vonal közötti morfológiai különbségeket megvizsgáljuk. A következő karaktereket mértük le 0.5 mm-es pontossággal egy Vernier-tolómérőt használva: testhossz (SVL), fejhossz (HL), fejszélesség (HW), orrhossz (SL), orrlukák közötti távolság (IND), orrcsúcs-orrnylás közötti távolság (NS), szemek közötti távolság (IOD), szem-orrcsúcs távolság (EN), szem átmérője (ED), tympanum átmérője (TD), combhossz (FeL), lábszárhossz (TL), lábfejhossz (FoL), mellső végtaghossz (FLL), alkarhossz a leghosszabb ujj végéig (RLF), 1. ujj tapadókorong átmérője hátsó végtagon (D1T), 4. ujj tapadókorong átmérője hátsó végtagon (D4T), 1. ujj tapadókorong átmérője mellső végtagon (D1F), 3. ujj tapadókorong átmérője hátsó végtagon (D3F).

A többváltozós adatelemzéshez a hím és nőstény egyedek adatait külön elemeztük és az eltérő testmérettel/életkorral összefüggésben lévő méretkülönbségeket a mérések standard SVL-re (nemenként átlagos értékre) történő skálázásával minimalizáltuk, Leonart és mtsai. (2000; 88. oldal) által leírt 13-mas egyenlet képletét használva (részletekért lásd Vörös és mtsai. 2023, 17. oldal). Az adatok átalakításához a GroupStruct R script-et használtuk (Chan & Grismer 2021). Az átalakított adatokon az R program 'prcomp' funkciójával főkomponens elemzést (PCoA) futtattunk, amely nem rendezi az adatokat előzetesen csoportokba, hogy feltárhassuk a példányok közötti, 19 morfológiai karakter által hordozott különbségeket. Azon karakterek leírásához, amelyek a két mtDNS-vonal közötti különbséget meghatározhatják, logaritmikus transzformáció után lineáris diszkriminancia elemzést alkalmaztunk az RStudio (v. 0.98.1028) MASS R package 'lda' funkcióját választva. Azért a diszkriminancia-elemzést használtuk, mert ezzel előre, vélhető taxonok szerint csoportosítani tudtuk az egyedeinket a genetikai elemzések eredményei és az ismert előfordulás alapján.

Bioakusztika

A 2008-2009 között végzett terepmunka során két *L. raniformis* hím egyed hívóhangját rögzítettük mind az északi (Murray River, Nampoo Station, ÚDW), mind pedig a déli csoportból (délkelet Dél-Ausztrália, Naracoorte). A Nampoo állomáson felvett hívóhangokat 19°C vízhőmérsékleten rögzítettük, és nem tudtunk testméret-paramétereket felvenni. A Naracoorte-n rögzített felvételek alatt 11°C vízhőmérsékletet mértünk, és a példányokat meg tudtuk mérni. A felvételekhez egy SONY TCD-D7 hordozható DAT felvevőt (Sony, Tokyo, Japan) és egy ECM-925 P Stage Line Phantom mikrofont használtunk (Monacor, Bremen, Germany). Rendelkezésre állt továbbá felvétel 5 *L. castanea* példánytól Yass település (ÚDW) mellett rögzítve (Hunter és mtsai. 2018). További *L. castanea* felvételeket elemeztünk a Frogs of southeast Australia (Grigg 1976) kazettáról, amelyet Guyra település mellett vettek fel az északi-fennsíkon (ÚDW) (= *flavipunctata*, Courtice & Grigg 1975). Hogy a földrajzi lefedettséget kiegészítsük, *L. raniformis* felvételeket igényeltünk a FrogID (Rowley és mtsai. 2019) citizen science projektől. A 130 FrogID felvételből 40 felvétel volt alkalmas a szoftveres elemzéshez (Vörös és mtsai. 2023, S1 ábra, S4 táblázat). A hangfelvételeket a Raven Pro 1.6© szoftverrel (<http://www.birds.cornell.edu/raven>) elemeztük. A spektrogramokat először fast-Fourier transzformációval (FFT) számoltuk (512 pont, 50% átfedés és 172 Hz frekvencia-felbontás), Hanning ablakokat használva. A hívóhangok leírására Köhler és mtsai. (2017) definícióját használtuk, és a hangokat a Beeman (1998) által leírt általános kategóriákba

soroltuk. Minden hím egyed esetében öt különböző hívóhangot elemeztünk, amelynek a hívás hossza (s), hívások között eltelt idő (s), a híváson belüli hangok száma, másodpercenkénti hangok száma (notes/s), hangokon belüli impulzusszám, másodpercenkénti impulzusok száma (pulse/s), domináns frekvencia, második legerősebb frekvenciacsúcs (Hz) valamint a sáv szélesség (Hz) paramétereit vettük fel. A FrogID projektben nem szereplő felvételeket a figshare (10.6084/m9.figshare.21067729) oldalon tettük elérhetővé, az elemzett FrogID felvételek számai pedig a Vörös és mtsai. 2023, S4 táblázatban láthatóak. A statisztikai elemzéseket a JMP14.1 szoftverrel futtattuk. Elsőként minden jellegzetesség esetében teszteltük, hogy normál eloszlásúak-e. Az átlagokat paraméteres próbákkal hasonlítottuk össze. Számos tanulmány megjelent már a *L. raniformis* hívóhangok elemzéséről, de nem találtunk konzisztenciát a hívóhang-szerkezet leírásában és a terminológiában (Littlejohn & Martin 1969, 1974; Loftus-Hills 1971; Hero és mtsai. 1991, Robinson 1993, Barker & Grigg 1977, Ford 1989, Thompson és mtsai. 1996, Clulow & Swan 2018, Sanders 2021). Mi a Thompson és mtsai. (1996) által használt terminológiát követtük, amelyben a hívóhang szerkezetet kétfázisúnak nevezi, és a 'growls' (morgás) és a 'grunts' (kuruttyolás) kifejezésekkel írja le a két különböző amplitúdómodulált hangegységet. Tanulmányunkban a faj elterjedését lefedve, Tasmániából, Victoria Államból és délkelet-Dél-Ausztráliából származó hangfelvételeket elemeztünk. Nem elemeztük viszont azokat a hangokat, amelyeket a hímek és a nőstények is adnak, és amelyekre Ford (1989) úgy utal, mint 'release' (elengedő) és 'distress' (veszély) hangok.

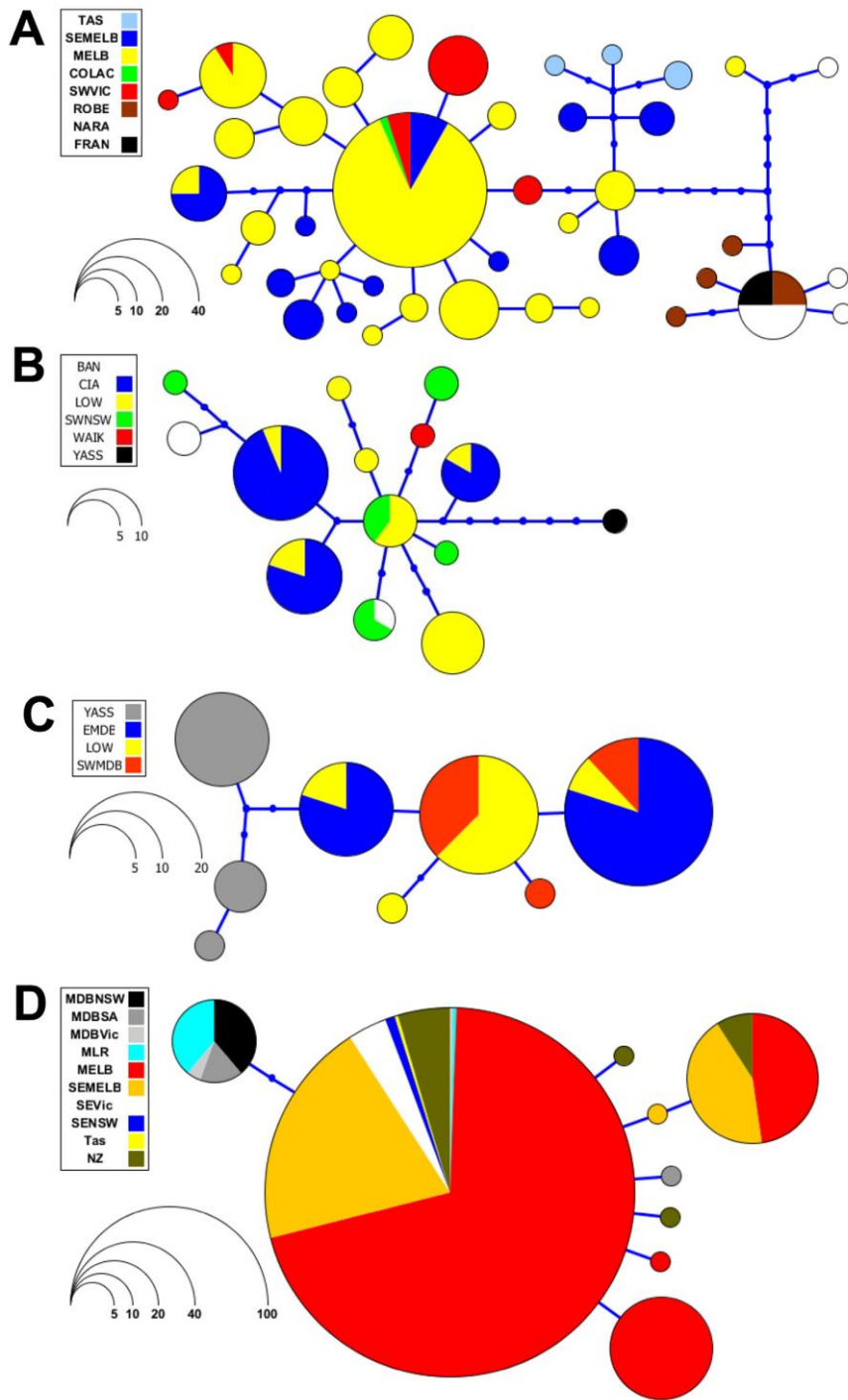
Eredmények

Genetikai változatosság

Mitokondriális DNS

A 665 bp hosszú mitokondriális ND4-fragment filogenetikai elemzése két jól elkülönülő *L. raniformis* kládot eredményezett, megerősítve a korábbi tanulmányban leírtakat (Vörös és mtsai. 2008, és 36. ábra). Az északi klád a Murray Darling-medencében (MDB) mintázott, a déli klád pedig a délkelet Dél-Ausztrália, Victoria és Tasmánia területén mintázott egyedeket foglalta magába. Az északi klád alacsony változatosságot mutatott, kivétel a *L. castanea* egyedek, amelyek elválnak a MDB mintáktól (37B ábra), és amely mintázatot a rövid, 193 bp hosszú ND4-fragment elemzése is megerősített további, múzeumi minták bevonásával (37C ábra). A déli klád viszont jelentős strukturálódást mutatott, amely elkülönítette a Dél-Ausztráliában, Victoria és Tasmánia Államokban gyűjtött mintákat (37A ábra). Az összes tasmán egyed (N=10) egy klaszterbe rendeződött, amelybe két közeli haplotípus is belekerült, amelyeket a Melbournetől keletre fekvő Cardinia (n=2) és Pakenham (n=3) településeken mintázott egyedek reprezentáltak. Minden délkelet Dél-Ausztráliából származó minta egy külön kládot alkotott, egy Naracoortból származó minta kivételével, amely a Melbourne mellől származó egyedekkel csoportosult.

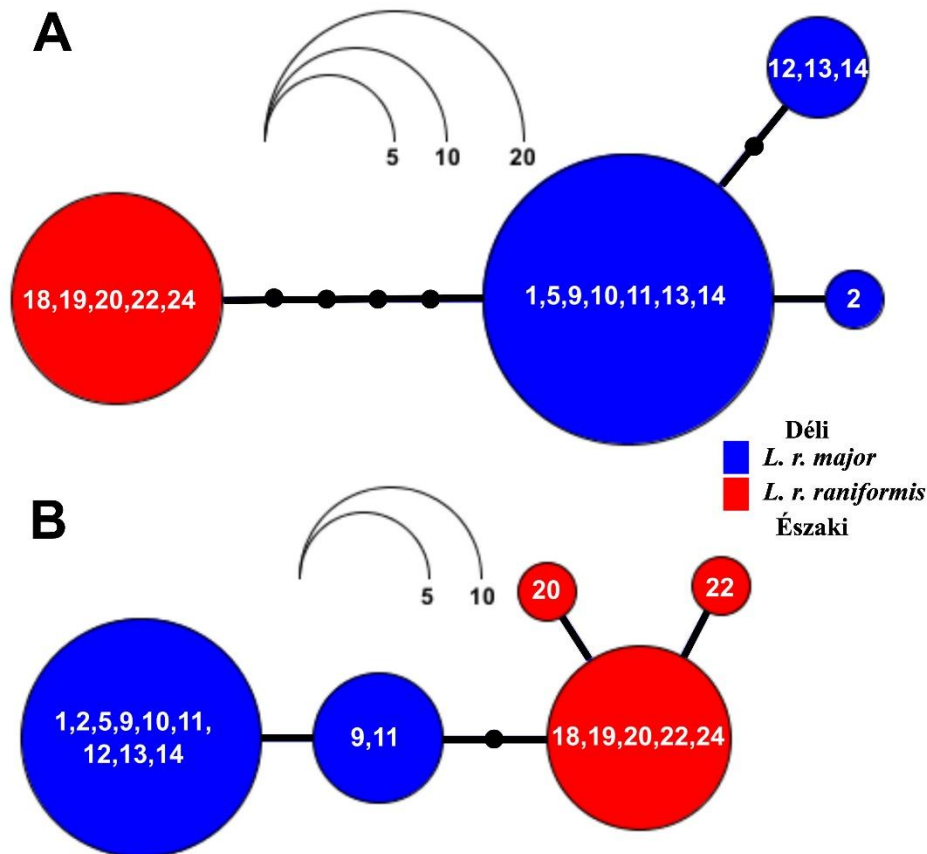
További érdekességekre derült fény a rövid, 45 bp hosszú cox1 fragment aDNS-elemzésével, és a korábbi, új-zélandi adatok bevonásával (37D ábra). Dél-Ausztrália Mount Lofty hegyvidékén ugyanis mind az északi (n=7), mind a déli (n=1) csoport képviselőit megtaláltuk. A Victoria Állam délkeleti részéről származó (Hill End, N=12) és a délkelet ÚDW területéről (Bombala, n=3) származó múzeumi példányok a déli csoporthoz kerültek. Az összes új-zélandi minta (N=21) a déli csoport részese lett, ahogy azt a Vörös és mtsai. (2008) tanulmányunkban leírtuk. Az északi és déli csoportok ND4 szekvenciái közötti átlagos szekvencia-különbség 7% volt, az északi és a *castanea* csoportok közötti különbség pedig 1% (Vörös és mtsai. 2023, 2. táblázat). Más *Litoria*-fajpárok esetében ez az érték 4-25% között mozog (Donnellan és mtsai. 2021, Rowley és mtsai. 2021). Összesen 35 diagnosztikus nukelotid-pozíció különböztette meg az északi és déli *L. raniformis* csoportot, 8 pozícióban különbözött a *L. castanea* és az északi *L. raniformis* csoport, 34 pozícióban a *L. castanea* és a déli *L. raniformis*, és 2 pozícióban a tasmán klád és a déli csoport (Vörös és mtsai. 2023, 3. táblázat).



37. ábra. Mitokondriális haplotípus-hálózat a *Litoria aurea* fajcsoportra A) ND4 déli csoport, B) ND4 északi csoport, C) rövid ND4 szekvenciák (193 bp) a *L. castanea* swab és múzeumi példányokkal, D) *cox1* rövid szekvenciák (468 bp). Mintavételi helyek rövidítései: Új-Dél-Wales: CIA—Coleambally Irrigation Area, LOW—Lowbidgee, SENSW—délkelet Új-Dél-Wales, SWNSW—délnyugat Új-Dél-Wales, MDBNSW—Murray Darling medence ÚDW, EMDB—keleti Murray Darling medence, SWMDB—délnyugati Murray Darling medence, YASS—Yass; Tasmánia TAS; Victoria: SEMELB—délkelet Melbourne MELB—Melbourne, COLAC—Colac, SEVIC—délkelet Victoria, SWVIC—délnyugat Victoria, MDBVIC—Murray Darling medence Victoria; Dél-Ausztrália: NARA—Naracoorte, FRAN—Francis, BAN—Banrock, WAIK—Waikerie, MDBSA—Murray Darling medence Dél-Ausztrália, MLR—Mount Lofty Ranges; New Zealand: NZ.

Nukleáris DNS

A 149 pb hosszú *GAPD Intron 4* (42 egyed) és a 198 hosszú *PDIA6 Intron 6* (34 egyed) fragment vizsgálata megerősítette az északi és déli vonalak szétválását (38. ábra). Az egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP) -elemzés során 61 egyed 65,898 SNP-információja állt rendelkezésre a *L. aurea*, mint kulcsoport bevonásával (Vörös és mtsai. 2023, S3 táblázat). Az egyedekre vonatkozó 0,9-es és 0,7-es szűrés-utáni küszöbértékek és a 100%-os ismételtetés mellett 59 egyed esetében 20,814 lókuszt maradt a további elemzésekhez. Amikor csak a belcsoporton alkalmaztuk a szűrést, akkor 47 egyed és 12,589 elemezhető lókuszt maradt. A PCoA elemzés (39A ábra) négy fő klasztert eredményezett: 1) *L. aurea*, 2) *L. castanea*, 3) északi *L. raniformis*, és 4) déli *L. raniformis* beleértve Tasmániát. Az első komponens a variancia 54%-át, a második a 28%-át, a harmadik pedig a 3.8%-át magyarázta. A kulcsoport nélküli PCoA-elemzés is négy klasztert adott, három azonos volt az első PCoA-elemzésben kapottakkal, egy pedig a Tasmániából származó mintákat foglalta magába (39B ábra). Két egyed (3-mas mintavételi hely Tasmániában és 14-es mintavételi hely Dél-Ausztráliában) a két fő klaszter közötti pozíciót foglalta el. Az első komponens a variancia 66%-át, a második a 9.5%-át, a harmadik pedig a 3%-át magyarázta.

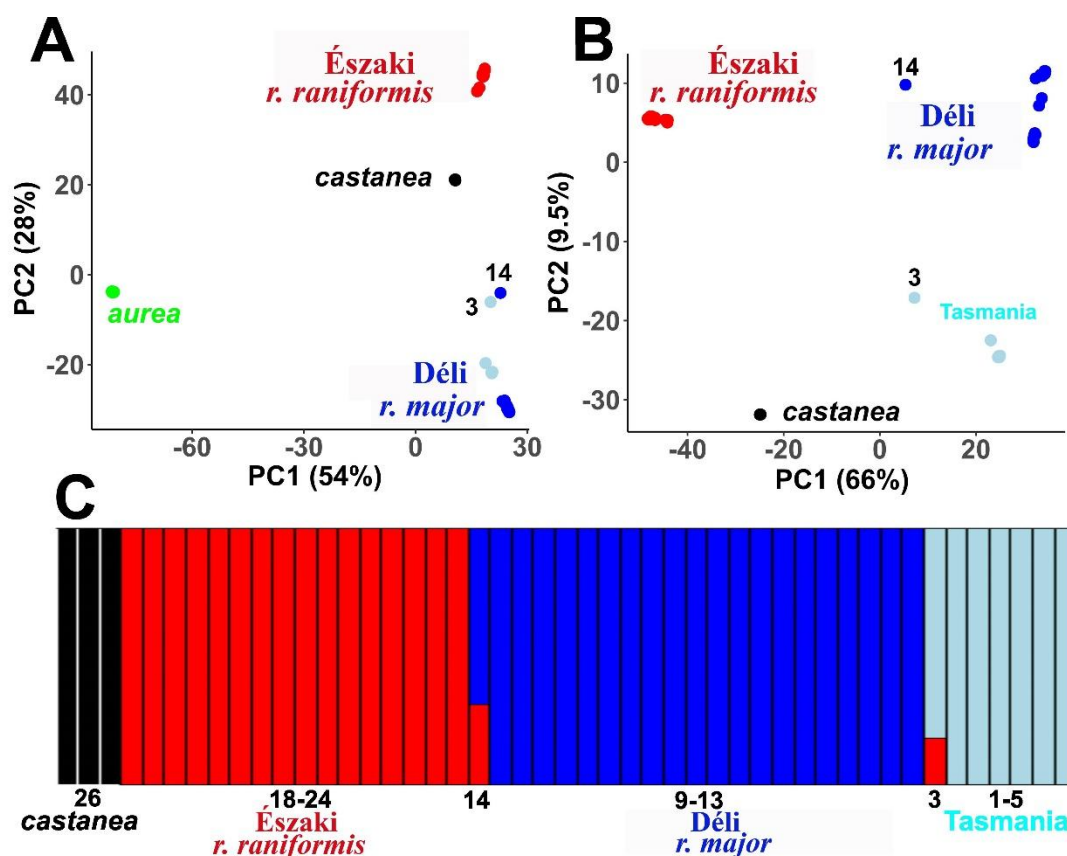


38. ábra. Nukleáris intron-hálózat a *Litoria aurea* fajcsoportra **A)** *PDIA6 Intron6*, **B)** *GAPD Intron4*. Északi csoport (*Litoria r. raniformis*)—piros és déli csoport (*L. r. major*)—kék. A haplotípus körökben szereplő számok a mintavételi helyek kódjai, amelyek megegyeznek a Vörös és mtsai. 2023, 1. táblázatában és a 35. ábrán található kódokkal.

A fastSTRUCTURE klaszterelemzésben (kulcsoport nélkül) (39C ábra) az optimális klaszterszám megegyezett a PCoA-ban kapottakkal (39B ábra). A fent említett két egyed itt is köztes pozíciót foglalt el, így tovább vizsgáltuk őket a NewHybrids elemzéssel, vajon lehet-e ez a két egyed hibrid származású. Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét egyed valószínűleg hibrid eredetű (Vörös és mtsai. 2023, S3 táblázat). A 14-es mintavételi helyről származó egyed egy északi x déli hibrid volt, amely visszakereszteződött a déli vonallal. A 3-

mas mintavételi helyről származó egyed is egy északi x déli hibridizáció eredménye, ami visszakereszteződött a tasmán déli vonallal.

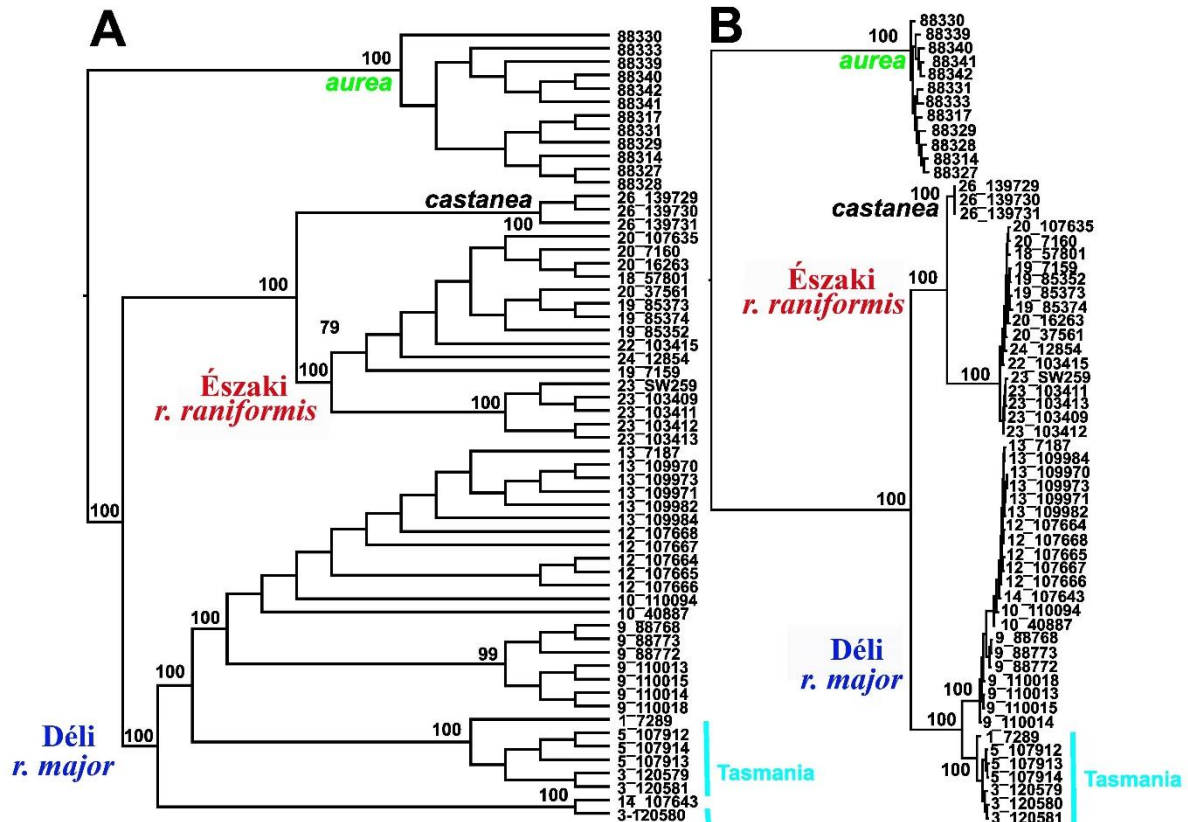
Az SNP-adatsor elemzése is négy klasztert adott (40. ábra), hasonlóan a *L. aurea* nélkül futtatott PCoA-hoz (39B ábra). A legnagyobb különbséget a déli vonal + tasmán populációk és az északi vonal + *L. castanea* között tapasztaltuk. A *L. castanea* az északi vonal testvércsoportja, míg a tasmány állomány a déli vonal testvércsoportja. Ezeket a kapcsolatokat mind a ML és az SVDQuartets elemzések is alátámasztották. A két hibrid egyed hovatartozása váltakozott a két filogenetikai elemzés során, és vagy mindkettő a déli vonal és a tasmán állományokhoz közelített (40A ábra), vagy a közeli mintavételi helyekről származó egyedekkel csoportosult (40B ábra). Ez a bizonytalanság is a kevert genomjuknak köszönhető. A magas szekvencia-divergencia értékeket a 13. táblázatban láthatjuk.



39. ábra. SNP klaszterelemzés a *Litoria aurea* fajcsoport esetében. A) PCoA az SNP adatokra a *L. aurea* mint külsóport bevonásával, B) PCoA az SNP adatokra a *L. aurea* külsóport nélkül, C) fastSTRUCTURE származási oszlopdiagramja.

	1	2	3	4	5
N	12	4	16	22	7
1 – <i>L. aurea</i>	-	15276	17351	18741	16936
2 – <i>L. castanea</i>	426 ¹	-	4029	7681	5741
3 – északi csoport (<i>L. r. raniformis</i>)	596 ²	265 ⁵	-	7578	5023
4 – déli csoport (<i>L. r. major</i>)	1364 ³	1574 ⁶	2240 ⁸	-	660
5 - Tasmania	1115 ⁴	1155 ⁷	1645 ⁹	438 ¹⁰	-

13. táblázat. SNP fix különbségek mátrixa. Felső mátrix: fix különbséget mutató lókuszok száma; alsó mátrix: fix különbséget mutató lókuszok várható száma a szimuláció után. Mindegyik páronkénti összehasonlítás szignifikáns volt a szimuláció után.

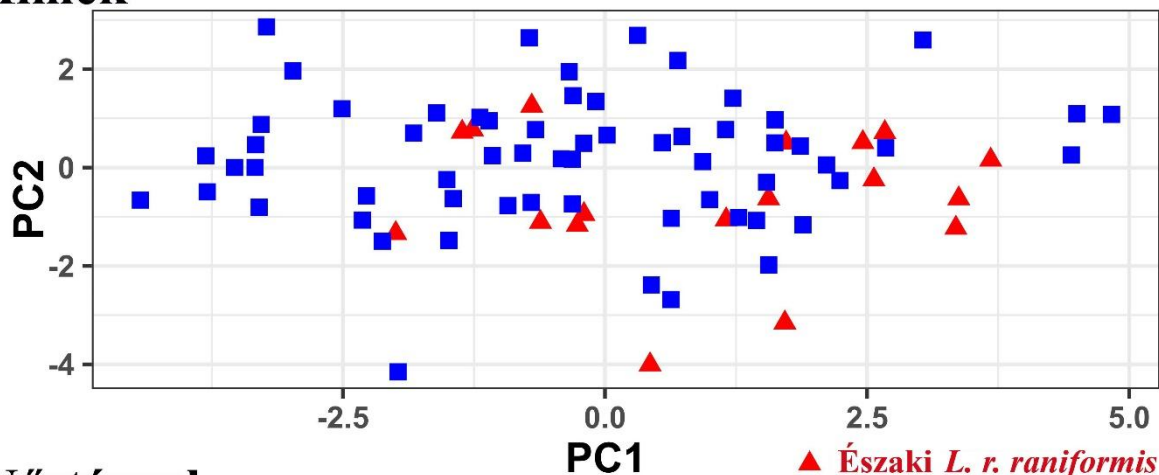


40. ábra. Az SNP-adatok filogenetikai elemzése a *Litoria aurea* fajcsoport esetében. A) IQTree, B) SVD Quartets törzsfa a *Litoria aurea* fajra gyökereztetve.

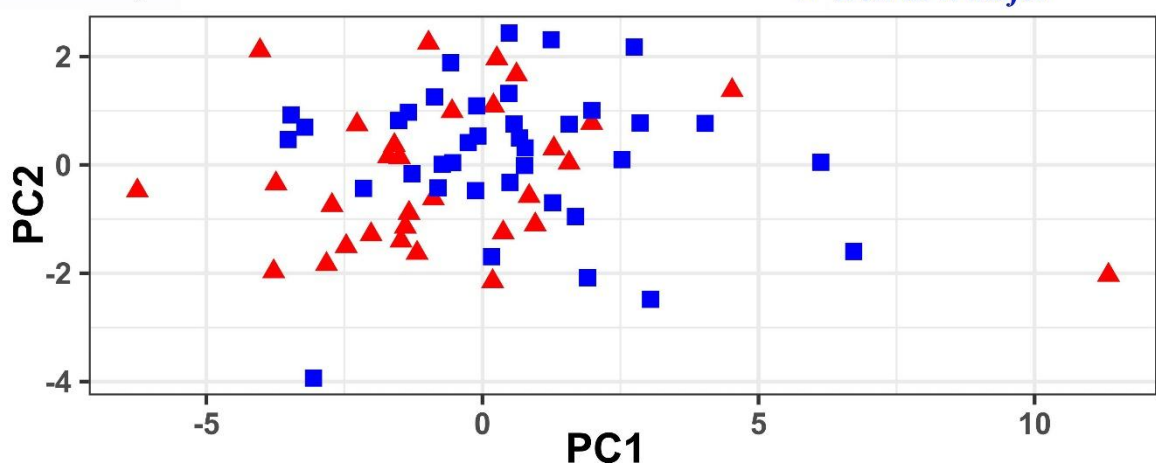
Morfológia

A 17 morfológiai karakteren alapuló PCoA-elemzésben a hímek esetében variancia 70%-át, a nőstények esetében 63.5%-át magyarázta az első és a második főkomponens (Vörös és mtsai. 2023, 5. táblázat) Az összes PC1-koefficiens negatív volt és erős korrelációt mutatott. A két főkomponens mentén a két genetikai vonal nem vált szét sem a hímek, sem a nőstények esetében (41. ábra). A lineáris diszkriminancia-elemzés enyhe csoportpredikciót talált az északi és a déli csoportokra (Vörös és mtsai. 2023, 8. ábra). A hímek esetében a 62-ből 59 (déli vonal) és a 18-ből 11 (északi vonal) egyed helyesen klasszifikált az elemzés, 88%-os klasszifikációs sikerrel. A nőstények esetében a 38-ből 35-öt (déli) és a 31-ből 27-et (északi) klasszifikált helyesen az elemzés, 78%-os klasszifikációs sikerrel. A hímeknél a TL, HW, RLF és FoL karakterek, míg a nőstényeknél a HW, TL és HL karakterek szerezték a legmagasabb értékeket (Vörös és mtsai. 2023, 5. táblázat).

Hímekek



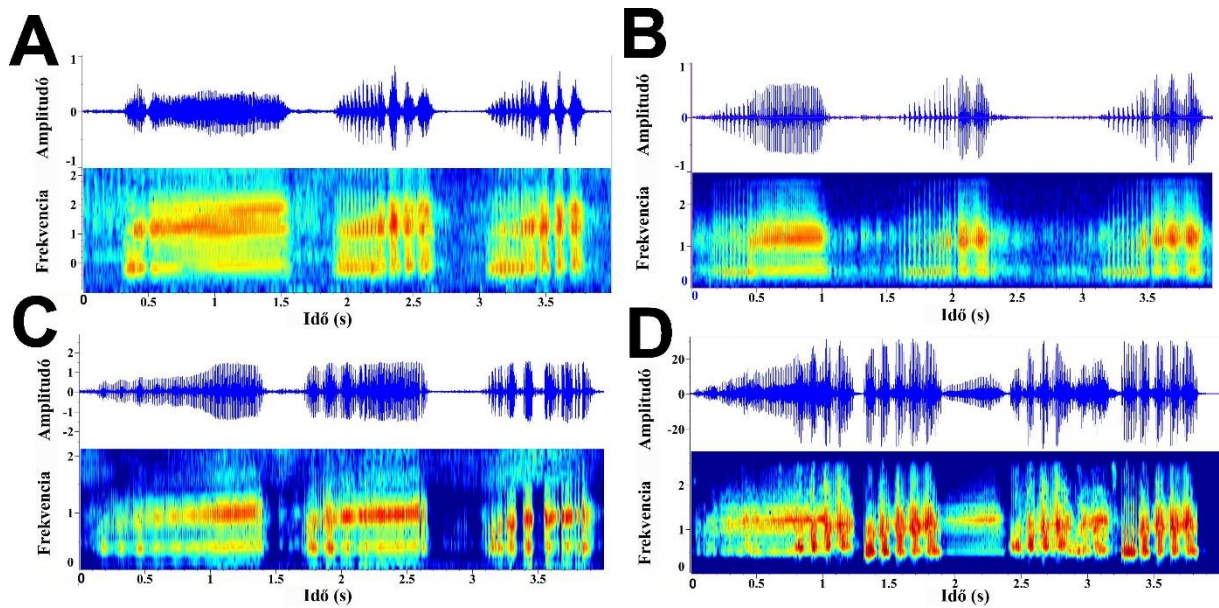
Nőstények



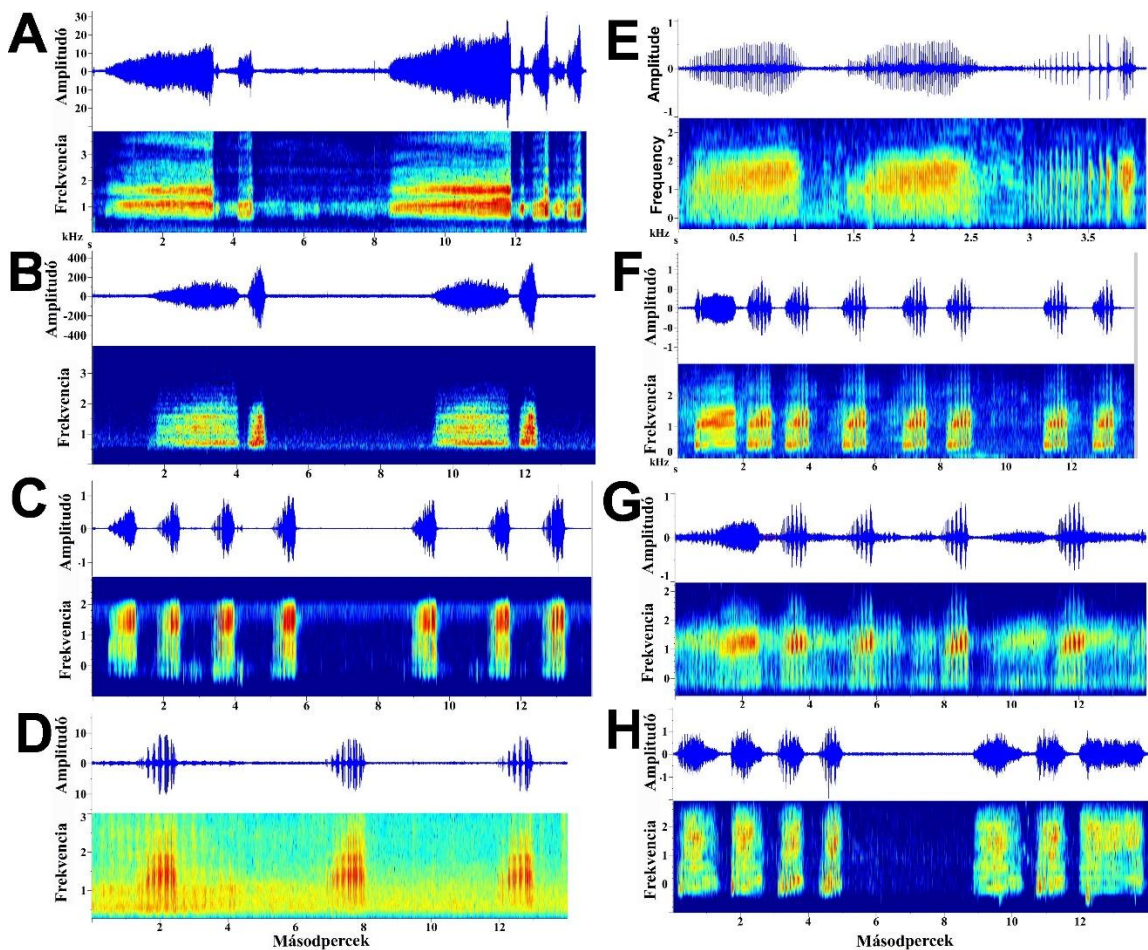
41. ábra. A morfológiai változókon alapuló PCoA elemzés a *Litoria raniformis* vizsgált hím és nőstény egyedeire. Piros háromszög: *L. r. raniformis*, kék négyszög: *L. r. major* az első két főkomponensen ábrázolva.

Bioakusztika

A hívóhangok részletes jellemzése a Vörös és mtsai. (2023) tanulmány kiegészítő dokumentumának Bioacoustics fejezetében olvasható, a 42., 43. és Vörös és mtsai. 2023, 11. ábrákon látható. A *L. castanea* és az északi vonal hívóhangjai viszonylag konzervatív struktúrát mutatnak: egy „morgás” hang, amit 1-3 „kuruttyolás” hang követ (42. ábra). A déli csoport hangszerkezete jóval változatosabb, 1-15 „morgás” hanggal (43. ábra), és a „kuruttyolás” hang vagy a hívás elején szólal meg, vagy némely esetben a „morgás” hangok között. A „morgás” hang hosszában, a „kuruttyolás” hang hosszában, és a „kuruttyolás” hangok közötti szünetek hosszában nem találtunk különbséget a két csoport között (Vörös és mtsai. 2023, 11. ábra és S2 táblázat). Összefoglalva, az északi vonal és a *L. castanea* hívóhangok változatossága és struktúrája beleillik a déli vonal hívóhang-terjedelmébe. Különbséget fedeztünk fel viszont az északi és a déli vonalak között a „kuruttyolás” hangok másodpercenkénti impulzusok számában, de nem különült el ezektől a *L. castanea* északi vagy déli állománya sem. A „morgás” hangok mindig hosszabbak, mint a „kuruttyolás” hangok (42. ábra, Vörös és mtsai. 2023, S1 táblázat). A „morgás” és a „kuruttyolás” hangok hullámhossz és amplitúdó-karakterisztikája hasonló karaktereket mutat (43. ábra).



42. ábra. Az amplitúdó-variancia oszcillogramja (felső két ábra) és a frekvencia variancia spektrogramja (alsó két ábra) a *Litoria aurea* fajcsoport tagjaira. **A)** északi csoport (*Litoria r. raniformis*) Nampoo Station mintavételi helyről, ÚDW (19°C); **B)** déli csoport (*L. r. major*) Naracoorte mintavételi helyről, DA (11°C); **C)** *L. castanea* déli fennsík Yass közeléből, ÚDW, és **D)** a *L. castanea* északi fennsíkről Guyra közeléből, ÚDW.



43. ábra. Hívóhangok variabilitása az északi csoporton belül (*Litoria r. raniformis*), és a déli csoporton belül (*L. r. major*). A hívóhangokat amplitúdójukkal és frekvenciájukkal jellemeztük. Déli csoport (*L. r. major*) **A)** FrogID 14807 Lerderderg, Vic, **B)** FrogID 80214 Ulverstone, Tas, **C)** FrogID 106682, Modewarre, Melbourne, Vic, **D)** FrogID 187824, Craigieburn, Vic. Északi csoport (*Litoria r. raniformis*) **E)** FrogID 39724, Darlington Point, ÚDW, **F)** Nampoo, DA, **G)** FrogID 84334, Balranald, ÚDW, **H)** FrogID 168737, Hay, ÚDW.

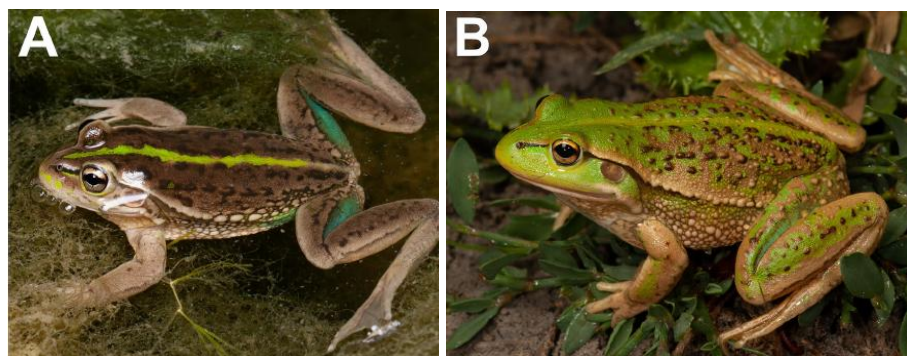
Szisztematikai vonatkozások

A terepen és múzeumban vizsgált egyedek morfológiai hasonlósága ellenére mind a mitokondriális DNS, mind pedig a nukleáris markerek alátámasztották, hogy az északi és a déli *L. raniformis* populációk önálló evolúciós vonalat képviselnek. A mtDNS- és a nukleáris DNS-mintázatának hasonlósága arra enged következtetni, hogy a *L. raniformis* fajképződési folyamata a külső jegyek és a hímek hívóhangjának jelentős differenciálódása nélkül ment végbe. Figyelembe véve a két vonal közötti hibridizáció tényét két egymástól távol eső mintavételi helyen, a két vonalhoz alfaji státuszt rendeltünk de Queiroz (2020) definíciója alapján. De Queiroz definíciója kimondja, hogy az alfaj nem a fajtól eltérő koncepció, hanem a faj evolúciójának egy olyan állomása, ahol a genetikai izoláció nem teljes. A visszakereszteződött hibridek jelenléte a tasmániai és dél-ausztráliai lelőhelyeken azt sugallja, hogy a hímek hívóhangja nem egy erős pre-izolációs mechanizmus, amit a két vonal hívóhang-paramétereinek hasonlósága is alátámaszt.

Az északi és déli vonalak alfajjá minősítése felveti a *L. castanea* taxonómiai besorolásának kérdését. A genetikai adatok a *L. castanea*ként meghatározott populáció faji rangú besorolását nem indokolják. A *L. castanea* populáció és az északi *L. raniformis* között igen alacsony a genetikai különbség és a többi Pelodryadidae családba tartozó fajpár genetikai különbségértéke alatt marad (Donnellan és mtsai. 2021, Rowley és mtsai. 2021). A *L. castanea* északi és déli populációinak taxonómiai státuszát is érdemes lenne vizsgálni, de ehhez múzeumi példányok genetikai elemzésére lenne szükség, ami pedig a jelenleg rendelkezésre álló formalinban tárolt példányokon problémás.

A *Litoria raniformis* fajt Keferstein írta le 1867-ben *Chirodryas raniformis* néven Ausztráliából, és a holotípust a Göttingeni Egyetem Zoológiai Múzeumában helyezte el, majd később áthelyezték a Bonni Alexander Koenig Kutatómúzeumba (ZMFK). Sajnos a típuspéldány egyik intézetben sem lelhető fel (Wolfgang Böhme személyes közlés). A holotípus hiányában, a típuslelőhely pontos ismerete nélkül, és a névhalmozás elkerülése érdekében a *Chirodryas raniformis* nevet az északi alfajhoz rendeltük. Kijelöltünk egy neotípust az alfaj elterjedésének közepéről, a Murray-Darling-medencéből, ahol csak ez az alfaj található meg. Copland 1957-ben írta le a *Hyla aurea major* alfajt Tasmániából, Collins Gap közeléből. Jóllehet Copland a *Hyla aurea major* alfajt a nagyobb testméretük alapján különítette el a *H. a. raniformis* alfajtól, csak a déli alfaj Gippsland, közép-Victoria és délkelet Sél-Ausztrália területén befogott egyedekkel hasonlította össze őket. A *H. a. major* holotípusát a Queen Victoria Múzeumban (QVM) helyezték el Launcestonban, Tasmaniában, de a példány elveszett (Kathryn Medlock, Gerinces Zoológiai Gyűjtemény kurátora, QVM, személyes közlés). Kijelöltünk tehát egy neotípust a déli alfaj számára is, TMAG C290 leltári számú példányt Lauderdaleből, amely a legjobb állapotban megmaradt példány a gyűjteményben, és a típuslelőhelytől nagyjából 30 km-re gyűjtötték.

A *Litoria raniformis raniformis* és a *Litoria raniformis major* alfajok (44. ábra) neotípusainak kijelölését és az alfajok jellemzését lásd Vörös és mtsai. 2023, 30-36. oldalakon.



44. ábra. A: *Litoria raniformis major*, B: *Litoria raniformis raniformis*

Diskusszió

IUCN veszélyeztetettségi kategóriaértékelés

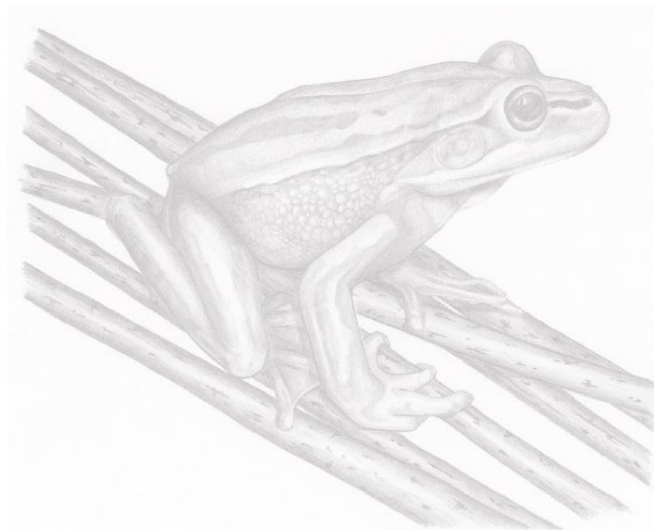
Tanulmányunkban megállapítottuk, hogy a *Litoria raniformis* fajt két evolúciós vonal alkotja, amelyek csak genetikai vizsgálatok útján azonosíthatóak megbízhatóan. Ennek következményeként számos olyan terület van, ahol további, genetikai vizsgálatok szükségesek a két alfaj pontos elterjedésének feltérképezéséhez, addig a megfelelő IUCN kategória nem állapítható meg.

Ember által elősegített terjedés

A *Litoria aurea* fajcsoportot alkotó fajok ember általi terjesztéséről régóta vannak feljegyzések. A *L. aurea* fajt az 1860-as években Új-Zélandra, a 19. század végén Vanuatu szigetére és a Loyalty-szigetekre, az 1960-as években Vanuaturra, és az 1930-as években Wallis- és Fortuna-szigetekre hurcolták be (Ineich és mtsai. 2015), míg a *L. raniformis* az 1860-as években Új-Zélandra telepítették be (Thomson 1922, Vörös és mtsai. 2008). Ausztrálián belül a *L. cyclorhyncha* fajt Délnyugat-Ausztráliából telepítették be az 1990-es években a Nullarbor-síkságtól keletre, azóta továbbterjedt keleti irányba (Ehmann 2013) nemkívánatos ökológiai változásokat okozva (Taylor és mtsai. 2020).

Az 1972 és 1979 között a Mount Lofty Ranges Onkaparinga völgyében gyűjtött múzeumi példányok genetikai vizsgálata szerint a *L. raniformis* egyik vagy mindkét alfaját betelepítették Dél-Ausztráliába. A fajt azóta nem találták meg a Mount Lofty Rangesből (Armstrong és mtsai. 2003). Mivel csak mtDNS-szekvenciákat vizsgáltunk, nem tudjuk biztosan megítélni, hogy a két alfaj genetikailag elkülönült-e egymástól az együttes előfordulás ezen időszakában. Armstrong és munkatársai (2003) azt találták, hogy a fajt gyakran tartották kedvtelésből az 1960-as és 1970-es években Adelaide-ben, így valószínű, hogy a megunt állatokat elengedték a környék állandó víztestjeibe, vagy elszöktek a terráriumból.

A Tasmánia északi részén talált *L. r. raniformis* felmenőkkel rendelkező visszakereszteződött hibrid egyed egyértelmű bizonyítéka a kontinensről Tasmániába terjedésére egy vagy két generációval ezelőtt, de az is elképzelhető, hogy a *L. r. raniformis* fajnak van egy fel nem fedezett állománya a szigeten. Kevésbé megmagyarázható a Dél-Ausztrália keleti részén, a *L. r. major* elterjedésének keleti határán talált hibrid egyed. Hogy megállapítsuk, vajon ember általi telepítés vagy természetes terjedés eredménye, ehhez a két alfaj előfordulásának pontosabb ismerete lenne szükséges. Úgy tűnik, a *Litoria*-fajok ember általi terjesztése egy állandó probléma, ami főként annak köszönhető, hogy tetszetős külsejük miatt kedvelt terráriumi állatok.



5. Integratív taxonómia Dél-Amerikában öt új faj leírásával

5.1. A *Phyllodytes amadoi* és ebihalának leírása Brazília atlanti esőerdejéből

Az atlanti esőerdő Brazília keleti partvidékén húzódik, és a világ egyik legfajgazdagabb területe (Myers és mtsai. 2000). Az elmúlt 500 évben az atlanti esőerdő eredeti kiterjedésének közel 88%-a eltűnt, és helyét az ember által módosított tájak, mint például legelők, szántóföldek vagy települések vették át (Ribeiro és mtsai. 2009; Tabarelli és mtsai. 2004). Viszonylag kis fennmaradt területe (4000 km²) ellenére Brazília kétéltű-faunájának fele itt található, és Brazílián belül itt a legmagasabb (85 %) az endemizmusok száma (Cruz & Feio 2007, Haddad és mtsai. 2013).

A *Phyllodytes* Wagler (1830) fajok a Brazília keleti részén található atlanti esőerdő endemikus békafajai. Az ebbe a nemzetségbe tartozó fajokat az állkapocscsonton növevő odontoidok és a broméliákhoz való erős kötődésük alapján lehet megkülönböztetni a többi kétéltűfajtól. A broméliák szárában összegyűlt vízben élnek, szaporodnak, ide rakják le petéiket és a lávafejlődés is itt megy végbe (Bokermann 1966, Caramaschi és mtsai. 2004, Cunha & Napoli 2016, Peixoto 1995). A nemzetséget jelenleg tizenkét leírt faj képviseli (Marciano-Jr és mtsai. 2017, Segalla és mtsai. 2016), amelyek közül hat fordul elő Bahia Állam déli részén - *P. luteolus*, *P. tuberculosus*, *P. megatympanum*, *P. melanomystax*, *P. wuchereri* és *P. maculosus*, de úgy tűnik, ez a diverzitás messze alulbecsült (Dias és mtsai. 2014a, b, Frost 2017). Bár a *P. kautskyi*-t megfigyelték a Bahiában található Serra Bonita (Camacan) és az RPPN Estação Veracel (Porto Seguro) területén, ezek a megfigyelések megerősítésre szorulnak. Például, a *P. kautskyi* dél-bahiai észlelésekor Simon & Peres (2012) nem adott morfológiai jellemzést, ami elkülöníthette volna a hozzá nagyon hasonló *P. maculosustól*.

A kétéltűek taxonómiájának fontos része a lárvaalakok ismerete is (Blotto és mtsai. 2020). A *Phyllodytes* nemzetségen belül eddig 10 faj esetében írták le az ebihalakat (Magalhães és mtsai. 2015, Santos és mtsai. 2019, Dias és mtsai. 2020), de a *P. maculosus*, *P. megatympanum*, *P. kautskyi*, *P. punctatus* ebihal alakja még ismeretlen.

Tanulmányunkban egy új *Phyllodytes*-fajt és annak ebihalát írtuk le a Bahia Állam déli részén található atlanti esőerdőből, morfológiai és bioakusztikai adatok alapján.

Módszerek

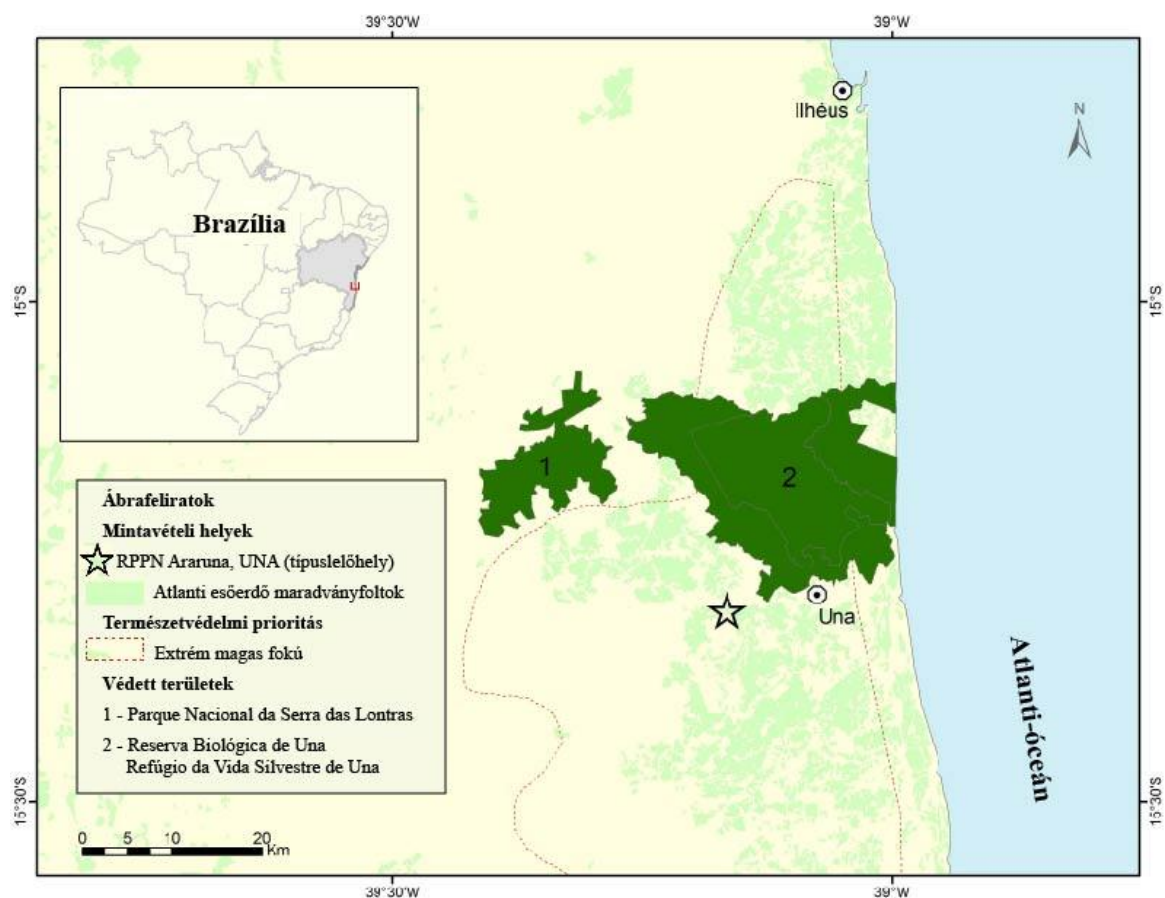
2015 és 2016 között az új faj huszonkét példányát gyűjtöttük be az Una településhez tartozó Araruna Magánrezervátumban (45. ábra). A kifejlett és a fiatal példányokat kézzel gyűjtöttük be, majd további feldolgozás céljából az Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) laboratóriumába szállítottuk. A példányok kémleletes elaltatása lidokainnal történt. A példányokat egy éjszakán át 10 %-os formalin-oldatban rögzítettük, majd 70 %-os etanolban tartósítottuk. A típusorozat példányait a Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahía, Brazília (MZUESC), a Magyar Természettudományi Múzeum (HNHM), a Museu de Zoologia of the Universidade Federal da Bahia (MZUFBA) és a Museu Nacional Rio de Janeiro (MNRJ) kétéltű- és hüllőgyűjteményeiben helyeztük el.

A morfológiai méréseket egy digitális tolómérővel végeztük (0,01 mm pontossággal) ami egy Leica sztereomikroszkóp okulár mikrométere volt. A következő 14 morfometriai paramétert mértük le 20 kifejlett példányon Duellmann (1970) és Heyer és mtsai. (1990) definícióit követve: testhossz (SVL), fejhossz (HL), fejszélesség (HW), orrlyukak közötti távolság (IND), szem-orrlyuk távolság (END), szemátmérő (ED), felső szemhéj szélessége (UEW), szemek közti távolság (IOD), dobhártya átmérő (TD), mellső végtaghossz (HL), combhossz (THL), lábszárcsont hossza (TL), lábfej hossza (FL), mellső végtag tapadókorong átmérő (FD). Az úszóhártyák jellemzésénél Myers & Duellman (1982) rendszerét követtük.

A hímek hívóhangjának rögzítéséhez egy Tascam DR1 digitális hangfelvevőhöz csatlakoztatott Sennheiser ME45 egyirányú mikrofont használtunk. A mikrofont a béka tartózkodási helyétől hozzávetőlegesen 10-20 cm távolságra helyeztük el a példány által elfoglalt bromélia belsejében. A hangfelvételeket a Raven Pro 1.4 programmal elemeztük 44,1 kHz-en, 16 bites felbontással. Az oszcillogramokat és az spektrogramokat a következő paraméterek szerint

állítottuk elő: 72 pontos FFT, hann ablak, 50 %-os átfedéssel. A hívóhangok terminológiájára Duellman & Trueb (1986) leírását követtük.

Az élő példányok színét terepi megfigyelések és élő példányokról készült fényképek alapján írtuk le. Az állatok nemét a másodlagos nemi jellegek, például a hüvelykvánkosok és a hangrések alapján határoztuk meg.



45. ábra. A *P. amadoi* sp. nov. típuslelőhelye Dél-Bahíában, Brazíliában. Atlanti esőerdőmaradványok és természetvédelmi prioritások ábrázolása az SOS Mata Atlântica (2014) és a Környezetvédelmi Minisztérium, MMA (2000) alapján.

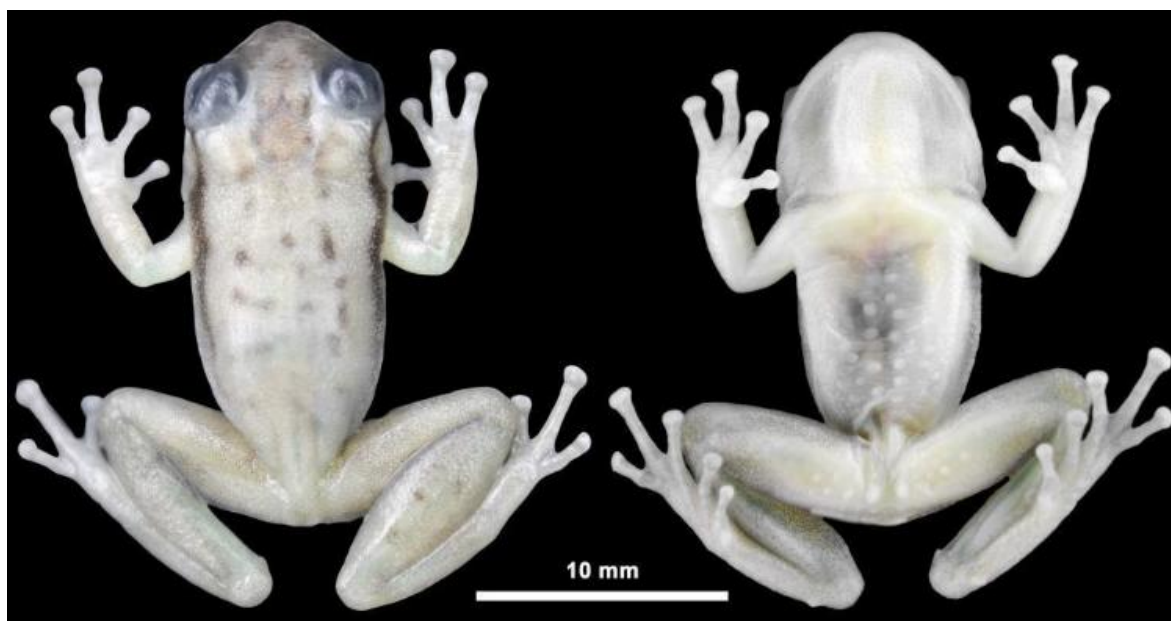
Hat, 25-30 Gosner-stádiumú (Gosner 1960) ebihalat gyűjtöttünk be az Una településhez tartozó Araruna Magánrezervátumban 2019 október 17-én, ahonnan a típuspéldányok is származtak. Kifejlett *P. amadoi* példányok is jelen voltak ugyan abban a broméliában. Mivel csak két *Phyllodytes*-faj – *P. amadoi* és *P. melanomystax* – él ezen a területen és a *P. melanomystax* ebihala már leírásra került (Caramaschi és mtsai. 1992), azt feltételeztük, hogy a begyűjtött ebihalak a *P. amadoi* fajt képviselik. Továbbá, a *P. melanomystax* a fák magasabban fekvő régiójában élő broméliák tankjában szaporodnak, míg a *P. amadoi* terasztriális vagy kis méretű epifita broméliákban él a fák talajhoz közelebb eső részén. A példányokat az Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Trópusi Ökológiai Laboratóriumába szállítottuk vizsgálat és mérés céljából. Feldolgozás után pedig az egyetem Zoológiai Múzeumának (MZUESC) Kétféltű- és Hüllőgyűjteményében helyeztük el MZUESC 22073 – 22078 leltári számokon. Minden példányon a következő morфомetriai paramétereket mértük le egy Leica S9I sztereomikroszkóp (Leica, Wetzlar, Germany) alatt: teljes testhossz a fark végéig (TL), testhossz (BL), testszélesség (BW), fark részen lévő izomzat szélessége (WTL), tastmagasság (BH), háti úszó magassága (DFH), fark részen lévő izomzat magassága (HTL), hasi úszó magassága (VFH), szemek közötti távolság (IOD), orrlyukak közötti távolság (IND), szem és orrcsúcs közötti távolság (ESD), orrcsúcs és orrlyukak közötti távolság (NSD), szem átmérője (ED) és a orrlyukak átmérője (ND) Altig & McDiarmid (1999) definícióit követve.

Eredmények

Phyllodytes amadoi sp. nov.

Általános besorolás. – Az új fajt a morfológiai (odontoidok a mandibulán, kéztő- és lábtőgumók és a hason található szemölcsözöttség) bioakusztikus és élőhelyhasználati (broméliák) jellemzők alapján a *Phyllodytes* nemzetségbe soroltuk.

Holotípus. – MZUESC 14954, adult hím (46. és 47. ábrák), 2015 október 7-én begyűjtve, gyűjtők: Iuri Dias, Leandro O. Santos és Mirco Solé. Típuslelőhely: Una, RPPN Ararauna (15° 18' 38.3" S, 39° 9' 55.9" W, WGS84, 96 m tszf magasság), Bahia Állam, Brazília.



46. ábra. *Phyllodytes amadoi* sp. nov. alkoholban konzervált példánya (holotípus, MZUESC 14954, SVL = 20 mm).

Paratípusok. – Hat adult hím (MZUESC 14950, 14955, 14958, 14960 és MNRJ 91484–85) és két adult nőstény (MZUESC 14957 és 14959) a holotípussal együtt gyűjtve; két adult hím (MZUESC 14952–14953) 2015 szeptember 3-án begyűjtve, gyűjtő: Caio Vinícius de Mira Mendes, Iuri R. Dias és Mirco Solé és kilenc adult hím (MZUESC 14941, 14943–45, 14949, UFBA 14929–30 és HNHMHER 2017.61.1–2.) 2015 november 17-én begyűjtve, gyűjtők: Iuri R. Dias, Andrés Egea Serrano, Mirco Solé és Judit Vörös. Minden egyed a típuslelőhelyen lett begyűjtve.

További példányok. – Két juvenilis (MZUESC 14946 és 14942) begyűjtve 2015 november 17-én, gyűjtők: Iuri R. Dias, Andrés Egea Serrano, Mirco Solé és Judit Vörös. Ezek a példányok nem képezik a típusorozat részét.

Diagnózis. – Kis termetű faj, SVL = 21,7-23,0 mm a nőstényeknél (n = 2) és 15,6-21,5 mm a hímeknél (n = 18), jellemzői: 1) a test, a mellső és hátsó végtagok felülről világosbarnák vagy zöldes színűek, apró, szabálytalan barna foltokkal; 2) keskeny barna csík jelenléte a canthus rostralison (szem és orr közötti szög); 3) a szem sarkától a lágycsúsig húzódó széles barna csík; 4) az orrcsúcs rövid, felülről nézve lekerekített, profilban függőleges, kis csúcsos gumóval; 5) két nagy, egymástól távol eső és öt kis odontoid az állkapocs mindkét oldalán; 6) egy-három kéztő- és lábtőgumó; 7) hat különálló sorban elhelyezkedő szemölcsök a hason, amelyek a két középső sorban lényegesen nagyobbak, mint a második és harmadik sorban, és 8) többszörös hangsorozatból álló hívóhang, hívásonként 13-17 hanggal, átlagosan 14 hanggal. $5 \pm 4,3$ impulzus hangonként, a hang hossza 2,99-4,106 s, domináns frekvencia 3789,8-4306,6 Hz között.

Összehasonlítás más *Phyllodytes*-fajokkal. – A háti mintázat megkülönbözteti a *P. amadoi* fajt a *P. maculosus*-tól (halványbarna szabálytalan krémszínű foltokkal), a *P. brevisrostris*, *P. edelmoi*, *P. megatympanum*, *P. kautskyi* és *P. luteolus* fajoktól (foltok hiányoznak), *P. wuchereri*-től (hosszanti csíkok), a *P. gyrinaethes*-től (változatos márványozott minta) és a *P. punctatus* és *P. tuberculosus* fajoktól (barna pöttyök). A *P. amadoi* átlagos testmérete (SVL) kisebb (21.7–23.0 mm nőstényeknél és 15.6–21.5 mm hímeknél) mint bármelyik másik *Phyllodytes*-fajnak, de a nagyobb példányok mérete átfed a *P. punctatus* (18.2–22.8 mm, n = 10; Caramaschi & Peixoto 2004), *P. tuberculosus* (24.0–26.0 mm, n = 2; Bokermann 1966 és 21.1–25.8 mm, n = 10; Caramaschi & Peixoto 2004), *P. melanomystax* (20.0–26.6 mm, n = 45; Caramaschi és mtsai. 1992), *P. luteolus* (15–24 mm, n = 186; Ferreira és mtsai. 2012) és *P. megatympanum* (21.3–23.7 mm, n = 4; Marciano-Jr és mtsai. 2017) fajokkal. A többi faj ennél nagyobb méretű: *P. acuminatus* (23.0–24.5 mm, n = 2; Bokermann 1966), *P. brevisrostris* (22.0–24.0, n = 4; Peixoto & Cruz 1988), *P. edelmoi* (23.5–28.7 mm, n = 20; Peixoto és mtsai. 2003), *P. gyrinaethes* (23.9–27.9 mm, n = 20; Peixoto és mtsai. 2003), *P. maculosus* (39.7–48.5 mm, n = 3; Cruz és mtsai. 2006), *P. kautskyi* (38–43.5 mm; n = nincs információ; Cruz és mtsai. 2006) *P. wuchereri* (25.1–27.1 mm, n = 5; Caramaschi és mtsai. 2004).

Az orrcsúcs lekerekített felülnézete megkülönbözteti a *P. amadoi* fajt a *P. acuminatus*, *P. megatympanum*, *P. luteolus*, és *P. wuchereri* (hegyes) és *P. melanomystax* (csapott). Függőleges orra profil nézetben elkülöníti a *P. amadoi* fajt a *P. acuminatus*, *P. brevisrostris*, *P. edelmoi*, *P. gyrinaethes*, *P. luteolus*, *P. megatympanum*, *P. tuberculosus*, és *P. wuchereri* (hegyes vagy előreálló). *Phyllodytes maculosus*, *P. kautskyi*, *P. melanomystax*, és *P. punctatus* fajoknak csapott orrcsúcsa van profil nézetben. A *Phyllodytes amadoi* két nagy elülső odontoiddal rendelkezik, hasonlóan a *P. acuminatus*, *P. maculosus*, *P. megatympanum*, *P. gyrinaethes*, *P. luteolus*, *P. tuberculosus*, és *P. wuchereri* fajokhoz, míg a *P. edelmoi*, *P. kautskyi*, és *P. punctatus* csak egy nagy odontoiddal, a *P. brevisrostris* és *P. melanomystax* fajoknak pedig nincs nagy méretű odontoidja. A hasi szemölcsözöttség elkülöníti a *P. amadoi* fajt a *P. melanomystax*, *P. kautskyi*, és *P. maculosus* fajoktól (hason egyenlő nagyságú lapos szemölcsök vannak).

Holotípus leírása. – A fej szélesebb, mint hosszú; az orrcsúcs rövid, felülről nézve lekerekített, kis apikális gumóval, profilban függőleges; az orrlyuk elülső állású az orrcsúcson; a canthus rostralis gyengén körülhatárolt; a loreális régió enyhén domború; a szemek anterolaterálisan irányulnak; a szem átmérője a fej hosszának 32,8 %-a; a szemek közötti rész lapos, a fej szélességének 30,6 %-a; a tympanum határozott, lekerekített, a tympanum átmérője 53 cm, a szem átmérőjének 2 %-a; a szupratympanikus (tympanum feletti) redő jól kifejezett, a tympanum felső szélét részben fedő; a hanghólyag torok alatti, gyengén fejlett; a hangrések rövidek, az állkapocs szögéhez közel; a nyelv nagy, lekerekített; a vomerine fogak egyenes vonalat alkotnak a choana (orrüregnek a garat felé nyílása) mögött; az állkapocs mindkét oldalán két nagy elülső odontoid, amelyet öt kisebbből álló sorozat követ; a pupilla vízszintes. Az alkarok kissé szélesebbek, mint a felkarok; az alkar külső felszíne mentén egy sor gumó; a kéz hossza a testhossz 43,7 %-a; az ujjak rövidek, hosszuk sorrendben I<IV<II<III; az ízület alatti (subarticular) gumók kicsik és kerekdedek; ujjak alatti (supernumerary) gumók hiányoznak; a tenyérgumó (palmar) jól fejlett és tojásdad, a hüvelykujj alsó gumója (thenar) nagy és elliptikus; a tapadókorongok jól fejlettek, majdnem kör alakúak; a harmadik ujj tapadókorongjának átmérője a szemátmérő 36,2 %-a; úszóhártya hiányzik; a hímek nagy hüvelykvánkost viselnek.

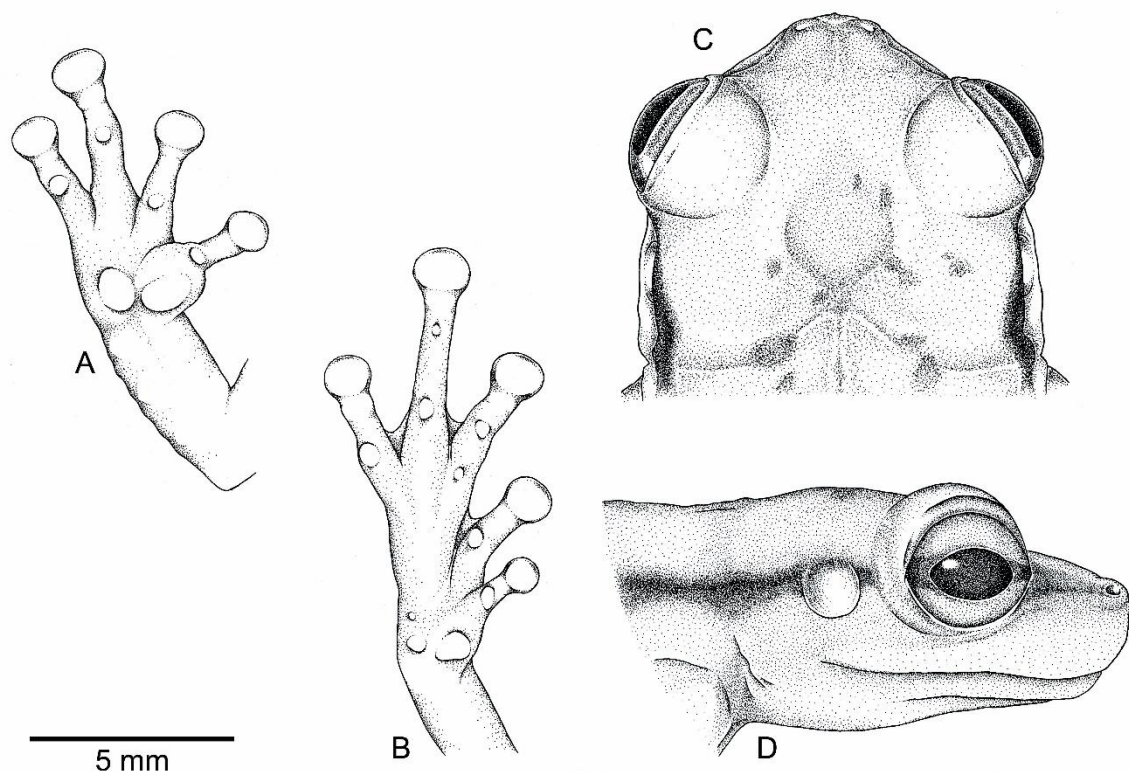
Hátsó végtagok karcsúak, a sípcsont kicsit hosszabb, mint a combcsont; a sípcsont és a combcsont hosszának összege a teljes testhossz 97,5 %-a; a lábszárcsont külső felszíne mentén egy sor gyengén fejlett gumó; nagy, tüskés gumó a sípcsont és a lábszárcsont ízületének közelében. Lábfejen kis, kerek ízület alatti gumók; belső lábközépcsonti (metatarsal) gumó nagy, tojásdad, spatula alakú; külső lábközépcsonti gumó kicsi, kerek; lábujjak karcsúak,

hosszuk sorrendben I<V<II<III<IV; lábujj tapadókorongok a mellső végtag tapadókorongjaihoz hasonló méretűek; úszóhártya hiányzik az I-II. lábujjak között; úszóhártya képlet I-II. 1 ½-3 III 3-3 IV 3-2 V (47. ábra).

A bőr a test és a végtagok dorzális felszínén, valamint a felkarok és a lábszár ventrális felszínén sima; a torok cápabőrhez hasonló felszínű; a hasán hat sor kerek gömbölyded szemölcs, amelyek közül a két középső sor kifejezettebb; a combok ventrális felszínén határozott kerek szemölcsök, amelyek közül egy pár a combcsont illeszkedése közelében kiemelkedőbb.

Alkoholban tartósítva a hát és a végtagok dorzális felülete krémszínű, apró, szabálytalan halványbarna foltokkal; a szem sarkától a lágyépig húzódó széles barna csík; a test, felkar és combok ventrális felülete krémszínű; a torok, a tenyér és a talp felszíne világosbarna.

Élő példányoknál a hát és a végtagok dorzális felszíne sárgás vagy zöldes, apró, szabálytalan barna foltokkal; a szem sarkától a lágyépig húzódó széles barna csík; a test, a felkarok és a combok ventrális felszíne krémszínű; a hasüreget fedő bőr színe fehér; a torok, a tenyér- és a talpfelület világosbarna (lásd a 48. ábrán látható paratípust).



47. ábra. *Phyllodytes amadoi* sp. nov., holotípus MZUESC 14954, mellső (A) és hátsó (B) végtag ventrális nézete; fej dorzális (C) és laterális (D) nézete. Rajz: Szőke Viktória (Magyar Természettudományi Múzeum).

Változatosság. – A típusorozaot 20 példányának morfometriai paramétereit a Vörös és mtsai. 2017, 1. táblázatban láthatóak. A hát színezete a világos (MNRJ 91484) és a sötét sárgás-zöldes (MZUESC 14952) árnyalatok között váltakozik, míg a háton látható szabálytalan barna foltok a kevés (MZUESC 14955) és a sok (MZUESC 14945) között váltakoznak. Az odontoidok száma és mérete többnyire megegyezik a holotípuséval, de találtunk néhány eltérő mintázatú példányt, például három-három vagy három-kettő megnagyobbodott odontoiddal az állkapocs mindkét oldalán. A fiatal egyedeknél a megnagyobbodott odontoidok hiányoztak, egy szubadult példánynál pedig csak egy-egy megnagyobbodott odontoid volt látható. Feltételezzük, hogy a *Phyllodytes amadoi* békák jellegzetes odontoid szerkezete kifejlett korukra alakul ki.

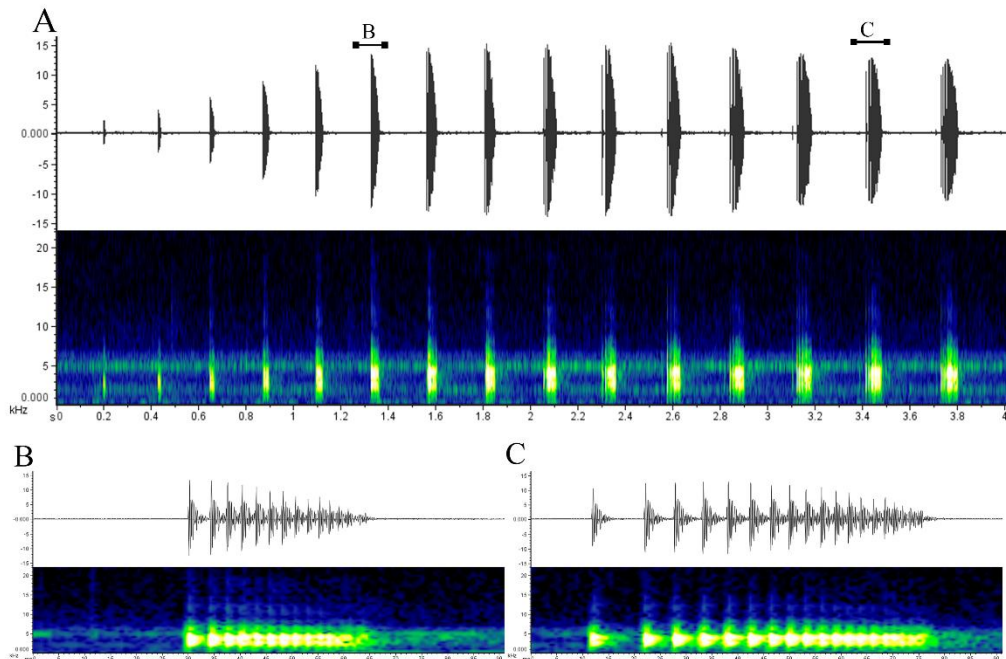
Etimológia. – Nevét Jorge Amadoról, brazília modernista írójáról kapta, aki a brazil irodalom meghatározó alakja volt. Amado abban a régióban élt és alkotott, ahol az új fajt megtaláltuk, és köztudottan rajongott a békákért, ezért jelentős gyűjteménye volt békákat ábrázoló tárgyakból. Bármerre utazott a világban, mindenhol hazavitt egy békát ábrázoló ajándéktárgyat, amelyek egy része az író egykori otthonában, Salvadorban, Brazília Bahia Államának fővárosában lettek kiállítva.

Természetrész. – A példányok mindig éjszaka kerültek szem elé, a hímek akkor hallatták hívóhangjukat vagy a talajon vagy a fatörzsön növény broméliákból 1.5–2.0 m magasan egy regenerálódó erdőfoltból a Rio Pimenta patak mentén. Ebben az erdőfoltban a faj gyakorinak tűnt a terepi bejárások során. A típuslelőhely az Araruna farmon található, ami 100 hektár nagyságú terület. Az 100 hektárból 40-et privat rezervátummá alakítottak. Az Una Biológiai Rezervátum, amely 18,000 hektáros területével a régió egyik legnagyobb természetvédelmi egysége, a típuslelőhely közelében fekszik, de ezidáig a most leírt új faj onnan nem került elő.



48. ábra. Photos of *Phyllodytes amadoi* sp. nov., paratípus MZUESC 14995 élő állapotban. Fotó: Mirco Solé.

Hívóhang. – Két példány (MZUESC 14954 holotype; SVL = 20 mm és MZUESC 14955, SVL = 20 mm) összesen 17 hívóhangját sikerült rögzíteni 2015 október 7-én, amikor a levegő hőmérséklete 22.6°C volt 19:30 perckor. A *Phyllodytes amadoi* hívóhangja 13–17 (14.5 ± 1; n = 17) kisebb hangelemből és azokat felépítő impulzusokból áll (49. ábra). A hívások hossza 2.99–4.106 mp között változik (3.41 ± 0.28; n = 17) és az állat 41–68 mp (53.4 ± 8.5; n = 15) intervallumokban bocsátja ki, 1.19 percenkénti hanggal. A hívást alkotó hangok 0.008–0.119 mp (0.043 ± 0.021; n = 247) hosszúak 3–21 (14.5 ± 4.3; n = 247) hangonkénti impulzussal és 0.137–0.285 (0.204 ± 0.02; n = 230) hangok közötti intervallumokkal. Az impulzusok ismétlődési rátája 368.37 ± 86.6 pulses/másodperc (151–625; n = 247). Az impulzusszám növekedhet hangonként, és az első hang mindig rövidebb ideig szól, mint az utolsó. A hívás második felében (5-7 utolsó hangok) az 1-4 kezdő impulzusok mindig kicsit távolabb vannak egymástól, mint a többi (Fig. 5C). A hívóhang domináns frekvenciája 3789.8–4306.6 Hz (3962 ± 192.6; n=17), míg a hangoké 2411.7–4306.6 Hz (3758.4 ± 405.7, n=247). A hangok domináns frekvenciája változhat, de a legalacsonyabb értékek (nagyjából 2411.7–2756.2 Hz) mindig az első három hangban szólnak meg.



49. ábra. A *Phyllodytes amadoi* sp. nov. (holotípus) hívóhangjának oszcillogramja és a hozzá tartozó spectrogram (A). Az első rövidebb hang (B) és a hosszabb utolsó hangok a kezdő impulzust elkülönítve a többtől (C). A felvétel 2015 október 7-én, 19 óra 30 perckor készült. A felvétel során a levegő hőmérséklete 22.6°C volt.

Bioakusztikai összehasonlítás más fajokkal. – A 12 leírt *Phyllodytes*-faj közül csak három faj esetében nem érhető el bioakusztikai elemzés (*Phyllodytes brevirostris*, *P. maculosus* és *P. punctatus*). A *P. amadoi* hívóhangja közelebb áll a *P. wuchereri* (Cruz és mtsai. 2014; Magalhães és mtsai. 2015), *P. tuberculosis* (Juncá és mtsai. 2012), *P. edelmoi* (Lima és mtsai. 2008), *P. gyrinaethes* (Roberto & Ávila 2013), és *P. luteolus* (Weygoldt 1981) fajokéhoz, mert mindegyikre jellemző, hogy impulzusokból felépülő hangok sorozatából áll. Különbözik viszont tőlük a magasabb domináns frekvenciában (3.789–4.306 Hz a *P. amadoi* vs 1.490–3.520 Hz a többi fajnál), kivétel a *P. luteolus* 2 - 6 kHz domináns frekvenciával (Weygoldt 1981). A hívás hossza (2.9–4.1 mp a *P. amadoi* esetében) rövidebb, mint a *P. tuberculosis*, *P. edelmoi* és *P. luteolus* (4.28–9.35 mp) és hosszabb, mint a *P. gyrinaethes* (1.3–2.3 mp) esetében. A *P. acuminatus* (Campos és mtsai. 2014), *P. kautskyi* (Simon & Gasparini, 2003), *P. megatympanum* (Marciano-Jr és mtsai. 2017) és *P. melanomystax* (Nunes és mtsai. 2007) hívóhangjai nem impulzusokból felépülő hangokból áll.

A *Phyllodytes amadoi* sp. nov. ebihalának leírása

Külső morfológia (egy ebihal, TD4, Gosner stádium 26, alapján, 50. ábra). – A test ovális felülről és oldalról (50A és C ábra) és kissé összenyomott oldalról (50B ábra). Az orr kerek felülről, oldalról és alulról nézve is. A BL a TL 38%-a. A szemek kicsit, felső elhelyezkedésűek és dorzolaterális állásúak. Az ED a BW 15.7%-a. Orrlyukak kicsik (ND/IND = 4.6%) és oválisak, anterolaterális nyílással, közelebb az orrhoz, mint a szemekhez (NSD>ESD). A rövid és balra kanyarodó légzőnyílás a test közepénél helyezkedik el, a test magasságának középvonala alatt. A légzőnyílás henger alakú, a nyílása kör alakú és dorzolaterális elhelyezkedésű. A kloákanyílás csövének nyílása jobbraálló (dextrális), kör alakú és a hátsó részének belső fala a hasi úszóhoz simul. A háti úszó ívelt és a test és farok határa előtt kezdődik. A hasi úszó alacsonyabb a háti úszónál és a test hátsó végénél kezdődik. A farokvég lekerekített. A farok izomzatának miotómái nem erősen bordázottak. A szájrész alsó állású, nem recézett, és egy sor marginális szemölcs szegényezi amelyek nem szabályosan helyezkednek el és dorzálisan hiányoznak (51D ábra). A marginális és szubmarginális szemölcsök kör alakúak és dorzálisan, a felső ajak fölött egy széles sávban hiányoznak.

Fogazottság képlete (LTRF – labial tooth row formula): 2(2)/2. A fogsorok hossza a következő képlettel írható le: $A1=A2>P1=P2$. Állkapocsburkok fogazottak és teljes mértékben keratinizáltak. A morfometriai méréseket a Vörös és mtsai. 2022, 1. táblázat mutatja.

Színezettség. – Az élő példányok szürkék, bőrük áttetsző, a fark izmozott részének két oldala szürkén pigmentált. Az úszók enyhén vagy nem pigmentáltak. A háti rész áttetsző, a szemek között egy szürke háromszög alakú minta látható. A hasi rész is áttetsző, jól látszanak a belek és két tapadómirigy a szájrész két szélén (51A, B, C ábra). Az alkoholban tartósított példányokon a fark izomrészének pigmentáltsága elhalványul és az egész testet borító apró, sötét pöttyök válnak láthatóvá (50A, B, C ábra).

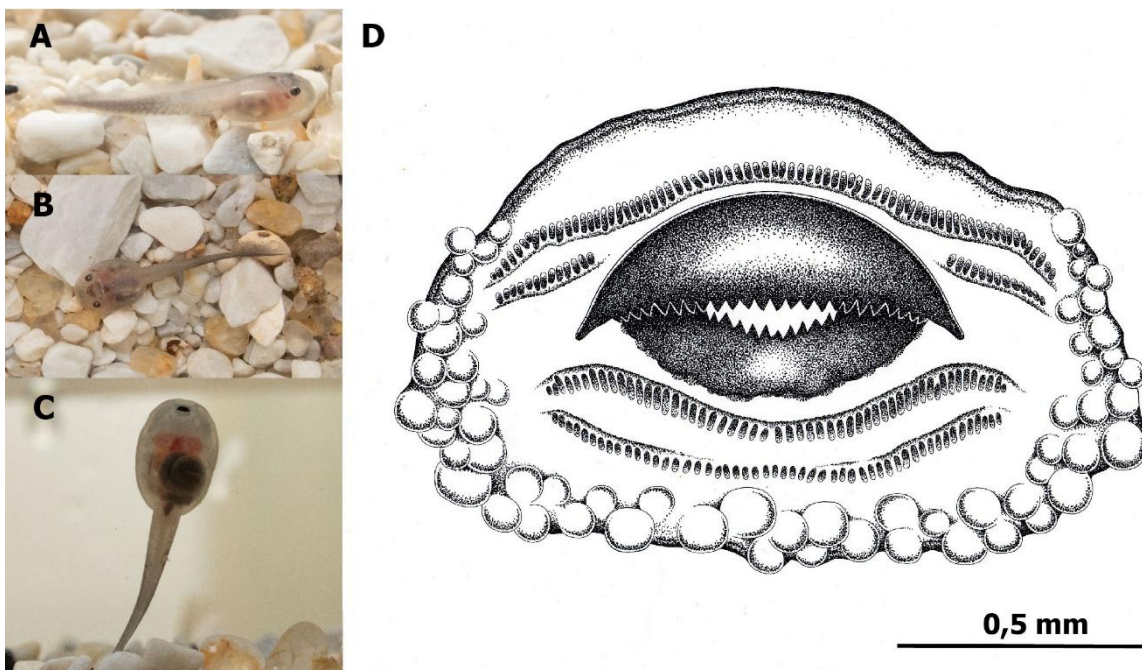
Változatosság. – A tapadómirigyek jól láthatóak a fiatalabb stádiumú alakoknál de eltűnik a 30. stádium környékén (TD6).

Természetráajz. – Az ebihalakat a közepes méretű teresztriális és kis méretű epifita, 1 – 1,5 m magasan lévő, magas fán növő broméliák tankjában találtuk meg egy regenerálódó erdőben a Rio Pimenta patak mentén. Az egyik ebihal emésztőrendszerében petéket találtunk.



50. ábra. A *Phyllodytes amadoi* (MZUESC 22076; Gosner stage 26) lárvája A) dorzális, B) laterális és C) ventrális nézetben.

Összehasonlítás más fajok ebihalaival. – Az ismert *Phyllodytes*-fajok ebihalai közül a *P. amadoi* ebihalának egyedül 2(2)/2 a fogazottság képlete. A farokhossz (TL) a *P. amadoi* esetében a legkisebb a *Phyllodytes*-fajok között, de az idősebb Gosner stádiumú példányoknak ez potenciálisan változhat. A *P. amadoi* testhossza (BL/TL) kisebb, mint a *P. edelmoi*, *P. gyrinaethes*, *P. magnus*, *P. melanomystax* és *P. praeceptor* fajoknál, és átfed a *P. brevirostris* és *P. wuchereri* fajokkal. A marginális szemölcsök (MP) egy sorban állása a *P. amadoi* fajt megkülönbözteti a *P. acuminatus*, *P. brevirostris*, *P. edelmoi* és *P. praeceptor* fajoktól. Mint a legtöbb fajnál, a *P. amadoi* testen nincsen szűkület, eltérően a *P. gyrinaethes*, *P. luteolus*, *P. melanomystax*, *P. praeceptor* és *P. tuberculosus* fajoktól. Az, hogy a háti és hasi úszók is a testen kezdődnek, a *P. magnus* kivételével az összes fajtól elkülönül a *P. amadoi*. A légzőnyílás pozíciója megkülönbözteti a *P. amadoi* fajt a *P. brevirostris*, *P. edelmoi* és *P. gyrinaethes* fajoktól, míg a szem felső állása a *P. edelmoi* és *P. melanomystax* fajoktól (dorsolaterális). Az eddig leírt *Phyllodytes*-fajok közötti főbb különbségeket a Vörös és mtsai. 2022, 1. táblázat mutatja.



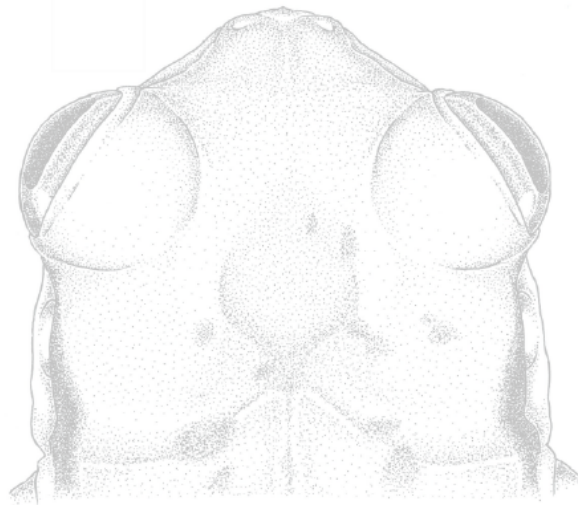
51. ábra. Élő ebihal (MZUESC 22078, at Gosner stage 30 – TD1) A) laterális, B) dorzális és C) ventrális nézetben; D) *Phyllodytes amadoi* tadpole szájképlete. Rajz: Szőke Viktória (Magyar Természettudományi Múzeum)

Diszkusszió

A *Phyllodytes* egyike az atlanti esőerdőben endemikus békanemzetségeknek, ahol az utóbbi időben egyre több új fajt fedeztek fel; a tizenkét fajból hatot (50 %) az elmúlt 15 évben írtak le. A leírások morfológiai jegyeken és bioakusztikai összehasonlításokon alapulnak, mivel a nemzetség átfogó molekuláris rendszertani vizsgálatát csak nemrégiben végezték el (Blotto és mtsai. 2020). Számos törekvés irányult arra, hogy a *Phyllodytes*-fajokat a háti mintázat (Caramaschi és mtsai. 2004, Peixoto és mtsai. 2003), a hívóhangok szerkezete (Roberto & Ávila 2013), vagy az ebihalak vázrendszerének morfológiája alapján (Da Mota és mtsai. 2020) specifikus csoportokba sorolják. Blotto és munkatársai (2020) 11 mitokondriális és nukleáris génfragmentet használtak, hogy rekonstruálják a Lophyohylini tribusz tagjainak filogenetikai kapcsolatát, amelybe a *Phyllodytes* nemzetség is tartozik. Eredményeik azt mutatják, hogy egyik korábban felmerült csoport sem monofiletikus. Találtak viszont egyértelmű földrajzi mintázatot, és az elterjedés északi részén élő fajok (Brazília Pernambuco, Alagoas és Sergipe Államai) (kivételek a *P. megatympanum* Dél-Bahiából) egy klaszterbe, míg az atlanti esőerdő területén élő fajok Brazília partmenti területén (Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo) egy másik klaszterbe rendeződtek – ide tartozik a *P. amadoi* is.

A *P. amadoi* leírásunk a kifejlett példányok és az ebihalak morfológiájában és a hívóhang szerkezetben mutatkozó éles különbségekre támaszkodik a már ismert fajokhoz képest. A kis testméret (a nemzetségen belül a legkisebb faj) és a hívóhang magas domináns frekvenciája miatt a faj könnyen megkülönböztethető a többi *Phyllodytes*-fajtól. A nemzetségen belüli fajszaám várhatóan tovább bővül majd a monitoring programok, a környezeti hatástanulmányok és esetleg molekuláris filogenetikai vizsgálatok révén (Dias és mtsai. 2014b).

A *Phyllodytes amadoi* csak egyetlen lelőhelyről ismert, de előfordulása valószínűleg elterjedtebb. A típuslelőhely egy magánrezervátum része, és valószínűleg nem fenyegeti közvetlen erdőirtás. A legtöbb *Phyllodytes*-faj - a *P. luteolus* kivételével, amely Pernambuco államtól Espírito Santo Állam déli részéig terjedő területen fordul elő - viszonylag szűk elterjedési területről ismert, vagy adathiányos (Amphibiaweb 2025). Ezért fokozott hatással lehetnek rájuk a kételtűek eltűnését okozó tényezők, köztük az élőhelyvesztés (Eterovick és mtsai. 2005), az élőhelyek fragmentálódása (Dixo és mtsai. 2009), fertőző betegségek, például a kitridgomba (*Batrachochytrium dendrobatidis*) (Carnaval és mtsai. 2006, James és mtsai. 2015, Rodriguez és mtsai. 2014), természeti katasztrófák (Papp & Papp 2000) vagy a növényvédő szerek használata (Egea-Serrano & Solé 2017). A *Phyllodytes*-fajok kriptikus diverzitását mihamarabb fel kell térképezni, mielőtt vizsgálati alanyaink eltűnnek.



5.2. Négy új *Pristimantis*-faj leírása Ecuadorból

Ecuador a világ egyik olyan országa, ahol kiemelkedően gazdag a biológiai sokféleség (Bass és mtsai. 2010, Ulloa és mtsai. 2017), legmagasabb a kétéltűek fajsűrűsége (egy területegységre jutó fajok száma) (Ron és mtsai. 2019) és figyelemre méltó az endemikus fajok száma (Ortega-Andrade és mtsai. 2021). Kis mérete ellenére Ecuador számos olyan ökoszisztémát rejt a trópusi Andok régiójában, amelyeket a kétéltűdiverzitás forró pontjaiként ismerünk (Ron és mtsai. 2019). Változatosságuk még messze nem teljesen feltárt, folyamatosan kerülnek elő új fajok a térségből amit az elmúlt években publikált tanulmányok bizonyítanak (Brito és mtsai. 2017, Franco-Mena és mtsai. 2023, Reyes-Puig és mtsai. 2019, 2024, Sánchez-Nivicela és mtsai. 2021, Székely és mtsai. 2020).

A neotropikus elterjedésű, közvetlen fejlődésű *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870 (Amphibia: Anura: Strabomantidae) 617 leírt fajjal a legnépesebb nemzetség a gerincesek között (Frost 2025). A *Pristimantis*-nemzetségbe tartozó békák Közép- és Dél-Amerikában elterjedtek, a legtöbb fajjal azonban az Andokban, Kolumbiában, Ecuadorban és Peruban találkozhatunk (Kieswetter & Schneider 2013).

A *Pristimantis*-nemzetség taxonómiája összetett és sok esetben bizonytalan, mivel a korai vizsgálatok szinte kizárólag külső morfológiai jegyeken alapultak (pl. Duellman és Lehr 2009, Lynch & Duellman 1997, 1980), ami gyakran nem volt elegendő a fajhatárok és a filogenetikai kapcsolatok megállapításához. A közelmúltban végzett vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a *Pristimantis* fajgazdagságát alulbecsülik a morfológiailag kriptikus fajok létezése miatt (pl. Elmer & Cannatella 2009, Hutter & Guayasamin 2015, Ortega és mtsai. 2015, Padial & de la Riva 2009). Az elmúlt két évtizedben az integratív taxonómiai megközelítés - DNS-szekvenciák felhasználása a morfológiai és viselkedési adatokkal kombinálva - lehetővé tette a fajok objektív elhatárolását (Bickford és mtsai. 2007, Padial és mtsai. 2010, Will és mtsai. 2005). Ezt a megközelítést egyre gyakrabban alkalmazzák a neotrópusi kétéltűekre is, ami nagyszámú kriptikus faj leírását eredményezte (pl. Caminer & Ron 2014, Elmer és Cannatella 2009, Fouquet és mtsai. 2007, Funk és mtsai. 2012, Ortega és mtsai. 2015, Ron és mtsai. 2006, Vieites és mtsai. 2009).

A folyamatos fajleírásokkal már a '70-es években felmerült az igény, hogy a nemzetségbe tartozó fajokat valamilyen módon rendszerezék és kategorizálják. John D. Lynch (1976) számos fajcsoportot javasolt az akkor még csak Dél-Amerikából ismert fajokra (akkor még *Eleutherodactylus* néven), és megpróbálta a fajcsoportok elrendezését a teljes nemzetségre vonatkozóan megszervezni. Két ilyen javasolt csoport a *Pristimantis phoxocephalus* (Páez & Ron 2019) és a *Pristimantis orestes* (Lynch & Duellman 1997) fajcsoportok. Két tanulmányunkban összesen négy új *Pristimantis*-faj leírását mutattuk be. A *Pristimantis lojanus* fajt Loja városból, a *Pristimantis sagedunneae*, *P. paladines* és *P. numbala* fajokat pedig a Podocarpus Nemzeti Park nyugati határáról írtuk le.

5.2.1. A *Pristimantis phoxocephalus* fajcsoport egy új faja Loja városából

Loja város, Loja tartomány fővárosa, Dél-Ecuador egyik legnagyobb városa (több mint 250 000 lakossal), amelynek közelében két nagy biodiverzitású terület található: Podocarpus Nemzeti Park és Abra de Zamora (Sánchez-Nivicela és mtsai. 2021, Székely és mtsai. 2020, Yánez-Muñoz és mtsai. 2019). A városból és a környékéről leírt kétéltűfajok története igen szövevényes. 1932-ben Hampton Wildman Parker (1932) brit zoológus leírta az *Eleutherodactylus carrion* békafajt, amelynek példányait Clodoveo Carrión Mora ecuadori természettudós gyűjtötte a városból. John D. Lynch (1969) azonban szinonimizálta az *Eleutherodactylus lymanival* (jelenleg *Pristimantis lymani*) (Barbour & Noble 1920). Parker ugyanebben az 1932-es tanulmányában a Carrión által a városból gyűjtött példányok alapján leírta az erszényes békák új alfaját, a *Gastrotheca marsupiata lojana*-t, amelyet viszont William E. Duellman 1974-ben *Gastrotheca lojana* néven emelt faji rangra. Érdekességként ugyanez a Parker 1934-ben és 1938-ban írt a Carrión által Loja városából gyűjtött *Atelopus ignescens* példányairól, bár ezeknek a példányoknak az azonosságát még nem sikerült megállapítani,

mivel ennek a kritikusan veszélyeztetett fajnak a valószínűsíthető elterjedési területe Észak-Ecuadorra korlátozódik (Coloma & Quiguango-Ubillús 2012).

1971-ben Edwards leírt egy nyílméregbeka-fajt, a Loja-rakétabékát (*Colostethus elachyhistus*, jelenleg *Hyloxalus elachyhistus*), Lynch által 1968-ban gyűjtött példányokkal, 2003-ban pedig Pramuk és Kadivar leírt egy új varangyfajt, a *Bufo amabilis*-t (jelenleg *Rhinella amabilis* ami valószínűleg ugyanaz a faj, amelyet Parker 1934-ben *Bufo spinulosus* néven említett), Lynch által 1968-ban Loja-ban gyűjtött példányokkal. Carvajal-Endara és társai pedig 2019-ben leírtak egy másik erszényes békafajt, a *Gastrotheca elicioi*-t a városból és környékéről.

Lynch 1979-ben írta le a *Pristimantis phoxocephalus*-t (Pilalóból, Cotopaxi tartományból), a vizsgált példányok közé sorolva a Lojából gyűjtött példányokat is. Ezt a fajt sokáig egyetlen, igen változatos fajnak tartották (pl. Duellmann & Lehr 2009, Lynch & Duellmann 1997), amelynek elterjedési területe Perutól Észak- és Nyugat-Ecuadorig terjed. Páez & Ron azonban 2019-ben kimutatta, hogy számos populáció valójában különböző, leíratlan fajokat képvisel. Integratív taxonómiai megközelítéssel, molekuláris, morfológiai és bioakusztikai adatok felhasználásával jelen tanulmányunkban leírjuk a *P. phoxocephalus* csoport (sensu Páez & Ron 2019) egy új fajtát Loja városából.

Módszerek

Mintagyűjtés

A terepmunkát 2012 októbere és 2021 májusa között végeztük Loja városában és környékén (Loja tartomány, Dél-Ecuador; 4.0007° S, 79.2045° W, WGS84; 2070 m tengerszint feletti magasság) és több szomszédos területen: San Lucas és környéke (kb. 35 km-re északra; 3.7101° S, 79.2545° W, 2748 m), Bosque Servio Aguirre Villamagua (kb. 20 km-re északra; 3.8147° S, 79.2948° W, 2800 m), Cerro Sacama (kb. 7 km-re északra; 3.8992° S, 79.2577° W, 2583 m), Abra de Zamora (kb. 8 km-re keletre; 3.8992° S, 79.2577° W, 2583 m), Abra de Zamora (kb. 8 km-re keletre; 3.8992° S, 79.2577° W, 2583 m), 9873° S, 79.1518° W, 2406 m), Cajanuma, a Podocarpus Nemzeti Park bejáratához vezető úton (kb. 8 km-re délre; 4.1123° S, 79.1820° W, 2660 m), Cristal (kb. 10 km-re délre; 4.1248° S, 79.1928° W, 2043 m) és San Antonio de Paycapamba (kb. 12 km-re délre; 4.1348° S, 79.2484° W, 2675 m). A mintázott területen intenzív vizuális és akusztikus felméréseket végeztünk mind nappal, mind éjszaka (12.00-02.00 óra). A begyűjtött példányokat élve lefényképeztük, majd 20%-os benzokainnal elaltattuk, 10%-os formalinban rögzítettük és 70%-os etanolban tartósítottuk őket. A genetikai elemzésekhez szükséges szövetmintákat pedig 96%-os etanolba helyeztük (Székely és mtsai. 2020). A vizsgált példányokat (a típus-sorozatban és a Székely és mtsai. 2021. S1 függelékben felsoroltak) a Universidad Técnica Particular de Loja egyetem Zoológiai Múzeumában (Loja, Ecuador (MUTPL)) helyeztük el.

Morfológia

A morfológiai jellemzők leírása és a leírás formátuma során nagyrészt Duellman & Lehr (2009) munkáját követtük. A nemet a hangrések, a hüvelykvánkosok és/vagy a gonádok vizsgálata alapján határoztuk meg. Az élő példányok színét terepi feljegyzések és digitális fényképek alapján írtuk le. A példányokat az eutanázia előtt egy My Weigh Triton T3 hordozható mérleggel, 0,01 g pontossággal megmértük (testtömeg: BM). A méréseket sztereomikroszkóp alatt, Vernier-tolómérővel végeztük, és a legközelebbi 0,1 mm-re kerekítettük. A következő morfometriai méréseket végeztük: testhossz (SVL), fejszélesség (HW), fejhossz (HL), szemek közötti távolság (IOD), orrlyukak közötti távolság (IND), felső szemhéj szélessége (EW), szemátmérő (ED), szem-orrlyuk távolság (EN) tympanum átmérője (TD), combcsont hossza (FL), sípcsont hossza (TL), lábfej hossza (FoL), a belső lábközépcsont gumójának proximális szélétől a IV. lábujj hegyéig terjedő távolság; kézfej hossza (HaL) (Székely és mtsai. 2020). A méréseket átlag \pm SD-ben adtuk meg.

DNS-kivonás, amplifikáció és szekvenálás

A DNS kivonását 96%-os etanolban tartósított májszövetből végeztük az Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) segítségével, majd a PCR-reakciókat a gyártó protokollja szerint futtattuk (Székely és mtsai. 2020). A genomi DNS kivonása, az amplifikáció és a szekvenálás a Székely és mtsai. (2020) által leírtak szerint történt. Az újonnan előállított DNS-szekvenciákat (12S, 16S és RAG-1) az NCBI GenBankban helyeztük el (Székely és mtsai. 2021. S1 táblázat).

DNS-szekvencia-elemzések

A molekuláris adatokat két mitokondriális gén (12S és 16S rRNS) és egy nukleáris gén (RAG-1 - rekombinációt aktiváló gén 1) szekvenciáinak felhasználásával elemeztük 30 faj 52 egyedéből Ecuadorból (Székely és mtsai. 2021, S1 táblázat) származó mintán, amelyek a *Pristimantis* nemzetség Huicundomantis alnemzetség összes jelenleg ismert faját képviselték (Páez & Ron 2019). Elemzéseinkben a Huicundomantisok GenBankban elérhető szekvenciáit (Páez & Ron 2019, Székely és mtsai. 2020), valamint a jelenlegi tanulmányban leírt 15 új szekvenciát (3 fajból) használtuk fel (Székely és mtsai. 2021, S1 táblázat). Kulcsoportként a *Pristimantis unistrigatus*, *P. ceuthospilus*, *P. imitatrix*, *P. diadematus*, *P. rhodoplichus*, *P. melanogaster*, *P. wiensi*, *P. simonsii*, *P. orestes*, *P. colodactylus* és *P. orcesi* fajokat használtuk. A filogenetikai fák a *P. galdi* fajjal gyökerezettük.

A szekvenciákat a Geneious Prime (Biomatters Ltd.) programmal szerkesztettük és illesztettük (MAFFT algoritmus (Katoh & Standley 2013)). A 12S, 16S és RAG-1 szekvenciák szerkesztett illesztéseit kézzel ellenőriztük és egyetlen mátrixba fűztük össze, amelyet aztán a filogenetikai elemzésekhez használtunk (Székely és mtsai. 2020). A filogenetikai elemzések egy 2339 bp hosszú adathalmazon (909 bp 12S, 878 bp 16S és 612 bp RAG-1) alapultak. Az összehangolt mátrix elérhető a <https://doi.org/10.5281/zenodo.5500445> oldalon.

A molekuláris filogenetikai kapcsolatokat Maximum Likelihood (ML) és Bayes-féle (BI) elemzésekkel térképeztük fel (részleteket lásd Székely és mtsai. 2021, 4. oldal).

Hívóhangok elemzése

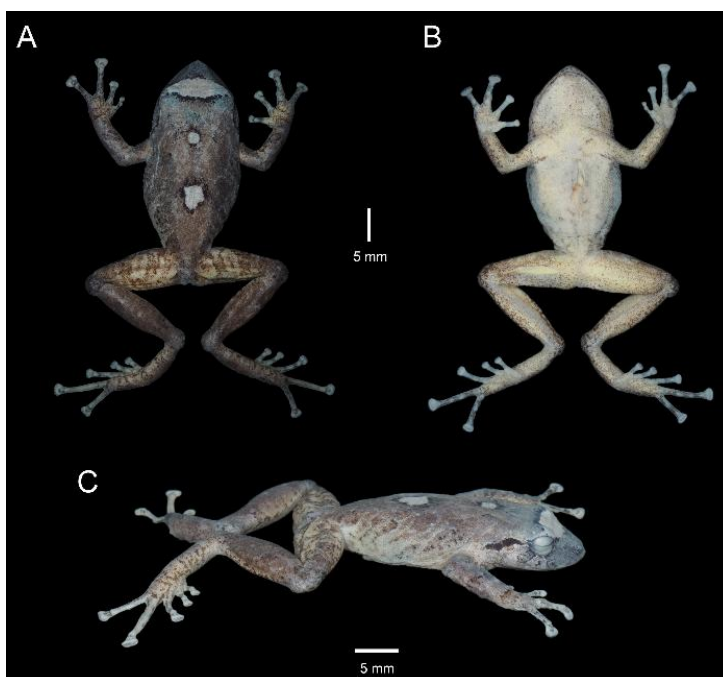
A fajra jellemző hívóhangokat egy Olympus LS-11 lineáris PCM felvevővel rögzítettük a terepen, egy Tascam DR-100 MKIII felvevővel és egy RØDE NTG2 kondenzátoros puskamikrofonnal 44,1 kHz mintavételi frekvencián és 16 bites felbontásban, WAV fájlformátumban. A levegő hőmérsékletét és páratartalmát adatgyűjtővel (Lascar Electronics, EL-USB-2-LCD modell, pontosság: $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; $\pm 5\%$) mértük. Az összes elemzett hívóhangfelvételt eredeti formában, teljes hosszában a Fonoteca UTPL-ben helyeztük el (a felvételek azonosítóit a Székely és mtsai. 2021, S3 táblázat tartalmazza). Az akusztikai elemzést a Raven Pro 1.6 (Center for Conservation Bioacoustics 2019) programmal végeztük. Az időbeli paramétereket az oszcillogramokból, a spektrális paramétereket pedig a Hanning-ablak függvényvel, DFT: 512 minta, 3 dB szűrőszélesség: 124 Hz és 50%-os átfedés (Székely és mtsai. 2020) segítségével kapott spektrogramokból mértük.

A hívásparáméterek mérésének terminológiája és eljárásai a Cocroft & Ryan 1995, Toledo és mtsai. 2015 és Koehler és mtsai. 2017 tanulmányokat követték, megkülönböztetve a hívást és a hangot (sensu Koehler és mtsai. 2017). A következő időbeli és spektrális paramétereket mértük és elemeztük: (1) hívás hossza: a hívás kezdetétől a hívás végéig tartó idő; (2) hívások közötti idő: két egymást követő hívás közötti idő, az egyik hívás végétől a következő hívás kezdetéig mérve; (3) hívásszám: a hívások száma percenként, az első hívás kezdete és az utolsó hívás kezdete között mért idő; (4) hang időtartama: egy hang időtartama egy híváson belül, a hang kezdetétől a hang végéig mérve; (5) hangok közötti idő: két egymást követő hang közötti idő ugyanazon a híváson belül, az egyik hang végétől az azt követő hang kezdetéig mérve; (6) hangfrekvencia: a hangok száma másodpercenként, az első hang kezdete és az utolsó hang kezdete közötti időtartam; (7) domináns frekvencia: a legnagyobb hangenergiát tartalmazó frekvencia, a teljes hívás alatt mérve; és (8) a 90%-os sáv szélesség, ami az 5%-os és 95%-os

Pristimantis lojanus sp. nov. Székely, Székely, Ordóñez-Delgado,
Armijos-Ojeda és Vörös



53. ábra. A *Pristimantis lojanus* sp. nov. (MUTPL 178, adult nőstény) holotípusa, SVL 35.2 mm, élő példány. A. Dorsolaterális nézet; B. Ventrális nézet; C. Dorsális nézet.



54. ábra. A *Pristimantis lojanus* sp. nov. holotípusa. (MUTPL 178, adult nőstény) preparált példány. A. Dorzális nézet; B. Ventrális nézet; C. Oldalsó nézet

Holotípus. – MUTPL 178 (53., 54. ábrák és Székely és mtsai. 2021, 5A ábra), adult nőtény Ecuadorból, Loja Provincia, Loja város, Quebrada El Carmen (4.0432° S, 79.1728° W; WGS84), 2268 m tengerszint feletti magasság, gyűjtő: Paul Székely 2016 július 14-én. Paratípus leírását lásd Székely és mtsai. 2021. 7-9 oldal.

Diagnózis. – Filogenetikai bizonyítékok és általános morfológiai jegyek alapján az új fajt a *Pristimantis* nemzetségbe soroltuk. A *Pristimantis lojanus* egy közepes méretű faj a következő jellegzetességekkel: (1) a hát bőrét enyhén kiálló szemölcsök borítják, néhány jobban kiálló szemölccsel tarkítva (élő példányon a bőr szemölcsözött struktúrája jobban észrevehető), a bőr a hasoldalon durván márványozott vagy márványozott; a korong alakú redő gyenge; dorsolaterális redők hiányoznak, alsó dorzális redő jelen van; (2) a tympanum gyűrűje kiemelkedő és a hártája differenciált, hossza a szem hosszának kb. 45%-a; szupratympanikus redő jelen van, amely eltakarja a tympanum felső és hátsó szélét; (3) orrcsúcs előreálló, felülről nézve függőlegesen kiugró ornyereggel, profilból nézve kerek vagy kevésbé előreálló, canthus rostralis (szem és orr közötti szög) felülről nézve enyhén homorú, profilban lekerekített; (4) a felső szemhéjat több apró szemölcs borítja, amelyek mérete és alakja hasonló a háton lévőkéhez, kb. az IOD 80%-a nőtényeknél és 90%-a a hímeknél; a fejtetőn lévő „tarajok” hiányoznak; (5) a vomerin fogak nyúlványai kiemelkedőek, ferdek, tojásdad vagy háromszög alakúak, medialisan a nyúlványok szélességénél kisebb távolságra állva egymástól, mindegyik nyúlványon 4-7 fog található; (6) a hímek hanghólyagja a torokrészen van, a hangrések kerekdedek; hüvelykvánkost viselnek; (7) az I. ujj rövidebb, mint a II. ujj; az ujjakon lévő tapadókorongok szélesek; (8) a korongok oldala rojtzott (ez élő példányokon jobban megfigyelhető); ízület alatti (subarticular) gumók kiemelkedőek; ujjak alatti (supernumerary) gumók jelen vannak; a tenyergumó (palmar) általában egy nagyobb (belső) és egy kisebb (külső) gumóra oszlik; hüvelykujj alsó gumó (thenar) ellipszis alakú, nagyobb, mint a belső tenyergumó; (9) ulnaris gumók jelen vannak; (10) sarok több apró, lekerekített gumóval; a lábtő külső széle egy sok kisebb gumóval; belső tarsalis redő jelen van; (11) belső lábközépcsont gumója nagyjából tojásdad, nagyjából 4x vagy 5x akkora, mint a lábközépcsontgumó; ujjak alatti talpgumók jelen vannak (12) lábujjak széles oldalsó szegéllyel rendelkeznek (élő példányon jobban látható); úszóhártya bazális; az V. lábujj jóval hosszabb, mint a III. lábujj; a lábujjakon lévő korongok szélesek, nagyjából ugyanolyan méretűek, mint az ujjakon; körkörös barázdák jelen vannak; (13) élő példányokon a hát és az oldalak alapszíne a barnától a vörösesbarna különböző árnyalatáig változik, fehér foltokkal vagy foltok nélkül, fehér szemek közötti sávokkal vagy anélkül; hasoldal krémszínű, fehéres vagy sárgás, sötét színű foltokkal vagy anélkül; szivárványhártya bronzszínű vékony fekete hálózattal és egy középső, vízszintes, jól látható csíkkal; (14) testhossz 28,5-44,3 mm az adult nőtényeknél ($34,6 \pm 5,39$ SD, $n = 10$) és 26,2-30,4 mm az adult hímeknél ($28,1 \pm 1,43$ SD, $n = 6$).

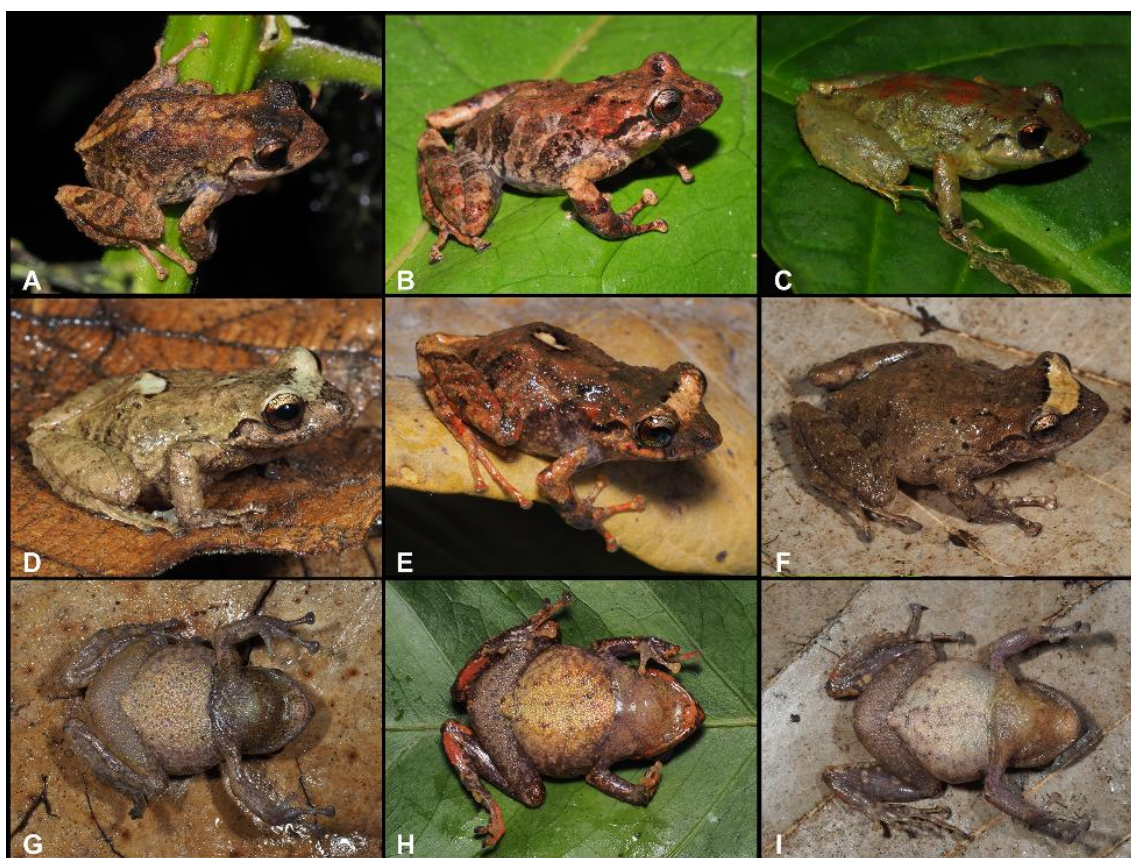
Összehasonlítás más fajokkal: lásd Székely és mtsai. 2021. 13-14. oldal

Holotípus leírása: lásd Székely és mtsai. 2021 14-15. oldal.

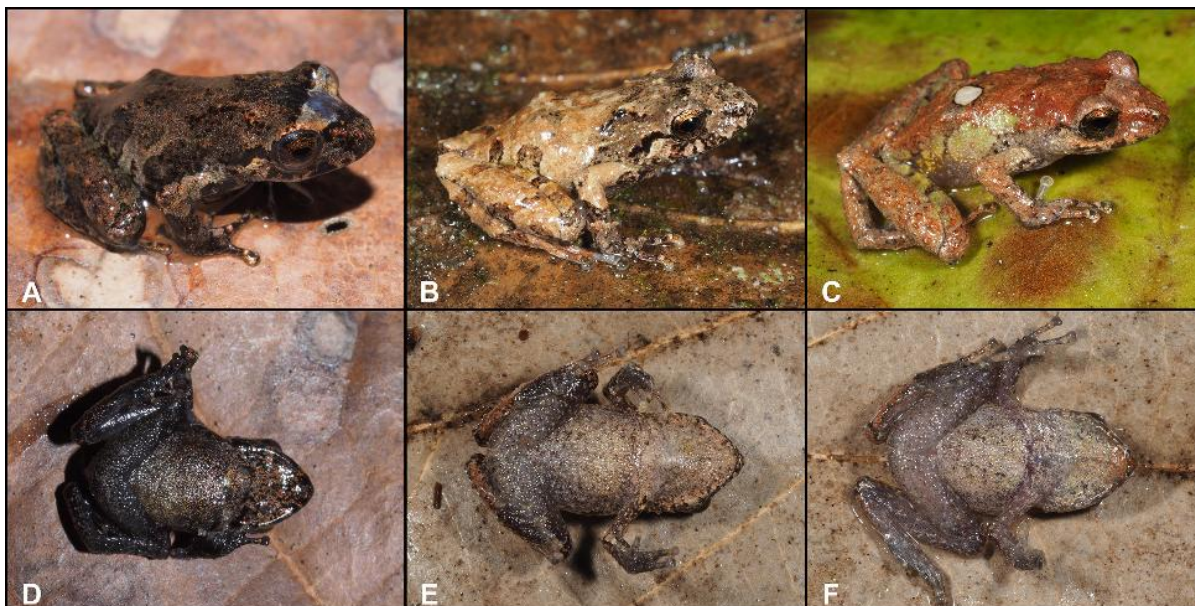
Változatosság. – A morfometriai változatosságot a Székely és mtsai. 2021. 1. táblázat foglalja össze. A faj egyértelmű ivari dimorfizmust mutat. A nőtények jóval nagyobbak, mint a hímek (Székely és mtsai. 2021, 7. ábra). Mind a hímek, mind a nőtények igen változatosak a háti színezet tekintetében, a barna vagy a pirosasbarna különböző árnyalatait mutatva, fehér foltokkal vagy anélkül, szemek közötti fehér sávokkal vagy anélkül (55. és 56. ábrák). A szupratympanikus redő minden egyednél fekete.



55. ábra. Változatosság a *Pristimantis lojanus* sp. nov. nőstény egyedeinél



56. ábra. Változatosság a *Pristimantis lojanus* sp. nov. hím egyedeinél



57. ábra. Változatosság a *Pristimantis lojanus* sp. nov. juvenilis egyedeinél

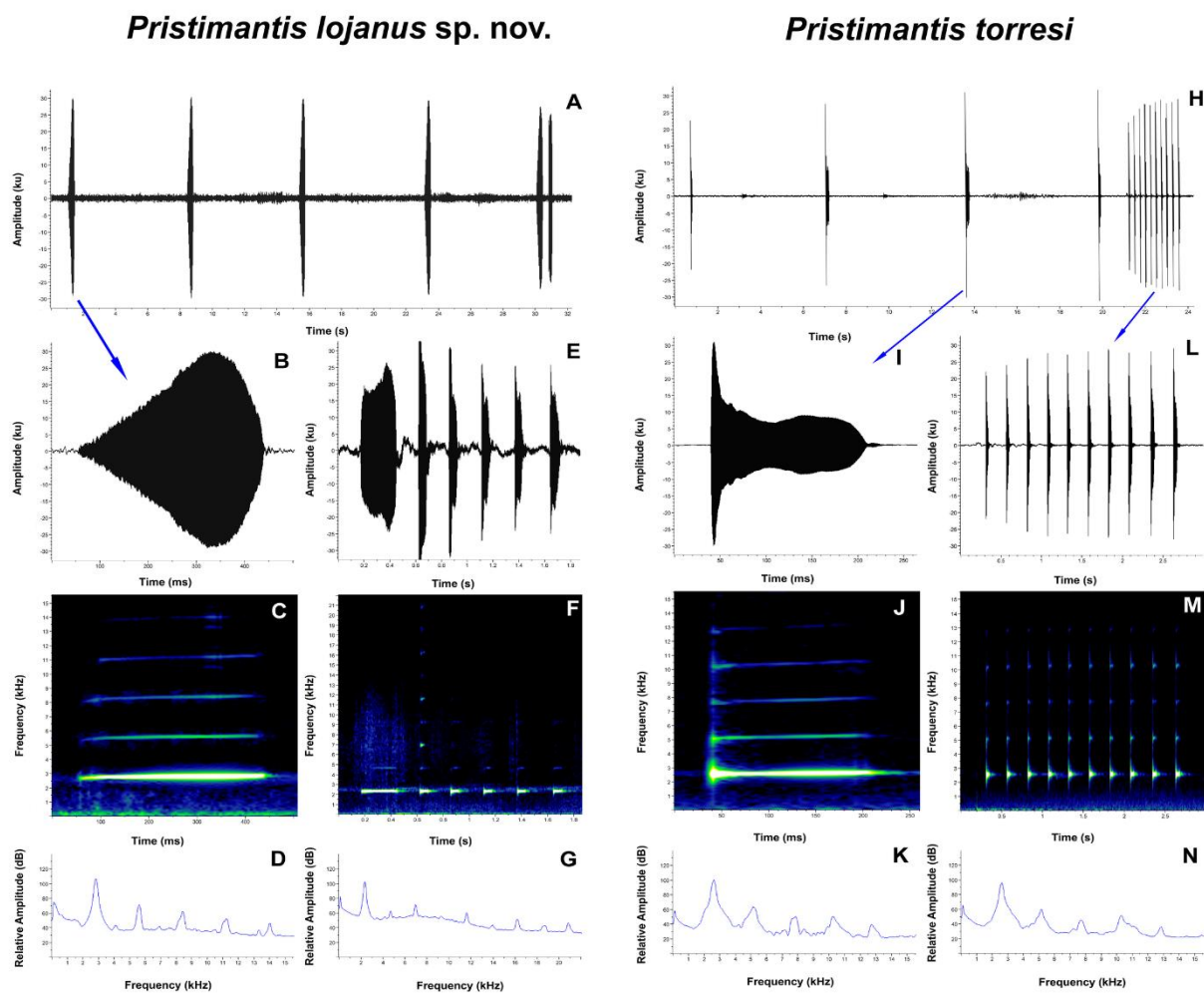
Hívóhang. – A *P. lojanus* hívóhangjának jellemzéséhez 7 felvételt elemeztünk, ebből 2 Loja városában a Parque Universitario de Educación Ambiental y Recreación “Francisco Vivar Castro” (2015 és 2016), egy Abra de Zamora (2018), egy Cerro Sacama (2020), és három Loja város, Cerro Chiriaco (2021) régiójában lett felvéve. Az akusztikus változók leíró statisztikáját lásd Székely és mtsai. 2021, 2. és 3. táblázatokban. A *Pristimantis lojanus* hívóhangja egy sor füttyre emlékeztető hangból áll, amely kicsit hasonlít a *P. balionotus*, *P. jimenezi*, vagy *P. verrucolatus* (58A–58G ábra) fajok hívóhangjához. A hívások egy vagy két hangból állnak, melyeknek átlagos hossza 0.367 mp, az hangok közötti időszávok átlagos hossza 7.007 mp és a gyakoriságuk 7.80 hang/perc (Székely és mtsai. 2021. - 2. táblázat). A két hangból álló hívások esetében (58A ábra) a hangok átlagos hossza 0.797–1.460 mp (0.937 ± 0.192 , $n = 10$), az első hang hosszabb, mint a második: 0.347–0.417 mp (0.370 ± 0.021 , $n = 10$) vs. 0.136–0.225 mp (0.176 ± 0.028 , $n = 10$). Az átlagos domináns frekvencia 2598.0 Hz, 2506.3–2674.3 Hz közötti átlagos sávszélességgel (Székely és mtsai. 2021, 2. táblázat). Hasonlóan más, a *P. phoxocephalus* fajcsoportba tartozó fajokhoz (Székely és mtsai. 2020) a hímek néha speciális, sok, akár 6 hangból álló hívást is hallatnak (58E és G ábrák). Ezeknek a hangoknak más céljuk lehet, mint a tipikus párkereső hívóhangoknak, például társas kapcsolatokban lehet jelzés, vagy esetleg nőstények vagy rivális hímek jelenléte válthatja ki.

Elterjedés. – A *Pristimantis lojanus* Loja városából és környékéről ismert (a városba befolyó patakokban de a magán (Reserva Madrigal del Podocarpus) vagy állami védettséggű (Parque Universitario de Educación „Francisco Vivar Castro”) parkokban és nemzeti parkokban is előfordul) (59. ábra). DNS vagy hívóhang segítségével meghatározott egyedek alapján adatokkal rendelkezünk továbbá San Lucasból és környékéről, Bosque Servio Aguirre Villamagua, Cerro Sacama, Abra de Zamora, Cajanuma, Cristal és San Antonio de Paycapamba településekről. A faj 1937 (Cristal) és 2782 (Bosque Servio Aguirre Villamagua) tengerszint feletti magasság közötti tartományban él, a trópusi hegyi erdő ökoszisztéma alsó és felső régióját is érintve (Homeier és mtsai. 2008).

Természetráajz. – A *Pristimantis lojanus* gyakori fajnak számít (megfelelő élőhelyeken az egyedeket nagy számban láttuk vagy hallottunk a terepi mintavételi alkalmak 50–100%-ában). A legtöbb példányt sötétedés után észleltük a növényzetben ülve (bokrokon, faágakon vagy füves vegetációban) 10 cm – 2-3 m magasságig. Az egyedeket legtöbbször kisebb patakok környékén láttuk. Éneklő hímek egész évben megfigyelhetőek voltak, de leggyakrabban esős éjszakákon. Minden példány másodlagos, valamilyen fokú emberi hatás által érintett erdőben fordult elő.

Csak olyan patakszakaszokon észleltük a fajt, ahol megfelelő erdőborítás volt, és nem láttunk békákat ott, ahol a természetes vegetáció hiányzott.

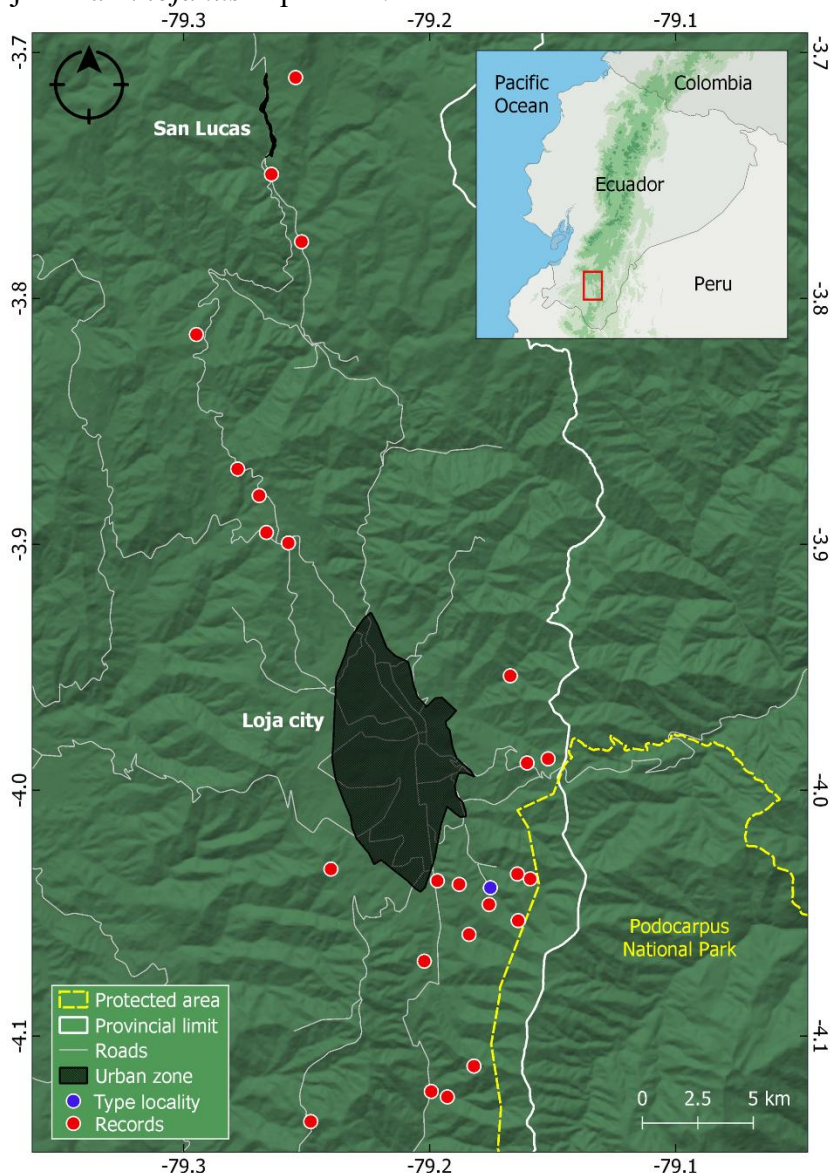
Természetvédelmi státusz. – A *Pristimantis lojanus* mindössze 25 lelőhelyről ismert, összesen nagyjából egy 400 km² területről. Jóllehet a számára megfelelő élőhelyeken gyakori, javasoljuk a fajt a B1ab(iii,iv) + 2ab(iii,iv) IUCN kritériumok alapján veszélyeztetett (endangered) kategóriába sorolni (IUCN 2001), mivel (1) elterjedési területe (Extent of occurrence - EOO) és az elfoglalt terület (Area of occupancy - AOO) kevesebb, mint 400 km²; (2) elterjedése erősen fragmentált; (3) egyik ismert populációja sem védett területen él; és (4) tekintve, hogy sűrűn lakott területek közelében van, élőhelyei fokozott veszélynek vannak kitéve.



58. ábra. A *Pristimantis lojanus* sp. nov. (A-G) és *P. torresi* (H-N) hívóhangja. A: egy öt hangból álló részlet – egy és két alhangból álló utolsó hanggal – oscillogramja; B és I: egy hang oscillogramja; E és L: több hangból álló hívás oscillogramja; G és N: több hangból álló hívás energia-spektruma; H: egy öt hangból álló részlet egy és két hangból álló utolsó hanggal – oscillogramja; A–D FUTPL-A 252; E–G FUTPL-A 249; H–N MUTPL 996, FUTPL-A 256 leltári számú példányok.

Diszkusszió

A *Pristimantis lojanus* elterjedése egy viszonylag kis területre korlátozódik, főként a Felső-Zamora folyó medencéjére, a Guagrahuma-Acacana és a Cajanuma orográfiai csomópontok által határolt kb. 620 km²-es területre (Gallardo 1978, Maldonado és mtsai. 2005). Ez a terület egy harmadkori tómedence volt, amely Szalapa környékén nyílt meg, és a Zamora folyónak adott otthont (Jaramillo 1975, Maldonado és mtsai. 2005). A *P. lojanus* legészakibb feljegyzései San Lucas (Acacana) környékéről származnak, az e területen kívül 2016 óta végzett terepmunkák során nem került elő. Délen a faj eléri Cristal és San Antonio de Paycapamba területét; délebbre, Vilcabamba környékén a *P. lojanus* helyét egy nagyon hasonló, jelenleg leíratlan faj veszi át (Székely és mtsai. személyes megfigyelés). 2016 óta a *P. phoxocephalus* csoportból a Loja-medencéből származó összes észlelés és gyűjtött példány a *P. lojanus*hoz sorolható. A hasonló morfológia miatt és a rendelkezésre álló adatok alapján úgy véljük, hogy a Lynch által 1979-ben Loja-ból gyűjtött és *P. phoxocephalus*nak gondolt példányok valójában a *P. lojanus* képviselői.



59. ábra. A *Pristimantis lojanus* sp. nov. elterjedése Ecuadorban. Az előfordulási pontok az Universidad Técnica Particular de Loja Zoológiai Múzeumában található példányokon és a rögzített hívóhangokon alapulnak.

Sajnos, ahogy Loja város lakossága az évek során egyre nőtt, a város és a környező területek kétélűinek helyzete romlott. Jelenleg 12 kétélűfajjal kapcsolatban (köztük a *P. lojanus*) van észlelés a városból és környékéről (a várost körülvevő, 2700 m magasságig terjedő felső montán erdei ökoszisztémák, egészen a hegyerincekig és a szubpáramo élőhelyekig), de többük

helyzete elkészerítő. Ráadásul, Jelen van Loja kétéltűfaunájában az ökörbéka (*Lithobates catesbeianus*) (Cobos és mtsai. 2015, Shaw 1802), amely a város számos tavában él, és negatív hatással lehet az őshonos fajok, különösen a tóban szaporodó fajok túlélésére. A probléma kezelésére az Universidad Técnica Particular de Loja, a helyi önkormányzat és több helyi ökoklub együttműködése révén kampányt indítottak; a talált egyedek száma (pl. >100/óra a Parque Pucará-ban) azonban arra utal, hogy az ellenőrzésük egyre nehezebb. Az ökörbéka kampányok, amelyek az egyedek kézi módszerekkel történő eltávolításán alapulnak időigényesek és költségesek, és más élőhelyeken korlátozott sikerrel jártak (pl. Kahrs 2006, Kamoroff és mtsai. 2020, Louette és mtsai. 2012), bár jelentős hatással lehetnek az ökörbéka populáció végleges méretére. Más módszerek, például az őshonos ragadozóhalak mesterséges tavakban való alkalmazása hatékonyabb lehet (Louette 2012), de ezek megvalósíthatóságáról a trópusi Andokban nincsenek tanulmányok. Emellett sürgősen szükség lenne a közvéleményt tudatosító kampányokra, amelyek célja az ökörbéka további szándékos betelepítésének megakadályozása, valamint fontos lenne az elterjedésének folyamatos és pontos dokumentálására.

5.2.2. A *Pristimantis orestes* fajcsoport három új faja

A *Pristimantis orestes* fajcsoportot sokáig csupán három, az ecuadori páramo és a köderdő felső régiójában elterjedt faj alkotta: *P. orestes* (Lynch 1979), *P. simonbolivari* (Wiens és Coloma 1992) és *P. vidua* (Lynch 1979). 2008-ra a csoportba már 14 faj tartozott, mivel a korábbi három mellé 11 perui fajt soroltak be (Duellman & Lehr 2009, Hedges és mtsai. 2008). A perui fajok közül négy került be egy átfogó Terrarana (most Brachycephaloidea, a békák egy monofiletikus csoportja (superfamily), ami hét családot, köztül a Strabomantidae családot is magába foglalja) revízióba, és közülük is csak kettő reprezentálta a *P. orestes* fajcsoportot (*P. orestes* és *P. simonbolivari*) (Hedges és mtsai. 2008, Padial és mtsai. 2014). A *P. orestes* fajcsoporthoz később két másik fajt is hozzáadtak: *P. bambu* Arteaga-Navarro & Guayasamin 2011 és *P. mazar* Guayasamin & Arteaga 2013.

Brito és mtsai. (2017a) újrendezte a csoportot, és hozzáadták a *P. andinognomus* Lehr & Coloma 2008, az újonnan leírt *P. muranunka* valamint két további (még leíratlan) fajt. Eltávolították a csoportból a perui *P. melanogaster* (Duellman & Pramuk 1999) és a *P. simonsii* (Boulenger 1900) fajokat. Székely és mtsai. (2018) a *Pristimantis tiktik* fajt sorolták a csoportba, Urgilés és mtsai. (2019) pedig tisztázta a *P. orestes* taxonómiai státuszát, először használva a típuslelőhelyről származó genetikai adatokat, amelynek során ide sorolták a *P. saturninoi* fajt. Brito és mtsai. (2017b) két új fajt, a *P. cajanuma* és a *P. quintanai*-t is felvették a csoportba.

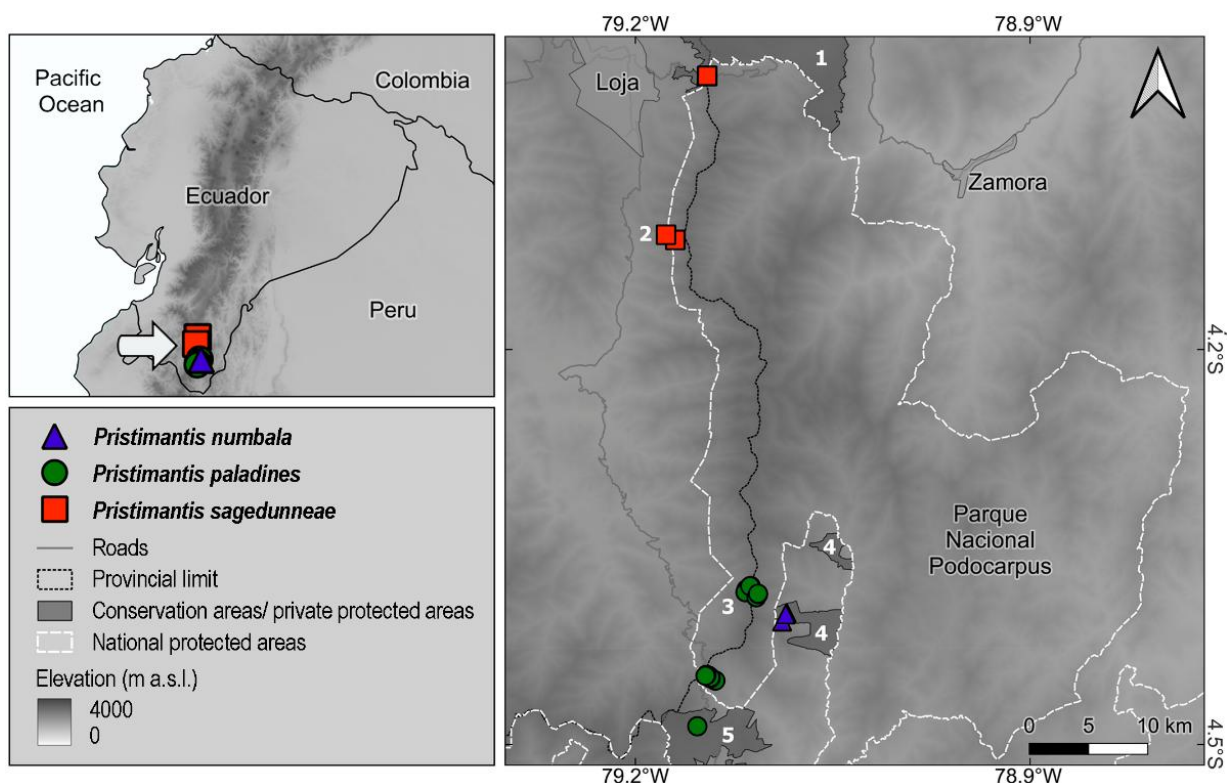
Székely és mtsai (2020) a típuslelőhelyről, Abra de Zamora-ból származó minták felhasználásával újra leírták a *P. vidua* és a *P. colodactylus* (Lynch 1979) fajokat, és megerősítették a csoportba tartozásukat, valamint két új fajjal, a *P. samaniegoi* és *P. matildae* fajjal bővítették a csoportot. A csoport vizsgálatának megkönnyítése érdekében a szerzők a fajokat három nagy alcsoportra osztották (62. ábra): a *P. orestes* alcsoport (*P. andinognomus*, *P. orestes*, *P. vidua*, *P. cajanuma* és egy leíratlan faj), a közelrokon *P. simonbolivari* alcsoport (*P. tiktik*, *P. saturninoi*, *P. simonbolivari*, *P. bambu*, *P. mazar*, *P. quintanai*, *P. samaniegoi* és két leíratlan faj), és a morfológiailag elkülönülő, bromélia-specialista *P. colodactylus* alcsoport (*P. matildae*, *P. colodactylus*, *P. muranunka* és egy leíratlan faj). Így 2020-ra a *P. orestes* fajcsoport 14 fajt és 4 le nem írt fajt számlált, amelyek mind Közép- és Dél-Ecuador Andok régiójából származtak. Tanulmányunkban a *P. colodactylus* alcsoport három új kriptikus fajt írtuk le Ecuador déli részéről; ezek az új fajok morfológiailag különböznek a másik két alcsoport rokon fajaitól, de a *P. colodactylus* alcsoport valamennyi testvérfajától is, amelyekről ráadásul arboreális szokásaikban is különböznek.

Módszerek

Mintavétel

A vizsgált példányokat 2015 májusa és 2022 májusa között több terepbejárás során gyűjtöttük Abra de Zamora-ban (Loja tartomány, Dél-Ecuador; 3,9922°S, 79,1455°W; WGS84 adat; 2812 m a.). s.l.), a Podocarpus Nemzeti Park Cajanuma régiójában (Loja tartomány; 4,1128° S, 79,1767° W, 2991 m), a Podocarpus Nemzeti Park Cerro Toledo régiójában (Loja és Zamora Chinchipe tartományok; 4. 3796°S, 79,1124°W, 3080 m), a Numbala Rezervátumban (Zamora Chinchipe tartomány; 4,4065°S, 79,0885°W, 2875 m), a Podocarpus Nemzeti Park Tapichalaca Rezervátuma közelében (Zamora Chinchipe tartomány; 4. 4472°S, 79,1459°W, 2880 m), és a Tapichalaca Rezervátumban (Zamora Chinchipe tartomány; 4,4861°S, 79,1529°W, 2915 m). Valamennyi mintavételi területen intenzív vizuális és akusztikus felméréseket végeztünk nappal és éjszaka (12:00-02:00 óra között).

A vizsgált területek (60. ábra) a Podocarpus Nemzeti Park területén belül vagy annak közvetlen közelében helyezkedtek el, Dél-Ecuadorban (Loja és Zamora Chinchipe tartományok). A parkot 1982-ben nyitották meg a nyilvánosság előtt, területe 146289 hektár; domborzata igen változatos, 900 és 3650 m tengerszint feletti magasságot fed le, nagy kiterjedésű, változatos természetes élőhelyekkel (Ordóñez-Delgado és mtsai. 2019, Rahbek és mtsai. 1995), és része a trópusi Andok biodiverzitás forró pontjainak, amelyek a Föld leggazdagabb biodiverzitású területei (Myers és mtsai. 2000). A vizsgálatunkhoz vett mintaterület 2800 és 3100 m közötti tengerszint feletti magasságon fekszik, és szubpáramo vagy örökzöld elfin erdőből áll (Homeier és mtsai. 2008).



60. ábra. A három új faj előfordulása, az MUTPL gyűjteményében található példányok és terepi megfigyelések alapján. A számok a főbb mintavételi régiókat jelölik: 1: Abra de Zamora; 2: Podocarpus Nemzeti Park Cajanuma szektora; 3: Podocarpus Nemzeti Park Cerro Toledo szektora és 4: Reserva Numbala és 5: Reserva Tapichalaca

A fajok relatív gyakoriságának rangsorolására a következő kifejezéseket használtuk (a Székely és mtsai. 2020-ban bemutatottak szerint): gyakori - amikor a faj jelenlétét a megfelelő élőhelyen, nagy vagy közepes számban, a mintavételi napok/éjszakák több mint 50%-án észleltük (láttuk vagy hallottuk); nem gyakori - amikor a faj jelenlétét közepes vagy kis

számban, a mintavételi napok/éjszakák 25-50%-án észleltük; ritka - amikor a faj jelenlétét kis számban, a mintavételi napok/éjszakák kevesebb mint 25%-án észleltük.

Minden begyűjtött példányt élve lefényképeztünk, 20%-os benzokainnal elaltattunk, 10%-os formalinban rögzítettük, és 70%-os etanolban tároltunk. A genetikai elemzésekhez szükséges szövetmintákat 96%-os etanolban tartósítottuk. A vizsgált példányok (a típus-sorozatban és a Székely és mtsai. 2023, I. függelékben felsoroltak) a Museo de Zoología, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador (MUTPL), Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador (QCAZ) és Museo de Zoología, Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito, Ecuador (MZUTI) gyűjteményeiben található.

Molekuláris elemzések

A DNS-kivonást, amplifikációt és szekvenálást a Székely és mtsai. (2020) tanulmányban foglaltak szerint végeztük; az új DNS-szekvenciákat az NCBI GenBankba regisztráltuk (Székely és mtsai. 2023, II. függelék). A filogenetikai elemzéshez 19 ecuadori lelőhelyen gyűjtött 21 faj 43 egyedéből származó két mitokondriális riboszómális gén (12S és 16S rRNS) és egy nukleáris gén (RAG-1, rekombinációt aktiváló gén 1) szekvenciáit használtuk fel (Székely és mtsai. 2023, II. függelék), amelyek a *Pristimantis orestes* fajcsoport összes jelenleg ismert fajt képviselik (a GenBankban elérhető szekvenciák és a jelen tanulmányban leírt 25 új szekvencia). Külcsoportként a *Pristimantis ceuthospilus*, *P. diadematus*, *P. imitatrix*, *P. rhodoplichus*, *P. unistrigatus* és *P. wiensi* fajokat használtuk. A fát a *P. galdi* fajjal gyökerezítettük.

A szekvenciákat a Geneious Prime programmal (Biomatters Ltd., Új-Zéland) szerkesztettük és illesztettük (MAFFT algoritmus a G-INS-i iteratív finomítási módszerrel; Katoh & Standley 2013). A 12S, 16S és RAG-1 szekvenciák illesztéseit a PhyDE programban (Müller és mtsai. 2010) vizuálisan ellenőriztük az esetleges illesztési hibák kijavítása érdekében, egy mátrixba ágyaztuk őket, amelyet felhasználtuk a filogenetikai elemzésekhez. A filogenetikai elemzések egy 2733 bp hosszú szekvencia adatsoron alapultak (901 bp a 12S, 1193 bp a 16S és 639 bp a RAG-1 esetében). Az illesztett, konkatenált mátrix elérhető a <https://doi.org/10.5281/zenodo.7262263> címen. BLAST keresést végeztünk az NCBI GenBankban a hasonló 12S, 16S és RAG-1 szekvenciák azonosítására, és a FastTree 2.1 (Price és mtsai. 2010) segítségével a legtöbb rendelkezésre álló ecuadori *Pristimantis*-szekvenciával egy előzetes feltáró fát készítettünk az új fajok rokonsági viszonyainak meghatározására. Mind a BLAST-keresések, mind a FastTree azt mutatta, hogy az új fajok a *P. orestes* fajcsoportba tartoznak.

A filogenetikai kapcsolatokat Maximum Likelihood és Bayes-féle megközelítéssel vizsgáltuk. A filogenetikai elemzések részletes leírását lásd Székely és mtsai. 2023 tanulmányban.

Morfológiai vizsgálatok

A morfológiai jellemzők leírása és a leírás formátuma során nagyrészt Duellman & Lehr (2009) munkáját követtük. A nemet a hangrések, a hüvelykvánkosok és/vagy a gonádok vizsgálata alapján határoztuk meg. A fiatal és szubadult egyedeket a kisebb méret, az erőteljesebben szemölcsös bőr és a petevezeték és/vagy a petefészek fejlettségi állapota alapján különböztettük meg a kifejlett egyedektől (Duellman & Lehr 2009). Duellman és Lehr (2009) javaslatának megfelelően az I. ujj (hüvelykujj) tövével lévő nagy alsó gumót thenar gumónak, a III. és IV. ujj tövével lévő, általában sokkal nagyobb és legtöbbször distalis részben osztott gumót pedig tenyér (palmar) gumónak neveztük. Lynch és Duellman (1997) alapján az V. és III. lábujj relatív hosszát a következőképpen osztályoztuk: Az V. lábujj kissé hosszabb, mint a III. lábujj, ha összeillesztve az V. lábujj csúcsa nem éri el a IV. lábujjon lévő distalis subarticularis tuberculum proximális szélét; az V. lábujj hosszabb, mint a III. lábujj, ha a csúcsa eléri a IV. lábujjon lévő távolabbi izület mtsai. attí gumó közelebb lévő szélét, de nem terjed el annak távolabbi széléig; az V. lábujj sokkal hosszabb, mint a III. lábujj, ha az V. lábujj csúcsa eléri a IV. lábujjon lévő távolabbi izület alatti gumó távolabbi szélét, vagy túlnyúlik azon. Az élő példányok színét terepi feljegyzések és digitális fényképek alapján írtuk le.

Számos fontos karakter összehasonlításához előre meghatározott kategóriákat használtunk, mivel morfológiai méréseket csak néhány példányon sikerült végezni. Így a testméretet (relatív méret a *P. orestes* fajcsoporton belül) a következőképpen határoztuk meg: apró- amikor a legnagyobb észlelt nőstény teljes testhossza (SVL) 21 mm-nél kisebb; kicsi- nőstény SVL 23 mm-nél kisebb; közepes- nőstény SVL 25 mm-nél kisebb; nagy- nőstény SVL 25 mm-nél nagyobb. Orrhossz: nagyon rövid - amikor az átlagos szem-orrluk távolság az SVL 8%-ánál kisebb; rövid átlagos szem-orrluk távolság az SVL 9%-ánál kisebb; hosszú átlagos szemnyílás távolság az SVL 9%-ánál nagyobb. A III. ujj hossza (vagy a kéz hossza): nagyon rövid - amikor a III. ujj átlagos hossza az SVL 22%-ánál kisebb; rövid - a III. ujj átlagos hossza az SVL 24%-ánál kisebb; közepes - a III. ujj átlagos hossza az SVL 26%-ánál kisebb; hosszú - a III. ujj átlagos hossza az SVL 28%-ánál kisebb; nagyon hosszú - a III. ujj átlagos hossza az SVL 28%-ánál nagyobb. IV. lábujj hossza: nagyon rövid - amikor a IV. lábujj átlagos hossza (lábfej hossza) kisebb, mint az SVL 38%-a; rövid - a IV. lábujj átlagos hossza kisebb, mint az SVL 40%-a; közepes - a IV. lábujj átlagos hossza kisebb, mint az SVL 46%-a; hosszú - a IV. lábujj átlagos hossza kisebb, mint az SVL 48%-a; nagyon hosszú - a IV. lábujj átlagos hossza nagyobb, mint az SVL 48%-a. Tympanum: jelen van - a tympanum membrán hiányzik, de a tympanum körüli gyűrű kifejezett, vagy a tympanum membrán és a tympanum körüli gyűrű is jelen van; hiányzik - a tympanum körüli gyűrű és a tympanum membránja is hiányzik.

A példányokat az eutanázia előtt egy My Weigh Triton T3 hordozható mérleggel, 0,01 g pontossággal megmértük (testtömeg: BM). A méréseket sztereomikroszkóp alatt, Vernier-tolómérővel végeztük, és a legközelebbi 0,1 mm-re kerekítettük. A következő morfológiai méréseket végeztük: testhossz (SVL), fejszélesség (HW), fejhossz (HL), szemek közötti távolság (IOD), orrlukak közötti távolság (IND), felső szemhéj szélessége (EW), szemátmérő (ED), szem-orrluk távolság (EN), combcsont hossza (FL), sípcsont hossza (TL), lábfej hossza (FoL); kézfej hossza (HaL) (Székely és mtsai. 2020). Megmértük továbbá a fejmagasságot (HL) és a testmagasságot (BH) is. A méréseket átlag \pm SD-ben adtuk meg.

Vizsgáltuk az állatok testalakjának és a preferált mikroélőhelyüknek kapcsolatát is, amihez a fajokat filogenetikai al csoportjuk szerinti kategóriákba soroltuk: *P. simonbolivari* (ide tartozik a *P. tiktik* és a *P. samaniegoi*), *P. orestes* (*P. andinognomus*, *P. cajanuma*, *P. orestes* és *P. vidua*), de a *P. colodactylus* al csoportot két külön kategóriára osztottuk mikrohabitatuk alapján: a bromélialakó *P. colodactylus* (*P. colodactylus*, *P. matildae* és *P. muranunka*) és fán lakó (arboreális) *P. colodactylus* (*P. numbala*, *P. paladines* és *P. sagedunnae*). Az egyedek alakját a fejarány (fejmagasság/ SVL) és a testarány (testmagasság/ SVL) mérőszámokkal jellemeztük. A paraméterek összehasonlítását a négy fajkategória között ANOVA-tesztekkel végeztük, miután ellenőriztük, hogy a normál eloszlás (Q-Q plot vizsgálat) és a variancia homogenitás (Levene-teszt) feltételek teljesülnek-e; amennyiben az ANOVA-tesztek szignifikánsak voltak, a Tukey-féle HSD post-hoc tesztet is elvégeztük. A morfológiai tulajdonságok páronkénti összehasonlítására Mann-Whitney U-teszteket alkalmaztunk (az alacsony mintaszám miatt), és csak a nőstények mérési adatait használtuk. Minden statisztikai elemzést az IBM SPSS Statistics 25-ös verziójával (SPSS Inc., Chicago) végeztünk, $\alpha = 0,05$ szignifikancia-szint mellett.

Eredmények

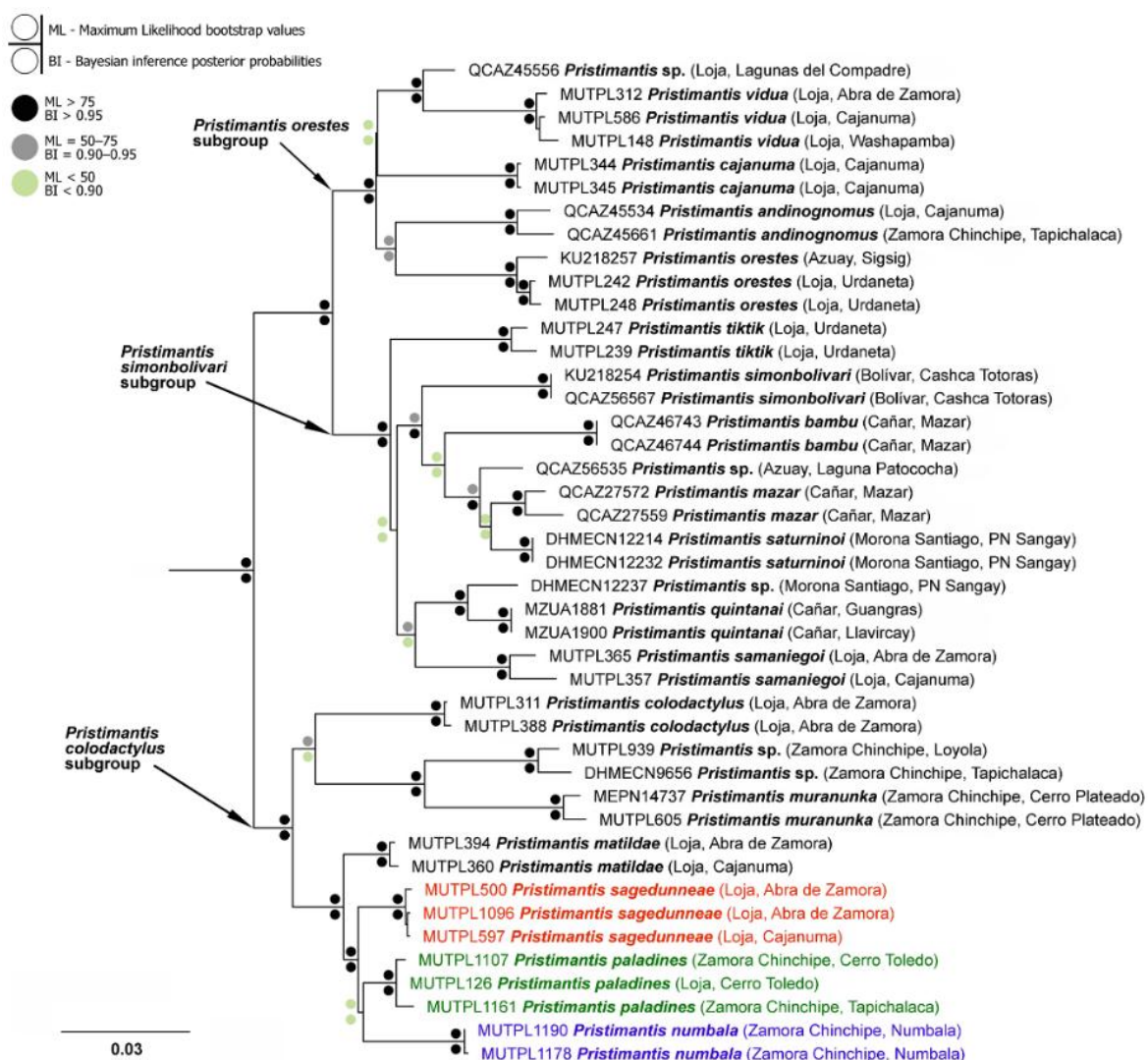
Filogenetikai elemzések

A BI és a ML filogenetikai fák nagyjából ugyanazt a topológiát mutatták, kisebb eltérésekkel néhány megoldatlan ág pozíciójában. A BI elemzés erősebb támogatást kapott néhány elágazási pont esetében (61. ábra). Brito és mtsai. (2017a), Urgilés és mtsai. (2019) és Székely és mtsai. (2020) tanulmányaihoz hasonlóan a *Pristimantis orestes* fajcsoport monofiletikusnak bizonyult, mindkét elemzésben erős statisztikai támogatással (bootstrap értékek = 100%; poszterior valószínűségek = 1). Emellett a három al csoportot is (*P. orestes*, *P. simonbolivari* és *P. colodactylus*, Székely és mtsai. 2020) mindkét elemzés magas értékekkel támogatta. Az általunk kapott filogenetikai fa topológiája hasonló a Székely és mtsai. (2020) által

bemutatotthoz, néhány kisebb eltéréssel a *P. orestes* és a *P. simonbolivari* alcsoportok bizonytalan elágazásában.

A három új faj a *P. colodactylus* alcsoportba tartozik, és testvérfajával, a *P. matildae* fajjal együtt egy erősen támogatott kládot alkot (bootstrap értékek = 99,6%; poszterior valószínűségek = 1); az új fajok közötti pontos kapcsolat továbbra sem megoldott (61. ábra). Az új fajok és testvérfajuk, a *P. matildae* 16S génjének nem korrigált genetikai p-távolsága 2,4-4,9% között mozog; a *P. colodactylus* alcsoport többi fájától való távolság 6,0-10,5% között, a *P. orestes* és *P. simonbolivari* alcsoport fajaitól való genetikai távolság pedig 7,5-13,0% között mozog (Székely és mtsai. 2023, S1 táblázat).

Az új fajok közötti korrigálatlan genetikai p-távolságok a következők: a *P. sagedunneae* és a *P. paladines* között 2,0 - 2,8% között, a *P. sagedunneae* és a *P. numbala* között 4,3 - 4,9%, a *P. paladines* és a *P. numbala* között pedig 3,4 - 4,4% között. Ami a fajon belüli korrigálatlan genetikai p-távolságokat illeti, ezek a *P. sagedunneae* esetében nem haladják meg a 0,2%-ot, a *P. paladines* esetében a 0,7%-ot, a *P. numbala* esetében pedig a 0,1%-ot (Székely és mtsai. 2023, S1 táblázat).



61. ábra. 2733 bázispár hosszú konkatenált mitokondriális 12S és 16S és nukleáris RAG-1 génfragmentumokon alapuló maximum-likelihood alapú törzsfa fa a *Pristimantis orestes* fajcsoport filogenetikai kapcsolatainak ábrázolására. Külcsoport nem látható. Az azonosító példányok leltári számai, fajnevei, provincia és rövid lelőhelynevek az ágvégződés után láthatóak. Minden minta Ecuadorból származik. (További részletes adatok a Székely és mtsai. 2023, II. függelékben láthatóak).

Morfológia

Morfometriai elemzésünk azt mutatta, hogy a *P. colodactylus* alcsoportba tartozó bromélia-specialista fajok testalkata eltér a többtől. Fejük laposabb (ANOVA $F_{3,122} = 48,86$, $P < 0,001$; 14. táblázat, Székely és mtsai. 2023, 4. ábra) és testük karcsúbb (ANOVA, $F_{3,122} = 14,19$, $P < 0,001$; 14. táblázat, Székely és mtsai. 2023, 5. ábra), mind a másik két alcsoportba tartozó fajoknak, vagy az újonnan leírt fán lakó testvérfajoknak. A három új faj testalkata jobban hasonlít a *P. orestes* és a *P. simonbolivari* alcsoportok fajaihoz, mint a *P. colodactylus* alcsoportba tartozó broméliához kötődő testvérfajokhoz (Székely és mtsai. 2023, 1., 4. és 5. ábrák).

	<i>P. colodactylus</i> alcsoport – bromélia specialisták	<i>P. colodactylus</i> alcsoport – fán lakók	<i>P. simonbolivari</i> alcsoport	<i>P. orestes</i> alcsoport
<i>P. colodactylus</i> alcsoport – bromélia specialisták	-	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
<i>P. colodactylus</i> alcsoport – fán lakók	$P = 0.001$	-	$P = 0.043$	$P = 0.253$
<i>P. simonbolivari</i> alcsoport	$P = 0.001$	$P = 0.991$	-	$P = 0.469$
<i>P. orestes</i> alcsoport	$P < 0.0001$	$P = 0.249$	$P = 0.515$	-

14. táblázat. Páronkénti összehasonlítások a faj-alcsoportok között (post-hoc Tukey HSD teszt) a fejszélesség/SVL (felső mátrixrész) és a testmagasság/SVL (alsó mátrixrész) tulajdonságokra. Vastaggal szedett értékek a szignifikáns eltéréseket mutatják ($\alpha = 0.05$). Az elemzésben szereplő fajok: *Pristimantis colodactylus* alcsoport bromélia specialista fajok (*P. colodactylus*, *P. matildae* és *P. muranunka*), *P. colodactylus* alcsoport fán lakók (*P. numbala*, *P. paladines* és *P. sagedunnae*), *P. simonbolivari* alcsoport (*P. tiktik* és *P. samaniegoi*), és *P. orestes* alcsoport (*P. andinognomus*, *P. cajanuma*, *P. orestes* és *P. vidua*).



62. ábra. A *Pristimantis orestes* fajcsoporton belüli morfológiai változatosság.

***Pristimantis sagedunneae* sp. nov. Székely, Székely, Armijos-Ojeda,
Hualpa-Vega és Vörös**
(63. ábra és Székely és mtsai. 2023, 7–9 ábrák)



63. ábra. *Pristimantis sagedunneae* adult nőstény élő példánya (MUTPL 500, SVL= 21.4 mm) Abra de Zamora, Loja Provincia, 2,812 m: A: dorzolaterális nézet; (B) ventrális nézet; (C) dorzális nézet.

Angol neve: Sage Dunne’s Rain Frog

Spanyol neve: Cutín de Sage Dunne

Etimológia. – A *sagedunneae* név birtokos esetű főnév; a faj Sage Dunne-ról kapta a nevét, az Andok állatvilága iránti szenvedélye, és a családja által az ecuadori természetvédelmi munkában nyújtott felbecsülhetetlen értékű támogatása elismeréseként. Különösen fontos volt a Dunne család hozzájárulása a Sangay-Podocarpus ökológiai folyósó (Ecuador első ökológiai folyósója) kételtűinek védelméhez, amely 567067 hektárnyi, magasan fekvő páramo ökoszisztémát, valamint tavak és vizes élőhelyek láncolatát védi, egyedülálló biológiai sokféleséggel és endemizmussal.

Holotípus. – MUTPL 500 (terepi gyűjtőkódja SC 230; 63. ábra és Székely és mtsai. 2023. 7–8 ábrák), adult nőstény Ecuadorból, Loja Provincia, Abra de Zamora, Ecuador (3.9922°S, 79.1455°W), 2812 m, gyűjtő: Székely P. és Stănescu F., 2018 november 13-án. Paratípusok leírását lásd Székely és mtsai. 2023., 45-46. oldal.

Diagnózis. – Filogenetikai bizonyítékok és általános morfológiai jegyek alapján az új fajt a *Pristimantis* nemzetségbe soroltuk. A *Pristimantis sagedunneae* egy közepes méretű faj (a *P. orestes* fajsoport tagja; Székely és mtsai. 2023, 2. táblázat), a következő jellegzetességekkel: (1) a hát elszórtan szemölcsös (élő példányon a bőr szemölcsözött strukturája jobban észrevehető), a bőr a hasoldalon márványozott, korong alakú redő jelen van, dorzolaterális

redők hiányoznak, lágyék elülső részén hosszirányú oldalsó redők láthatóak; (2) a tympanum hártája és gyűrűje hiányoznak, szupratympanikus redő jelen van; (3) orrcsúcs felülről hegyestől lekerekítettig változik, oldalról lekerekített; canthus rostralis (szem és orr közötti szög) felülről nézve homorú, profilban lekerekített; (4) a felső szemhéjon egy nagyobb és több kisebb szemölcs látható (ez élő példányokon jobban látszik), szélessége az IOD 68%-a; a fejtetőn lévő „tarajok” hiányoznak; (5) a vomerin fogak nyúlványai a szájnyálkahártyába süllyednek, mindegyik nyúlvány 3-5 fogat hordoz; (6) hanghólyag, hangrések és a hüvelykvánkos pozíciói ismeretlenek (7) az I. ujj rövidebb, mint a II. ujj; az ujjakon lévő tapadókorongok szélesek, körkörös barázdák terkítják; (8) a korongok oldala rojtozott, izület alatti (subarticular) gumók kiemelkedőek, ujjak alatti (supernumerary) gumók jelen vannak; a tenyérgumó (palmar) általában egy nagyobb (belső) és egy kisebb (külső) gumóra oszlik; hüvelykujj alsó gumó (thenar) ellipszis alakú, azonos méretű a belső tenyérgumóval; (9) ulnaris gumók jelen vannak (élő példányokon jobban látszik); (10) sarok egy-három nagy gumóval és több kisebb gumóval (élő példányon jobban látható); a lábtő külső széle egy sok kisebb gumóval; belső tarsalis redő jelen van; (11) a belső lábközépcsont gumója nagyjából tojásdad, körülbelül 3-4x akkora, mint a lábközépcsontgumó; (12) a lábujjakon széles oldalsó szegélyek; az V. lábujj hosszabb, mint a III. lábujj; a lábujjakon lévő korongok szélesek, nagyjából ugyanolyan méretűek, mint az ujjakon; a körkörös barázdák jelen vannak; (13) élő példányokon a hátoldal barnásszürke, feketés vagy sötétbarna sávokkal, amelyek a hát közepén >X vagy XXX alakban egyesülnek; az oldalakon, a mellső és hátsó végtagok dorzális felén sötét keresztirányú sávok; a combok dorzális felén, az ágyékon és a végtagok nem látható felületén nagy vörös színű foltok; a fej széles, fekete szegélyű, világos szemek közötti sávokkal, sötét ajak feletti sávokkal és sötét tympanum alatti csíkokkal; a hátsó és mellső végtagok ventrális felülete rózsaszínes fehér vagy rózsaszínes szürke, a torkon sötét foltokkal vagy anélkül; szivárványhártya bronzszínű, vékony fekete hálózattal, közepén egy széles, vízszintes, sötétvörös csíkkal; (14) testhossz 21,4-24,3 mm adult nőtényeknél ($22,5 \pm 1,41$, $n = 5$); hímek méretéről nincs adat.

Összehasonlítás más fajokkal: lásd Székely és mtsai. 2023., 47-49. oldal.

Holotípus leírása: lásd Székely és mtsai. 2023., 49-51. oldal.

Változatosság. – A morfometriai változatosságot a Székely és mtsai. 2023, 4. táblázat foglalja össze. A hát közepén összefutó sötét, feketés sávok különböző formájúak, például >X, XX, XXX vagy W-alakúak, és minden példánynál egyedi mintázatot mutattak. Ezek a minták valószínűleg felhasználhatók az egyedek fényképes azonosítására. A vizsgált egyedek közül a MUTPL 597 paratípus (Székely és mtsai. 2023, 9A, D, G ábra) rendelkezett a legintenzívebb vörös színnel a comb, az ágyék és a végtagok nem látszó dorzális felszínén. Ezen a példányon láttuk a legkiterjedtebb vörös foltokat, ami még a lábujjak és az ujjvégekre is kiterjedt (9A ábra). A MUTPL 1095 paratípus (Székely és mtsai. 2023, 9B ábra) íriszének színe nagyon világos volt, szinte fehér, kivéve a vízszintes sötétvörös csíkot. Az egyetlen előkerült fiatal egyed (MUTPL 1096 paratípus) combjainak és ágyékának hátsó felszínén csak egy kis rész volt vörös színű (Székely és mtsai. 2023, 9C ábra). Feltehetően ennél a fajnál az egyedek fejlődése során változik a színek intenzitása.

Hívóhang. – Ismeretlen.

Elterjedés. – *Pristimantis sagedunneae* csak Abra de Zamorából, és attól nagyjából 13 km-re délre, a Podocarpus Nemzeti Park Cajanuma szektorából ismert (60. ábra). Az Abra de Zamora területén talált összes példányt egy nagyon kis területen (kevesebb, mint 50 m²) találtuk, Cajanumában pedig csak a Los Miradores ösvényen észleltük a fajt. A befogott példányokat 2800 és 3000 m közötti tengerszint feletti magassági tartományban, szubpáramo ökoszisztémában találtuk (Homeier és mtsai. 2008). A szomszédos, hasonló ökoszisztémájú

területeken a 2016 óta végzett intenzív terepmunka ellenére sem sikerült találkozunk ezzel a fajjal.

Természetráajz. – Ritka, vagy nehezen észlelhető faj. 2016 és 2022 között mindössze hét példányát találtuk meg, és a területen végzett több mint 50 napos terepmunka során mindössze négy napon voltunk sikeresek. Valamennyi állatot éjszaka, mohával borított ágakon vagy leveleken ülve, 40 cm-től 2 m magasságig, bokros élőhelyeken találtuk. Egyetlen egyedet sem láttunk a broméliák szárában. Sajnos, az intenzív keresés ellenére nem talákoztunk hím példányokkal, és a hívóhangjukat sem hallottuk. A szimpatikus békafajok közé tartoznak a *Pristimantis aff. andinognomus*, *P. cajanuma*, *P. matildae*, *P. samaniegoi*, *P. versicolor* (Lynch 1979) és *P. vidua*.

Természetvédelmi státusz. – A *Pristimantis sagedunneae* csak két egymáshoz közeli lelőhelyről ismert, kevesebb mint 10 km² területről. Bár mindkét lelőhely országos védetség alatt álló területen található, javasoljuk, hogy ezt a fajt az IUCN B1ab(iii,iv,v)+2ab(iii,iv,v) kritériumai szerint (IUCN 2001) veszélyeztetett kategóriába soroljuk, mivel: (1) elterjedési területe (Extent of occurrence - EOO) és az elfoglalt terület (Area of occupancy - AOO) a becslések szerint kevesebb, mint 10 km²; (2) csak néhány egyed alapján és csak két helyről ismert; és (3) élőhelyei a közeljövőben veszélyeztetettek lehetnek, mivel sűrűn lakott területek közelében találhatóak (Ordóñez-Delgado és mtsai. 2020).

***Pristimantis paladines* sp. nov. Székely, Székely, Armijos-Ojeda, Hualpa-Vega és Vörös**
(64. ábra és Székely és mtsai. 2023. 11-14 ábra)



64. ábra. *Pristimantis paladines* adult nőtény élő példánya (MUTPL 1159, SVL = 20.6 mm) Podocarpus Nemzeti Park, Reserva Tapichalaca környékéről, Zamora Chinchipe Provincia, 2880 m; A: dorzolaterális nézet; (B) ventrális nézet; (C) dorzális nézet.

Angol neve: Paladines Rain Frog

Spanyol neve: Cutín de Paladines

Etimológia. – A *paladines* név egy todalékos főnév. A faj a Loja városából származó Paladines család, különösen Félix Humberto Paladines Paladines (1938-2022) után kapta a nevét, aki a tudományos és kulturális élet kiemelkedő alakja volt, és jelentősen hozzájárult a dél-ecuadori emberek történelmének és identitásának megőrzéséhez. Ezen túlmenően szerettünk volna elismerni gyermekei, Renzo, Bruno, Pedro és Maria Gabriela által végzett munkáját, akik létrehozták a Naturaleza y Cultura Internacional (NCI) nevű civil szervezetet, amely a latin-amerikai élővilág védelméért küzdő szervezet, és amely a mai napig több mint 8,5 millió hektárnyi trópusi erdőt védett meg különböző országokban.

Holotípus. – MUTPL 1159 (terepi gyűjtőkódja SC 1260; 64. ábra és Székely és mtsai. 2023, 11-12 ábra), adult nőtény Ecuadorból, Zamora Chinchipe Provincia, Podocarpus Nemzeti Park Reserva Tapichalaca környéki területe (4.4472°S, 79.1459°W), 2880 m, gyűjtő: Székely P., Székely D., Armijos-Ojeda D. és Carrión L. 2021 augusztus 27-én.
Paratípusok leírását lásd Székely és mtsai. 2023, 52-53. oldal.

Diagnózis. – Filogenetikai bizonyítékok és általános morfológiai jegyek alapján az új fajt a *Pristimantis* nemzetségbe soroltuk. A *Pristimantis paladines* egy kis méretű faj (a *P. orestes* fajcsoport tagja; Székely és mtsai. 2023, 2. táblázat), a következő jellegzetességekkel: (1) a hát szemölcsös, elszórva nagyobb szemölcsökkel tarkítva (élő példányon a bőr szemölcsözött struktúrája jobban észrevehető), a bőr a hasoldalon márványozott, korong alakú redő jelen van, dorzolaterális redők hiányoznak, lágyék elülső részén hosszirányú oldalsó redők láthatóak; hátközépi redő kiemelkedik, és több nagy méretű szemölcs tarkítja a teljes hosszán (élő példányokon jobban látható); (2) a tympanum hártálya és gyűrűje hiányoznak, szupratympanikus redő jelen van; (3) orrcsúcs felülről hegyestől a kevésbé hegyesig változik, oldalról lekerekített; canthus rostralis (szem és orr közötti szög) felülről nézve gyengén homorú, profilban lekerekített; (4) a felső szemhéjon 2-3 nagyobb és több kisebb szemölcs látható (ez élő példányokon jobban látszik), szélessége az IOD 72%-a nőstényeknél és 81% hímeknél; a fejtetőn lévő „tarajok” hiányoznak; (5) a vomerin fogak nyúlványai alig észrevehetőek, mindegyik nyúlvány 3-5 fogat hordoz; (6) hímeeknek hiányzik a hanghólyag, hangrések és hüvelykvánkosok; (7) az I. ujj rövidebb, mint a II. ujj; az ujjakon lévő tapadókorongok szélesek, körkörös barázdák tarkítják; (8) a korongok oldala rojtzott, ízület alatti (subarticular) gumók kiemelkedőek, ujjak alatti (supernumerary) gumók jelen vannak; a tenyergumó (palmar) nem osztott, vagy csak részben osztott egy nagyobb (belső) és egy kisebb (külső) gumóra; hüvelykujj alsó gumó (thenar) ellipszis alakú, nagyobb, mint a belső tenyergumó; (9) ulnaris gumók jelen vannak (élő példányokon jobban látszik); (10) sarok kettő-három nagy gumóval és több kisebb gumóval (élő példányon jobban látható); a lábtő külső széle egy sor nagyobb gumóval; belső tarsalis redő jelen van; (11) a belső lábközépcsont gumója nagyjából tojásdad, körülbelül 2-3-szor akkora, mint a lábközépcsontgumó; (12) a lábujjakon széles oldalsó szegélyek; úszóhártya bazális elhelyezkedésű, az V. lábujj hosszabb, mint a III. lábujj; a lábujjakon lévő korongok szélesek, valamivel kisebbek, mint az ujjakon; a körkörös barázdák jelen vannak; (13) élő példányokon a hátoldal a barna különböző árnyalatait mutatja, feketés vagy sötétbarna sávokkal X vagy W alakú foltokkal vagy anélkül; az oldalakon, a mellső és hátsó végtagok dorzális felén sötét keresztirányú sávok; a combok dorzális felén, az ágyékon és a végtagok nem látható felületén vörös vagy vörösesbarna színezet; a fejen széles, sötét szemek közötti sávok, sötét ajak feletti sávokkal és sötét tympanum alatti csíkokkal; a hátsó és mellső végtagok ventrális felülete rózsaszínes vagy rózsaszínes fehér, a torkon sötét foltokkal vagy anélkül; szivárványhártya bronzszínű, vékony fekete hálózattal, közepén egy széles, vízszintes, sötétvörös csíkkal; (14) testhossz 19,5-21,4 mm adult nőstényeknél ($20,5 \pm 0,82$, $n = 5$); és 16,7-18,3 mm adult hímeknél ($17,4 \pm 0,73$, $n = 5$).

Összehasonlítás más fajokkal: lásd Székely és mtsai. 2023, 56-57. oldal.

Holotípus leírása: lásd Székely és mtsai. 2023, 57-58. oldal.

Változatosság. – A morfológiai változatosságot a Székely és mtsai. 2023, 4. táblázat foglalja össze. A nőstények jóval nagyobbak a hímeknél, de ezen kívül nem jellemző más elkülönítő bélyeg a két nemre. Némelyik egyednél, mint pl. a nőstény paratípus MUTPL1160 (Székely és mtsai. 2023, 13B, E ábrák), a teljes hát vöröses-narancssárgás, más példánynál, mint pl. a nőstény paratípus MUTPL1161 (Székely és mtsai. 2023, 13C, F ábrák), a hát inkább zöld, de kisebb vöröses-narancsos beékelésekkel. Némelyik egyednél (pl. MUTPL 123, MUTPL 1155 or MUTPL 1160 paratípusok) kisebb vagy nagyobb fehér foltok tarkítják a hátat, fejet vagy a mellő és hátsó végtagok dorzális felületét (Székely és mtsai. 2023, 13B, E ábrák). A hím paratípus MUTPL 125 különleges színezetet képviselt a széles, sárgásfehér hátközépi csíkjával (Székely és mtsai. 2023, 14C, D ábrák).

Hívóhang. – Ismeretlen.

Elterjedés. – A *Pristimantis paladines* három egymáshoz közel található lelőhelyről ismert: a Podocarpus Nemzeti Park Cerro Toledo szektorából, ettől 10 km-re délre, a Podocarpus Nemzeti Park közepén található Reserva Tapichalaca közeléből, és ettől további 5 km-re délre a Reserva Tapichalaca területéről (60. ábra). A példányokat 2800- és 3100 m tengerszint feletti magassági régióban találtuk a szubpáramo ökoszisztémában (Homeier és mtsai. 2008).

Természetráajz. – Gyakori és lokálisan nagy számban előforduló faj. Valamennyi példányt éjszaka, mohával borított ágakon, leveleken, vagy az út mellett lévő, mohával borított falakon ülve, néha patakok közelében, a talajszinttől 1.5 m magasságig, bokros élőhelyeken találtuk. Egyetlen egyedtet sem láttunk a broméliák szárában. A hím példányok hívóhangját nem hallottunk. A szimpatikus békafajok közé tartoznak a *Pristimantis aff. andinognomus*, *P. atratus* (Lynch 1979) *P. versicolor*, valamint három leíratlan *Pristimantis*-faj.

Természetvédelmi státusz. – A *Pristimantis paladines* gyakori és lokálisan nagy számban előforduló faj amelyet csak három lelőhelyről ismerünk, kevesebb mint 20 km² területről. Mindhárom lelőhely országosan védett vagy védett magánterületen belül található és az élőhelyei jelenleg nem veszélyeztetettek. Mégis javasoljuk a faj Közel Veszélyeztetett (Near Threatened) IUCN kategóriába sorolását, a nagyon kicsi elterjedési területe (EOO) miatt.

***Pristimantis numbala* sp. nov. Székely, Székely, Armijos-Ojeda, Hualpa-Vega és Vörös**
(65. ábra és Székely és mtsai. 2023, 16-18 ábra)

Angol neve: Numbala Rain Frog

Spanyol neve: Cutín de Numbala

Etimológia. – A *numbala* név egy toldalékos főnév. A faj a Reserva Numbala után kapta a nevét, amely egy a Naturaleza y Cultura Internacional civil szervezet által kezelt fontos védett magánterület. A rezervátumot 2006-ban alapították, azzal a fő céllal, hogy megőrizték két túlevelő fafaj (*Retrophyllum rospigliosii* és *Prumnopitys harmsiana*, Podocarpaceae) által alkotott utolsó erdőmaradványát. A rezervátum 1800 hektár szubpáramo és hegyi esőerdőnek ad otthont és fontos élőhelye számos madár, kételtű, emlős és növényfajnak.



65. ábra. *Pristimantis numbala* adult nőtény élő példánya (MUTPL 1190, SVL = 22.3 mm) Reserva Numbala, Zamora Chinchipe Provincia, 2875 m; A: dorzolaterális nézet; (B) ventrális nézet; (C) dorzális nézet.

Holotípus. – MUTPL 1190 (terepi gyűjtőkódja SC 1284; 65. ábra és Székely és mtsai. 2023, 16-17 ábra), adult nőtény Ecuadorból, Zamora Chinchipe Provincia, Reserva Numbala (4.4065°S, 79.0885°W), 2875 m, gyűjtő: Hualpa-Vega S., Székely P. és Székely D., 2021 szeptember 3-án.

Paratípusok leírását lásd Székely és mtsai. 2023, 60. oldal.

Diagnózis. – Filogenetikai bizonyítékok és általános morfológiai jegyek alapján az új fajt a *Pristimantis* nemzetségbe soroltuk. A *Pristimantis numbala* egy közepes méretű faj (a *P. orestes* fajcsoport tagja; Székely és mtsai. 2023, 1. táblázat), a következő jellegzetességekkel: (1) a hát szemölcsös, elszórva szemölcsökkel tarkítva (élő példányon a bőr szemölcsözött szerkezetét jobban észrevehetjük), a bőr a hasoldalon márványozott, korong alakú redő jelen van, dorzolaterális redők hiányoznak, lágyék elülső részén hosszirányú oldalsó redők láthatóak; alacsony hátközépi redő kiemelkedik (élő példányokon jobban látható); (2) a tympanum hártálya és gyűrűje hiányoznak, szupratympanikus redő jelen van; (3) orrcsúcs felülről és oldalról lekerekített; canthus rostralis (szem és orr közötti szög) felülről nézve homorú, profilban lekerekített; (4) a felső szemhéjon 1 nagyobb és több kisebb szemölcs látható (ez élő példányokon jobban látszik), szélessége az IOD 83%-a nőstényeknél; a fejtetőn lévő „tarajok” hiányoznak; (5) a vomerin fogak nyúlványai áttetszőek, oválisak, közepén réssel elválasztva, ami ugyanakkora vagy kisebb, mint a nyúlványok szélessége, mindegyik nyúlvány 4-6 fogat hordoz; (6) hanghólyag, hangrések és hüvelykvánkosok pozíciója nem ismert; (7) az I. ujj rövidebb, mint a II. ujj; az ujjakon lévő tapadókorongok szélesek, körkörös barázdák tarkítják; (8) a korongok oldala rojtosított, ízület alatti (subarticular) gumók jelen vannak, ujjak alatti (supernumerary) gumók jelen vannak; a tenyérgumó (palmar) nem osztott, vagy csak részben osztott egy nagyobb (belső) és egy kisebb (külső) gumóra; hüvelykujj alsó gumó (thenar) ellipszis alakú, nagyobb, mint a belső tenyérgumó; (9) ulnaris gumók jelen vannak (élő példányokon jobban látszik); (10) sarok nagy gumó nélkül vagy egy nagy és több kisebb

gumóval (élő példányon jobban látható); a lábtő külső széle gumósor nélkül vagy egy sor kisebb gumóval; belső tarsalis redő jelen van; (11) a belső lábközépcsont gumója ovális, körülbelül 2-3-szor akkora, mint a lábközépcsontgumó; (12) a lábujjakon széles oldalsó szegélyek; úszóhártya bazális elhelyezkedésű, az V. lábujj jóval hosszabb, mint a III. lábujj; a lábujjakon lévő korongok szélesek, nagyjából akkorák, mint az ujjakon; a körkörös barázdák jelen vannak; (13) élő példányokon a hátoldal vörösesbarna, sötétbarna sávokkal vagy X alakú foltokkal; lágyékrész szürke, rózsaszínesszürke vagy zöld, széles, keresztirányú sávokkal; a combok dorzális felszínén és a végtagok nem látható részein vörösesbarna; a fejen széles, sötét szemek közötti sávok, sötét ajak feletti sávokkal és sötét tympanum alatti csíkokkal; has, nyak és hátsó végtag ventrális felületein rózsaszínes fehér vagy rózsaszínes szürke fekete foltokkal; szivárványhártya bronzszínű, vékony fekete hálózattal, közepén egy széles, vízszintes, sötét csíkkal; (14) testhossz 20,4-23,2 mm adult nőstényeknél ($21,9 \pm 1,43$ n = 5); és 16,7–18,3 mm adult hímeknél ($17,4 \pm 0,73$, n = 3). hímek SVL hossza ismeretlen.

Összehasonlítás más fajokkal: lásd Székely és mtsai. 2023., 60-62. oldal.

Holotípus leírása: lásd Székely és mtsai. 2023., 62-63. oldal.

Változatosság. – A morfometriai változatosságot a Székely és mtsai. 2023, 4. táblázat foglalja össze. A paratípusok egyikének sem volt olyan mértékben vörösesbarna a háti színezete, mint a holotípusnak. Továbbá, a paratípusok hátán, combján és a végtagok dorzális felszínén a sötétbarna foltok kifejezettebbek, mint a holotípus esetében. A MUTPL 1178 paratípus volt az egyetlen, amelyiknek az orrcsúca nem volt sárgásfehér (Székely és mtsai. 2023, 18A, D ábrák)

Hívóhang. – Ismeretlen.

Elterjedés. – A *Pristimantis numbala* csak a Reserva Numbala területéről és környékéről ismert (60. ábra). Az összes példányt 2860-2880 m tengerszint feletti magasságban találtuk, szubpáramo ökoszisztémában (Homeier és mtsai. 2008).

Természetrajz. – Nem gyakori faj. Jóllehet, megállapításunkat csupán négy gyűjtőexpedícióra tudjuk alapozni, amiből csak egy alkalommal sikerült megtalálni a faj egyedét. Ezen alkalmak során csak néhány példányt találtunk, amelyek közül mind nőstény volt. Mindegyik példányt éjszaka találtuk, mohával benőtt ágakon vagy leveleken, talajszinttől 1 m magasságig, bokros vegetációban. Bromélia szárában egy példányt sem láttunk. Szimpatikus elterjedésű fajok a *Pristimantis andinognomus*, *P. atratus*, *P. cryptomelas* (Lynch 1979), *P. versicolor*, és két leíratlan *Pristimantis*-faj.

Természetvédelmi státusz. – A *Pristimantis numbala* csak egyetlen lelőhelyről ismert, egy nagyjából 300 km² területről. Mivel nincs elég információnk a faj basorolásához, a *P. numbala*-t adathiányos fajnak tekintjük az IUCN kritériumok alapján.

Diszkusszió

A *Pristimantis orestes* fajsoport áttekintése

A három új faj leírásával a *P. orestes* fajsoportba tartozó fajok száma 17-re emelkedett, és további négy faj vár leírásra (61. ábra). Brito és munkatársai (2017a) továbbá morfológiai hasonlóságokat azonosítottak a *P. muranunka* és a *P. proserpens* (Lynch 1979), a *P. paquishae* Brito és mtsai. 2014, valamint a *P. tinajillas* Urgilés és mtsai. 2014 között. Morfológiájuk alapján ezek a fajok is ebbe a csoportba tartozhatnak; mivel azonban a *P. orestes* csoportra vonatkozóan nem ismertek megbízható szünapomorf bélyegek, további munkára van szükség a filogenetikai viszonyaik tisztázásához és a csoporthoz való tartozásuk bizonyítására. Mindazonáltal még legalább 15 faj került szem elé terepi vizsgálataink során, amelyekről nincs formális leírás, de a *P. orestes* csoportba tartozhatnak. Az elmúlt hat év során közzétett

munkáknak köszönhetően tisztább képet kaptunk a *P. orestes* fajcsoport közép- és dél-ecuadori fajösszetételéről, amely csoport jelenleg ismert fajainak mindegyike az Andok hegyi erdeiben, a szubpáramo és a páramo biomokban élnek.

A perui fajok filogenetikai hovatartozása bizonytalan, mivel molekulárisan még egyetlen fajról sem igazolták, hogy a csoportba tartozik. Az eredetileg (Duellman & Lehr 2009, Hedges és mtsai. 2008) a csoportba felvett 11 perui faj (*P. atrabracus* (Duellman & Pramuk 1999), *P. chimu* Lehr 2007, *P. cordovae* (Lehr & Duellman 2007), *P. corrugatus* (Duellman és mtsai. 2006), *P. melanogaster*, *P. pataikos* (Duellman & Pramuk 1999), *P. pinguis* (Duellman & Pramuk 1999), *P. seorsus* Lehr 2007, *P. simonsii*, *P. stictoboubonus* (Duellman és mtsai. 2006) és *P. ventriguttatus* (Lehr & Köhler 2007) közül csak kettő (*P. melanogaster* és *P. simonsii*) esetében állt rendelkezésre DNS-szekvencia; elemzésük után ezeket a fajokat ki is kellett venni a csoportból. 2012-ben két további fajt vettek fel a csoportba (*P. mariaelenae* Venegas és Duellman 2012 és *P. stipa* Venegas & Duellman 2012), de ezekhez is hiányoznak a molekuláris adatok. A csoportba sorolható fajok jelenléte bizonyított Peru északi részén, az ecuadori határ közelében. Az onnan származó, *P. colodactylus*-ként azonosított példányok (Lehr & Duellman 2007, Lynch 1979) valószínűleg közelrokon, leíratlan fajok, mivel a *P. colodactylus* a jóval északabbra fekvő Abra de Zamorában endemikus (Székely és mtsai. 2020). A *P. muranunka* is jelen lehet Peruban, mivel e faj ismert populációi nagyon közel találhatóak a perui határhoz.

Mikroélőhely-testalkat kapcsolat

Eredményeink azt mutatják, hogy a *P. orestes* és a *P. simonbolivari* alcsoportok arboreális fajai jellegzetes testalkattal rendelkeznek; rövid orr, robusztus test, viszonylag keskeny fej, arányosan rövid végtagok, keskeny és lekerekített tapadókorongok jellemzik őket, ahogy azt Lynch és Duellman (1997) a *P. orestes* csoport eredeti leírásában rögzítette (Székely és mtsai. 2023, 1. ábra). Ezzel szemben a *P. colodactylus* alcsoportba tartozó bromélia-specialista fajok - *P. colodactylus*, *P. muranunka* és *P. matildae* (Székely és mtsai. 2023, 1G-I ábrák) - feltűnően eltérő testalkattal rendelkeznek (Székely és mtsai. 2020). Hosszabb orr, karcsú test és laposabb fej (14. táblázat, Székely és mtsai. 2023, 2. táblázat, 61. ábra, Székely és mtsai. 2023, 4., 5. ábrák) jellemzi őket. Ebből arra következtetünk, hogy a *colodactylus*-testalkat eltérése a tipikus *orestes*-testalkattól a különböző mikrohabitathoz kötődő életmódnak köszönhető, és hogy ezek a testalkat-jellegzetességek valószínűleg a broméliák egymást fedő levelei közötti élethez való alkalmazkodás eredményei. Másrészt az *orestes* és *simonbolivari* alcsoportokat jellemző robusztus, rövid lábú testalkat pedig a moharéteghez és lágyszárú növényzethez való alkalmazkodás eredménye lehet (Lehr és mtsai. 2017).

Bár filogenetikailag szoros rokonságban állnak, az itt leírt három új arboreális faj morfológiailag eltér a bromélia-specialista testvérfajoktól. Kevésbé lapos fejjel és testtel rendelkeznek, és a combokon, az ágyék részen és a rejtett végtagfelületeken egyértelmű mintázatot mutatnak (Székely és mtsai. 2023, 2. táblázat, 1. ábra). Továbbá, az új fajok úgy tűnik, hogy a *P. orestes* és a *P. simonbolivari* alcsoport valamennyi fajtától is különböznek, főként a hosszabb orruk (ez a tulajdonságuk közös a bromélia-specialista testvérfajokkal), a hosszabb ujjak és lábujjak révén (Székely és mtsai. 2023, 2. táblázat) testalkatuk valahol a két csoport közötti átmenetet mutat (Székely és mtsai. 2023, 1. ábra).

Kriptikus változatosság Dél-Ecuadorban

Az IUCN Red List 2021-es értékelésének (Ortega-Andrade és mtsai. 2021) eredményei alapján az ecuadori kétéltűfajok 57%-a (363 faj a 635 vizsgált fajból) veszélyeztetett, amelynek fő okai az élőhelyvesztés, a mezőgazdasági/állattenyésztési területek terjeszkedése és további antropogén veszélyek (pl. utak, emberi települések, bányászati/olajipari tevékenységek), valamint az éghajlatváltozással és a hirtelen felbukkanó betegségekkel való lehetséges szinergikus hatások. A legtöbb veszélyeztetett faj az andoki hegyi erdők és a páramo ökoszisztémákban található, amelyek közel 10%-a védett területeken kívül helyezkedik el. Az értékelés szerzői kiemelték, hogy a hiányos taxonómiai lehatárolások, különösen az olyan nagy

fajgazdagságú országokban, mint Ecuador, komoly negatív hatással lehetnek a kétéltűek védelmére. A széles elterjedésű fajkomplexumok, amelyeket gyakran a legkevésbé veszélyeztetett (Least Concern) kategóriába sorolnak, kriptikus taxonokból állhatnak, így természetvédelmi szempontból különösen veszélyeztetettek (Ortega-Andrade és mtsai. 2021). Ebben az összefüggésben kiemelten fontosak a taxonómiai kutatások, különösen a kriptikus fajok azonosítása.

Az Andok magasan fekvő régióiban a viszonylag alacsony kétéltű-fajgazdagság ellenére magas az endemizmusok száma (Bernal & Lynch 2008, Garcia-R és mtsai. 2014, Guarnizo és mtsai. 2015, Mendoza és mtsai. 2015). A *Pristimantis*-fajok körében tapasztalható magas diverzifikációs ráta fő okai lehetnek az alacsony diszperziós képesség, a mikrohabitatokhoz való magas fokú specializáltság, és ökológiai lehetőségek más filogenetikai vonalak hiányában (Hutter és mtsai. 2017, Mendoza és mtsai. 2015). Jó példák erre a jelen tanulmányban vizsgált területek, ahol legalább 9 faj és 4 potenciálisan új faj él, ha csak a néhány lelőhelyről vett mintát vesszük figyelembe egy olyan hegységből, amely kevesebb, mint 50 km hosszban terül el (Abra de Zamora-tól Reserva Tapichalaca-ig) és 2700-3300 m közötti tengerszint feletti magasságban található. Az itt élő kétéltűfajok előfordulása sajátos mintázatot mutat (60. ábra). Ez a hegység a Podocarpus Nemzeti Park nyugati határát jelöli, és örökzöld trópusi hegyi erdők (általában 2100 és 2700 m közötti magasságban), valamint szubpáramói vagy örökzöld törpefenyőerdők (a hegygerincen, 2700 és 3700 m között; Homeier és mtsai. 2008) alkotják. A hegygerinc magassága 2700 és 3700 m között ingadozik, átlagosan 3200 m körül, de a legmagasabb pontja a Lagunas del Compadre néven ismert, mintegy 50 gleccsertóból álló komplexum környékén található. Így több esetben azt láthatjuk, hogy az Abra de Zamora/Cajanuma területén előforduló fajokat morfológiailag és ökológiailag hasonló, de genetikailag eltérő fajok váltják fel a nemzeti park magasabban fekvő, Cerro Toledo szektorában. Ezt láthatjuk például a *Pristimantis andinogigas* Yáñez-Muñoz és mtsai. 2019, a *P. sagedunneae* és a *Lynchius flavomaculatus* (Parker 1938) esetében Abra/ Cajanuma területéről, amelyeket a *P. chomskyi* Páez & Ron 2019, a *P. paladines* és egy le nem írt *Lynchius* faj (Székely és mtsai. 2020) vált fel a Cerro Toledo területén. Előzetes eredményeink alapján hasonló a helyzet a *Pristimantis* több leíratlan faja esetében is (közülük három a *P. orestes* fajcsoportból), és a *P. andinognomus* és a *P. versicolor* esetében is átfogó revízióra lenne szükség (Székely és mtsai. 2020). Ezekben az esetekben a genetikai távolság 2-3% között változik, ami alacsonyabb, mint a kétéltűfajok elkülönítésére javasolt konzervatív 3%-os genetikai távolsági küszöbérték (Fouquet és mtsai. 2007, Vieites és mtsai. 2009). Az utóbbi évek intenzív kutatásai megerősítik azonban, hogy ez egy túlságosan óvatos határérték (Caminer & Ron 2014, Guayasamin és mtsai. 2019), különösen az olyan fiatal evolúciós vonalak esetében, mint a *Pristimantis* (Garcia-R és mtsai. 2014, Ortega-Andrade és mtsai. 2015, Páez és Ron 2019). Ráadásul az andoki *Pristimantis*-fajok közismerten kis elterjedésűek, így a néhány, nagy elterjedésűnek vélt faj a fajhatárok helytelen meghúzása miatt még feltáratlan változatosságot rejthet (Páez és Ron 2019, Székely és mtsai. 2020, Urgilés és mtsai. 2019, Zumel és mtsai. 2022).

Más fajok, köztük az általunk újonnan leírt fajok nem feltétlenül követik ezt a mintázatot. Például a *P. vidua* elterjedésének déli határát Abra de Zamora/ Cajanuma térségében éri el, míg pl. a *P. balionotus*, *P. cajanuma*, *P. colodactylus* vagy *P. percultus* fajok egyelőre csak egy viszonylag kis területről ismertek ugyan ebből a térségből (Székely és mtsai. 2020). A *P. numbala* genetikailag távolabb áll a közeli Cerro Toledo területén élő *P. paladines* fajtól, mint a *P. paladines* a távolabbi előfordulású északi testvérfajától, a *P. sagedunneae*-től (60. ábra). Nagy valószínűséggel a *P. numbala* ismert populációja a Reserva Numbalában a faj elterjedésének északnyugati határát képviseli, majd nem elérve a *P. paladines* elterjedésének határát. Mivel azonban a Podocarpus Nemzeti Park középső régiójából nincsenek adataink (főként mert a terület nehezen megközelíthető), nem áll rendelkezésünkre olyan információ, amely alátámasztaná ezt a hipotézist. A jövőben szükséges lenne tehát további adatokat gyűjteni főként a Cajanuma és a Cerro Toledo között fekvő és a nemzeti park távolabbi területeiről, hogy megértsük a kétéltűek elterjedési mintázatát a biológiai sokféleség ezen forró pontján.

6. Összegzés

Új eredmények

A dolgozatomban bemutatott kutatások a következő eredményekkel járultak hozzá a kétéltűek morfológiai és genetikai változatosságának leírásához, evolúciós történetük rekonstruálásához: Az **2.1 fejezetben** két síkvidéki farkos kétéltűfaj esetében mutattuk ki, hogy Közép-Európa folyói fontos szerepet játszottak a jelenlegi elterjedés és genetikai struktúra kialakulásában. A dunai tarajosgöte (*Triturus dobrogicus*) esetében a folyók terjedési folyosók lehettek a kárpát-medencei populációk utolsó pleisztocén eljegesedés (LGM) utáni visszaterjedésben. Mitokondriális és nukleáris DNS-fragmentek használatával két refúgiumterületet azonosítottunk a Kárpát-medence északnyugati és délnyugati részén. Elterjedési-modellezéssel összehasonlítottuk a dunai tarajosgötét a hasonló elterjedésű vöröshasú unkával (*Bombina bombina*) és azt találtuk, hogy a két faj különböző biogeográfiai mintázata az LGM alatt használt refúgiumterületek eltérő földrajzi helyzete miatt alakulhatott ki. A dunai tarajosgötével ellentétben a pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*) esetében a nagy folyók, főként a Tisza, akadályt jelenthetnek a populációk terjedéséhez. Genomszintű vizsgálatokat alkalmazva megállapítottuk, hogy a törzsalak északi genetikai vonala mellett a *L. v. ampelensis* is jelen van a Kárpát-medencében. Az alfaj elterjedésének behatárolása mellett a két alfaj között jelentős génáramlást találtunk, és egy nagyjából 400 km hosszú kontaktzóna meglétét tártuk fel. Adatainkból valószínűsíthető, hogy a *L. vulgaris* fajnak egy vagy két refúgiumterülete is lehetett a Kárpát-medencében.

Az **2.2 fejezetben** két hegyvidéki életmódú farkos kétéltű poszt-glaciális evolúciós történetét írtuk le a Kárpát-medencében, amelyek hasonló mintázatot mutattak. Mind az alpesi götét (*Ichthyosaura alpestris*), mind pedig a foltos szalamandrát (*Salamandra salamandra*) keletnyugati genetikai szétválás jellemezte, ami kárpáti és alpi eredetet jelez. Mindkét faj esetében a Bihar-hegységből származó állomány egy különálló genetikai egységet alkotott. Az alpesi götte mitokondriális génszakaszainak vizsgálata azt mutatta, hogy a Bakonyban és az Őrségben élő állományok jó ideje önállóan fejlődtek és nagy valószínűséggel a Kárpát-medence északnyugati részén lehetett az LGM alatti refúgiumterületük. Az általunk feltárt genetikai elkülönülés, és a korábban publikált morfológiai adatok alapján szabályos leírást adtunk az *Ichthyosaura alpestris bakonyiensis* Vörös, 2022 alfajról, amelyet Dely Olivér György 1964-ben a bakonyi alpesi göteállományok csonttani vizsgálatára alapozva nem a Zoológiai Nevezéktan Nemzetközi Kódexe (ICZN) által meghatározott módon közölt. Mikroszatellitálókuszokat elemezve a foltos szalamandra északi-középhegységi állományaiban jelentős strukturáltságot figyeltünk meg, amely szerint a Visegrádi-hegység és a Budai-hegység, valamint az Északi-középhegység déli perempopulációi elkülönültek a többi populációtól. Ezen perempopulációk fragmentációja eredményeink alapján időben az LGM végére tehető, ami megegyezik a Würm/Weichsel-jégkorszakok viszonylag enyhe interstadiális időszakával, bizonyítékkul szolgálva a *S. salamandra* eljegesedés alatti túlélésére a Kárpátok mérsékelt égövi erdeiben.

A **3.1 fejezetben** kifejlesztettük a barlangi vakgöte (*Proteus anguinus*) környezeti DNS-alapú kimutatását barlangi vizekből. Két mintavételi módszert (szűrés és kicsapás) teszteltünk, és megállapítottuk, hogy ezt a fajt a szűrés módszerrel hatékonyabban lehet kimutatni. A szűrés mintavétellel és a rövid, mitokondriális-génfragment felszaporításán és detektálásán alapuló reakcióval megerősítettük a *P. anguinus* jelenlétét tíz horvátországi barlangból, öt másikban pedig először mutattuk ki a fajt.

A **3.2 fejezetben** 10 fajspecifikus mikroszatellita-markert fejlesztettünk a barlangi vakgöte populációgenetikai vizsgálatához. Ezen markerek használatával négy *P. anguinus* populációt elemeztünk Horvátországban, amelyek három egymástól elszigetelt hidrogeográfiai régióknak megfelelően három genetikai csoportba rendeződtek. A populációkon belül alacsony volt a genetikai változatosság, viszont az összes vizsgált populációban alacsonynak bizonyult a rokonsági kapcsolatok aránya is. Ez az ellentmondás és a további elemzéseink is azt sugallják,

hogy a barlangi vízrendszereken belül génáramlás állhat fenn, és mivel felméréseink csak a barlang ismert szakaszaira vonatkoznak, alábecsülhetjük a teljes populáció méretét.

A **3.3 fejezetben** egy nem-invázív, víz alatti, in situ mintavételi módszert mutattunk be a *P. anguinus* mintázására. A két előző alfejezetben leírt eDNS-alapú és mikroszatellita-marker-alapú elemzésekre támaszkodva bizonyítottuk, hogy ez a víz alatti mintavétel elegendő DNS-mennyiséget szolgáltatott az elemzésekhez, és kimutattuk a vizsgált hercegovinai populáció genetikai változatosságának hiányát.

A **4.1 fejezetben** két levelibékafaj, a *Litoria aurea* és *L. raniformis* Ausztráliából Új-Zélandra telepítésének történetét tártuk fel. Mitokondriális DNS-fragment elemzésén alapulva megállapítottuk, hogy a *L. aurea* fajt nagy valószínűséggel Új-Dél-Walesből telepítették át Új-Zéland Északi-szigetére, két külön betelepítés során: Új-Dél-Wales északi részéről Northlandbe, és egy Új-Dél-Wales déli részéről a Coromandel-félszigetre - Waikato régióba. A *L. raniformis* faj pedig Victoria Állam déli részéről (Melbourne környékéről) került be Új-Zéland Déli-szigetére, Új-Zélandon azután emberi segítséggel terjedt szét és telepedett meg mindkét fő szigeten. A mitokondriális DNS elemzése a *L. raniformis* fajon belül két divergens genetikai vonal létezését tárta fel Ausztráliában, ami rávilágított a fajon belüli kriptikus változatosságra.

A **4.2 fejezetben** multilokus, arche-DNS, genomikai, bioakusztikus és morfológiai adatok együttes vizsgálatával jártunk utána, hogy a korábban talált genetikai divergencia milyen mértékben befolyásolja a faj szisztematikáját. A teljes ausztráliai elterjedést lefedő mintavételen alapuló kutatás megerősítette az északi és déli, kriptikus evolúciós vonalak szétválását, amelyek csak genetikai vizsgálatok útján azonosíthatóak megbízhatóan. Mivel két régióban is találtunk hibrid egyedeket, a két vonal alfaji besorolást kapott. Neotípusok kijelölésével újra leírtuk a *Litoria raniformis raniformis* (északi evolúciós vonal) törzsalakot és a *L. raniformis major* (déli evolúciós vonal) alfajt. Azt is megállapítottuk, hogy a *L. castanea* újra felfedezett állományai genetikailag és bioakusztikai jellemzők alapján a törzsalak állományába ágyazódnak be.

Az **5.1 fejezetben** Brazília északkeleti partvidékén az atlanti esőerdő egy kis erdőfoltjában találtuk meg és morfológiai és bioakusztikai paraméterek alapján írtuk le a *Phyllodytes amadoi* levelibékafajt. A kis testméret (a nemzetségen belül a legkisebb faj) és a hívóhang magas domináns frekvenciája miatt a faj könnyen megkülönböztethető a többi *Phyllodytes*-fajtól. A *P. amadoi* talajon vagy a fatörzsön növő kis méretű broméliákban él. Innen került elő a faj ebihala is, aminek szintén közöltük a leírását. A *P. amadoi* előfordulása jelenleg csak a típuslelőhelyről ismert.

Végül, az **5.2 fejezetben** négy *Pristimantis*-fajt írtunk le Ecuador trópusi Andok régiójából. Az **5.2.1. fejezet** a *Pristimantis lojanus* leírását a rokonfajokhoz viszonyított nagy genetikai távolságok, a hívóhang és a morfológiai különbségek alapján ismerteti. A fajt Loja városban és környékén azonosítottuk, és a *P. phoxocephalus* fajcsoportba tartozik. A *P. lojanus* mindössze 25 lelőhelyről ismert, összesen nagyjából egy 400 km² területről, ismert élőhelyein gyakorinak számít. Az **5.2.2. fejezetben** pedig három új, kriptikus *Pristimantis*-fajt írtunk le, amelyeket a *Pristimantis orestes* fajcsoporthoz soroltunk. A *Pristimantis sagedunneae* egy közepes méretű, ritka, vagy nehezen észlelhető faj, csak Abra de Zamorából, és attól nagyjából 13 km-re délre, a Podocarpus Nemzeti Park Cajanuma szektorából, nagyjából 10 km² területről ismert. A *Pristimantis paladines* egy kis méretű, gyakori és lokálisan nagy számban előforduló faj. Csupán három egymáshoz közel található lelőhelyről került elő: a Podocarpus Nemzeti Park Cerro Toledo szektorából, ettől 10 km-re délre, a Podocarpus Nemzeti Park közepén található Reserva Tapichalaca közeléből, és ettől további 5 km-re délre a Reserva Tapichalaca területéről, kevesebb mint 20 km² területről. A *Pristimantis numbala* egy nagy méretű, nem gyakori faj, ami csak a Reserva Numbala területéről és környékén találtuk meg, egy nagyjából 300 km² területről. Mindhárom faj fán lakó életmódot folytat és ennek megfelelően morfológiájuk eltér a bromélia-specialista testvérfajoktól. Kevésbé lapos fejjel és testtel rendelkeznek, és a combokon, az ágyék részen és a rejtett végtagfelületeken egyértelmű mintázatot mutatnak.

Konklúziók

A Kárpát-medence farkos kétéltűinek evolúciós történetében fontos szerepet játszottak Közép-Európa nagy folyói (Duna, Tisza, Száva, Dráva), amelyek vagy terjedési folyosóként vagy földrajzi akadályként alakították a populációk földrajzi és genetikai mintázatát. A jelenlegi elterjedés kialakulásában azonban a legfontosabb tényező az LGM alatti refúgium-területek földrajzi helyzete lehetett, ahonnan a fajok vissza tudtak terjedni a számunkra kedvező területekre. Ugyan részletesen bemutattuk a négy farkos kétéltűfaj filogeográfiai és populációgenetikai mintázatát, az újgenerációs és teljes genomszekvenálások adta lehetőségek tükrében érdemes lenne tovább elemezni kárpát-medencei populációikat.

Az általunk fejlesztett módszerek – környezeti DNS-alapú kimutatás, mikroszatellita-markerek és nem-invázív in situ mintázás – fontos eszközöket adtak a barlangi vakgöte (*Proteus anguinus*) kíméletes és részletes vizsgálatához. Ennek a sokmillió éve önállóan fejlődő faj különböző barlangrendszerekben élő állományainak genetikai távolsága, valamint az egyes állományok alacsony genetikai változatossága (vagy annak teljes hiánya) még további vizsgálatokat tesz indokolttá. Itt is fontos lépés lehet a genomszintű vagy teljes genomvizsgálat, amelyek segíthetnek ezen különleges mintázatok megértésében.

Ausztrália és Dél-Amerika kétéltűek tekintetében a legfajgazdagabb kontinensek közé tartoznak. Jóllehet Ausztrália sűrűn lakott területeiről ismeretlen fajok felfedezése már nem nagyon várható, genetikai/genomikai vizsgálatokkal kriptikus változatosság még feltárható, ahogyan azt a két *Litoria*-faj esete is mutatja. Mivel a kétéltűfajok nagy részének állományai csökkenőben vagy eltűnőben vannak, természetvédelmi szempontból kiemelt jelentősége van az ilyen jellegű munkáknak.

Dél-Amerika számos olyan régiót rejt, ahol még részben vagy teljesen feltáratlan a biodiverzitás. Ilyenek például az Atlanti-esőerdő megmaradt foltjai vagy Ecuador trópusi Andok régiója, ahol még sok számunkra ismeretlen, kis elterjedésű, ezáltal sérülékeny faj él. A *Phyllodytes amadoi*, vagy a négy *Pristimantis*-faj felfedezése hozzájárult a hatalmas fajgazdagság leírásához, ez pedig segítséget nyújthat a természetes élőhelyek védelméért folytatott harcban.

7. Az értekezés témaköréből készült közlemények

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Herczeg D, Palomar G, Zieliński P, Babik W, Dankovics R, Halpern B, Cvijanović M, **Vörös J** (2023): Genomic analysis reveals complex population structure within the smooth newt, *Lissotriton vulgaris* in Central Europe. **Ecology and Evolution** 13(9): e10478. <https://doi.org/10.1002/ece3.10478>
2. Székely P, Székely D, Armijos-Ojeda D, Hualpa-Vega S, **Vörös J** (2023): Molecular and morphological assessment of rain frogs in the *Pristimantis orestes* species group (Amphibia: Anura: Strabomantidae) with the description of three new cryptic species from Southern Ecuador. **Herpetological Monographs** 37: 41-69. <https://doi.org/10.1655/HERPMONOGRAPHS-D-22-00002>
3. **Vörös J**, Wassens S, Price L, Hunter D, Myers S, Armstrong K, Mahony MJ, Donnellan S (2023): Molecular systematic analysis demonstrates that the threatened southern bell frog, *Litoria raniformis* (Anura: Pelodyadidae) of eastern Australia, comprises two subspecies. **Zootaxa** 5228(1): 001-043. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5228.1.1>
4. **Vörös J** (2022): Nomenclatural validation of *Ichthyosaura alpestris bakonyiensis* subsp. n. (Amphibia: Salamandridae) from Western Hungary. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae** 68(4): 393-394. <https://doi.org/10.17109/AZH.68.4.393.2022>
5. **Vörös J**, Dias IR, Bolaños W, Solé M (2022): Description of the tadpole of *Phyllodytes amadoi* (Anura: Hylidae) from its type locality in Bahia, Brazil. **Salamandra** 58(1): 71-75.
6. Székely P, Székely D, Ordóñez-Delgado L, Armijos-Ojeda D, **Vörös J** (2021): Our unknown neighbor: a new species of rain frog of the genus *Pristimantis* (Amphibia: Anura: Strabomantidae) from the city of Loja, southern Ecuador. **PLoS ONE** 16(10): e0258454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258454>
7. **Vörös J**, Varga Z, Martínez-Solano I, Szabó K (2021): Mitochondrial DNA diversity of the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*) in the Carpathian Basin: evidence for multiple cryptic lineages associated with Pleistocene refugia. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae** 67(2), 177–197. <https://doi.org/10.17109/AZH.67.2.177.2021>
8. Balázs G, **Vörös J**, Lewarne B, Herczeg G (2020): A new non-invasive in situ underwater DNA sampling method reveals extremely low genetic diversity in a Herzegovinian olm (*Proteus anguinus*) population. **Evolutionary Ecology** 34: 633–644. <https://doi.org/10.1007/s10682-020-10053-1>
9. **Vörös J**, Ursenbacher S, Jelić D (2019): Population genetic analyses using 10 new polymorphic microsatellite loci confirms genetic subdivision within the olm, *Proteus anguinus*. **Journal of Heredity** 110(2), 211–218. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy060>
10. **Vörös J**, Dias I, Solé M (2017): A new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. **Zootaxa** 4337(4): 584–594. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4337.4.8>
11. **Vörös J**, Márton O, Schmidt B, Gál JT, Jelic D (2017): Surveying Europe's only cave-dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA. **PLoS ONE** 12(1): e0170945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170945>
12. **Vörös J**, Ursenbacher S, Kiss I, Jelic D, Schweiger S, Szabó K (2016): Increased genetic structuring of isolated *Salamandra salamandra* populations (Caudata: Salamandridae) at the margins of the Carpathian Mountains. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 55(2): 138–149. <https://doi.org/10.1111/jzs.12157>
13. **Vörös J**, Mikulíček P, Major Á, Recuero E, Arntzen JW (2016): Phylogeographic analysis reveals northerly refugia for the riverine amphibian *Triturus dobrogicus* (Caudata: Salamandridae). **Biological Journal of the Linnean Society** 119(4): 974–991. <https://doi.org/10.1111/bij.12866>

14. **Vörös J**, Mitchell A, Waldman B, Goldstien S, Gemmell NJ (2008): Crossing the Tasman Sea: inferring the introduction history of *Litoria aurea* and *L. raniformis* (Anura: Hylidae) from Australia into New Zealand. **Austral Ecology** 33(5): 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2008.01830.x>

7.2. További közlemények a PhD fokozat megszerzése óta

Filogeográfia és populációgenetika, genomika

- Halpern B, **Vörös J**, McCartney AM, Formenti G, Mouton A (2024): The genome sequence of the Hungarian meadow viper, *Vipera ursinii rakosiensis* (Méhely, 1893). **Wellcome Open Research** 404: 9p, <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.22694.2>
- Dufresnes C, Ghielmi S, Halpern B, Martínez-Freiría F, Mebert K, Jelic D, Crnobrnja-Isailovic J, Gippner S, Jablonski D, Joger U, Laddaga L, Petrovan S, Tomovic L, **Vörös J**, Igci N, Karis M, Zinenko O, Ursenbacher S (2024): Phylogenomic insights into the diversity and evolution of Palearctic vipers. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 197: 108095. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108095>
- Vörös J**, Ursenbacher S, Jelic D, Tomovic L, Crnobrnja-Isailovic J, Ajtic R, Sterijovski B, Zinenko O, Ghira I, Strugariu A, Zamfirescu S, Nagy ZT, Péchy T, Krizsik V, Márton O, Halpern B (2022): Well-known species, unexpected results: high genetic diversity in declining *Vipera ursinii* in central, eastern and southeastern Europe. **Amphibia-Reptilia** 43: 407-423. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10116>
- Jablonski D, Sillero N, Oskyrko O, Bellati A, Čeirāns A, Cheylan M, Cogălniceanu D, Crnobrnja-Isailović J, Crochet P-A, Crottini A, Doronin I, Džukić G, Geniez P, Ilgaz C, Iosif R, Jandzik D, Jelić D, Litvinchuk S, Ljubisavljević K, Lymberakis P, Mikulíček P, Mizsei E, Moravec J, Najbar B, Pabijan M, Pupins M, Sourrouille P, Strachinis I, Szabolcs M, Thanou E, Tzoras E, Vergilov V, **Vörös J**, Gvoždík V (2021): The distribution and biogeography of slow worms (Anguis, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones. **Amphibia-Reptilia** 42(4): 519-530. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10069>
- Palomar G, Dudek K, Arntzen JW, Ficetola GF, Jelić D, Jockusch E, Martínez-Solano I, Matsunami M, Migalska M, Shaffer HB, **Vörös J**, Waldman B, Wielstra B, Babik W (2021): Coevolution between MHC class I and Antigen Processing Genes in Salamanders. **Molecular Biology and Evolution** 38(11): 5092-5106. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab237>
- Mahtani-Williams S, Fulton W, Desvars-Larrive A, Lado S, Elbers JP, Halpern B, Herczeg D, Babocsay G, Lauš B, Nagy ZT, Orozco-terWengel P, **Vörös J**, Burger P (2020): Landscape genomics of a widely distributed snake (*Dolichophis caspius*, Gmelin, 1789) across eastern Europe and western Asia. **Genes** 11: 1218. <https://doi.org/10.3390/genes11101218>
- Draškić G, **Vörös J**, Wangkulangkul S, Durakić M (2020): Discordant morphological and genetic pattern in *Leptobrachium hendricksoni* (Anura: Megophryidae) from southern Thailand, revealed by non-parametric ANOVA with Monte Carlo simulations. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology** 42(5): 1035-1045. <https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2020.134>
- Šunje E, Jelić D, **Vörös J**. (2017): Insights into the phylogeny and phylogeography of the frog *Rana graeca* in the Balkan Peninsula (Amphibia: Anura). **Salamandra** 54: 278-282. <https://doi.org/10.56416/salamandra.54.278>
- Draškić G, Wangkulangkul S, **Vörös J**. (2018): The role of geological history in population divergence: strong genetic subdivision in *Leptobrachium hendricksoni* (Anura, Megophryidae) in Peninsular Thailand. **Amphibia-Reptilia** 39: 99-111. <https://doi.org/10.1163/15685381-17000013>

- Palomar G, Vörös J, Bosch J (2017): Tracking the introduction history of *Ichthyosaura alpestris* in a protected area of Central Spain. **Conservation Genetics** 18: 867-876. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0934-x>
- Szabó K, Vörös J (2014): Distribution and hybridization of *Anguis fragilis* and *A. colchica* in Hungary. **Amphibia-Reptilia** 35: 135-140. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002938>
- Vörös J. (2014): Molecular Taxonomy of Amphibians in the Carpathian Basin. **Magyar Tudomány** 175(4): 423-427. <https://doi.org/10.1556/2065.175.2014.4.9>
- Recuero E, Canestrelli D, Vörös J, Szabó K, Poyarkov NA, Arntzen JW, Crnobrnja-Isailovic J, Kidov AA, Cogalniceanu D, Caputo FP, Nascetti G, Martínez-Solano I (2012): Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura: Bufonidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 62: 71-86. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.008>
- Vörös J., Arntzen J.W. (2010): Weak population structuring in the Danube Crested newt, *Triturus dobrogicus*, inferred from allozymes. **Amphibia-Reptilia** 31: 339-346. <https://doi.org/10.1163/156853810791769518>
- Vörös J, Major Á. (2007): Phylogeography and species composition of the two *Bombina* species and the *Triturus cristatus* species complex in the Carpathian Basin. In: Forró L. (ed.) **The origin of the fauna of the Carpathian Basin**, Hungarian Natural History Museum, Budapest, pp. 269-282. <https://doi.org/10.5281/zenodo.45522>

Klasszikus és molekuláris taxonómia

- Speybroeck J, Beukema W, Dufresnes C, Fritz U, Jablonski D, Lymberakis P, Martínez-Solano I, Razzetti E, Vamberger M, Vences M, Vörös J, Crochet PA (2020): Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. **Amphibia-Reptilia** 41(2): 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
- Herczeg D, Vörös J, Christiansen DG, Benovics M, Mikulíček P (2017): Taxonomic composition and ploidy level among European water frogs (Anura: Ranidae: *Pelophylax*) in eastern Hungary. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 55: 129–137. <https://doi.org/10.1111/jzs.12158>
- Wielstra B, Vörös J, Arntzen JW (2016): Is the Danube crested newt *Triturus dobrogicus* polytypic? A review and new nuclear DNA data. **Amphibia-Reptilia** 37: 167–177. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003041>
- Fritz U, Kehlmaier C, Mazuch T, Hofmeyr MD, Du Preez L, Vamberger M & Vörös J (2015): Important new records of *Pelomedusa species* for South Africa and Ethiopia. **Vertebrate Zoology** 63(4): 383–389.
- Plăiașu R, Vörös J, Băncilă R (2012): Fluctuating asymmetry as a tool in identifying population stress in Hungarian populations of *Bombina bombina*, *B. variegata* and their hybrids. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae** 58(4): 361–368. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5735970>
- Buckley D, Molnár V, Németh G, Petneházy Ö, Vörös J (2013): ‘Monster...-omics’: on segmentation, re-segmentation, and vertebrae formation in amphibians and other vertebrates. **Frontiers in Zoology** 10: 17. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-17>
- Hock F, Huszthy Cs, Szövényi G, Vörös J. (2010): Comparative bio-acoustic study of hungarian populations of the yellow bellied toad (*Bombina variegata*). **Állattani Közlemények** 95: 191-206.

8. Köszönetnyilvánítás

Mivel a legtöbb kutatásomat együttműködésben végeztem, nagyon sok embernek lehetek hálás a segítségéért. Megpróbálok felsorolni mindenkit, aki a mintagyűjtésekben, labormunkában, elemzésekben részt vett, vagy értékes beszélgetésekkel hozzájárult a munkámhoz: **Harmos Krisztián**, Balogh Diána, Verebélyi Viktória, Caitlin Gabor, Annika Gabor, Andrea Ashpbury, Elek Ashpbury, Aliczki Manó, Babocsay Gergely, Dan Cogalniceanu, Csaba Zsuzsa, **Dankovics Róbert**, Mario García-París, **Halpern bálint**, Horváth Márton, David Jandzik, **Kiss István**, Kiss János Botond, Kovács Tibor, Máté András, **Merkel Ottó**, **Nédli Judit**, Somai László, Szövényi Gergely, Török Zsolt, Vers József, **Németh Tamás**, Inigo Martínez-Solano, David Buckley, Nick Clemann, Vági Balázs, Tuschek Mária, **Major Ágnes**, Gonzalo Themudo, Ősi Attila, **Szöke Viktória**, Grabant Aranka, Krízsik Virág, **Márton Orsolya**, Pongrácz Ádám, Bérczes Sándor, Peregovits László, Rédey Dávid, **Szabó Krisztián**, **Herczeg Dávid**, Gál Júlia Tünde, Farkas Péter, Szelényi Gábor, Vízkert András, Suri Katalin, Dobay Gergely, Peter Mikulicek, Kym Abrams, Katarina Koller, Petra Kovač Konrad, Vedran Jalžić, Branko Jalžić, Marko Budić, Stjepan Mekinić, Herczeg Gábor, Balázs Gergely, Brian Lewarne, Benedict Schmidt, Geoff Heard, Terry Bertozzi, Kathy Saint, Christina Adler, Hugh Cross, Leanne Wheaton, Ferenc Hock, Michal Sarfati, Mark Feldman, Kelly Lock, Tadeu Teixeira Medeiros, Victor Goyannes Dill Orrico, Andrés Egea, Caio Vinícius de Mira Mendes, Gemma Palomar, Piotr Zieliński, Wiesław Babik, Milena Cvijanović, Paul Székely, Diana Székely, Diego Armijos-Ojeda, Skye Wassens, Luke Price, David Hunter, Kyle Armstrong, Stephen Donnellan, Iuri Dias, Wendy Bolanos, Mirco Solé, Sylvain Ursenbacher, Dusan Jelic, Ernesto Recuero, Anthony Mitchell, Bruce Waldmann, Neil J. Gemmell, Zsebők Sándor, Bókony Veronika, Molnár V. Attila és az MTA Diverzitásbiológiai Bizottsága.

Szeretném kiemelni a néhai Papp László Akadémikust, aki először vetette fel (és aztán még sokszor), hogy érdemes lehetek az MTA Doktori fokozat megszerzésére; Varga Zoltán Professzort, aki meghonosította és azóta is népszerűsíti a filogeográfia tudományát Magyarországon, és akinek nagy szerepe volt abban, hogy én is ebben a témában mélyedtem el; és Báldi András Akadémikust, aki több, mint húsz éve a szakmai támaszom és tanácsadóm. Hálás vagyok korábbi és jelenlegi munkahelyi vezetőimnek, Matskási Istvánnak, Korsós Zoltánnak és Csorba Gábornak (MTM), valamint Vasas Gábornak (HUN-REN BLKI) a türelmükért és támogatásukért.

Munkámat a következő hatósági engedélyekkel végeztem: KJHF-848/3/2005, OKTF-KP/6903-21/2015, 14/3535/2/2010, 14/4605/4/2009, 14/3513/2010, Horvát Környezetvédelmi és Természetvédelmi Minisztérium: UO/I-612-07/11-33/0075, 532-08-01-01/1-11-02; UP/I-612-07/15-48/119, 517-07-1-1-1-15-4, Victorian Wildlife Act 1975 Research Permit 10004794, NSW National Parks and Wildlife Service (Licence A3053) and Charles Sturt University Animal Care and Ethics Committee (Licence 01/034), NSW Office of Environment and Heritage Animal Ethics Committee (Licence 091214/01), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade—ICMBio (13708-2), Ecuadorian Ministry of Environment (MAE-DNB-CM-2015-0016, MAAE-ARSFC-2020-0727 és MAATE-DZ7L-GBVS-046-2021), Ethics Committee of Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL-CBEA-2016-001).

Kutatásaimat a következő pályázatok tették lehetővé: Faunagenezis - NKFP 3B-02304 (NKFIH), OTKA K84071 (NKFIH), Bolyai János Kutatási Ösztöndíj BO/ 00579/14/8 (MTA), OTKA - KH130360 (NKFIH), KGYNK2023-30 (MTA), EDGE, MAVA, Sir Mark Mitchell Research Foundation, Field Naturalists Society of South Australia Lirabenda Endowment Fund, Australian Research Council Discovery Grant (DP120104146).

És végül, de nem utolsó sorban, kimondhatatlanul hálás vagyok a családomnak, hogy végig mellettem álltak, és bármilyen nehézséggel kellett is szembe néznom, bíztattak a folytatásra; sok áldozatot hoztak azért, hogy ez a munka elkészüljön. Köszönöm nektek Vörös László, Vörös Lászlóné, Vörös Eszter, Darvas Ádám, Darvas Fábián, Bollók Imréné, Németh Katalin, Darvas Péter, Rió Kutyus, ti vagytok a legcsodásabb család a világon!

9. Irodalomjegyzék

- Adams CIM, Knapp M, Gemmell NJ, Jeunen G-J, Bunce M, Lamare MD, Taylor HN (2019): Beyond biodiversity: can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool? *Genes* 10: 192.
- Adamson EaS, Saha A, Maddock ST, Nussbaum RA, Gower DJ, Streicher JW (2016): Microsatellite discovery in an insular amphibian (*Grandisonia alternans*) with comments on cross-species utility and the accuracy of locus identification from unassembled Illumina data. *Conservation Genetics Resources* 8: 541–551.
- Alexander DH, Lange K (2011): Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics* 12: 246.
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009): Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research* 19: 1655–1664.
- Alexandrino J, Arntzen JW, Ferrand N (2002): Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity* 88: 66–74.
- Altig R, McDiarmid RW (1999): Body plan: development and morphology. In: McDiarmid RW, Altig R (Eds), *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 24–51.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- AmphibiaWeb (2025): University of California, Berkeley, CA, USA. Elérhető: <http://amphibiaweb.org> (Letöltve 2025 január 19.).
- Andreone F, Tripepi S (2006): *Triturus alpestris*. Pp. 236–239. In: Sindaco R, Doria G, Razzetti E, Bernini F (Eds), *Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia / Atlas of Italian Amphibians and Reptiles*. Societas Herpetologica Italica, Ed. Polistampa, Firenze, Italy.
- Anstis M, Price LC, Roberts JD, Catalano S, Doughty P, Hines HB, Donnellan SC (2016): Revision of the Australian water holding frog (*Cyclorana platycephala*, Anura: Hylidae), with a description of a new species and subspecies. *Zootaxa* 4126: 451–479.
- Arano B, Arntzen JW (1987): Genetic differentiation in the alpine newt, *Triturus alpestris*. Pp. 21–24. In: van Gelder JJ, Strijbosch H, Bergers PJM (Eds), *Proceedings of the Fourth Ordinary General Meeting of the Societas Europea Herpetologica*. Faculty of Sciences Nijmegen Press, Nijmegen.
- Arévalo E, Davis SK, Sites JW (1994): Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology* 43: 387–418.
- Armstrong DM, Croft SJ, Foulkes JN (2003): *A Biological Survey of the Southern Mount Lofty Ranges, South Australia, 2000–2001*. Department for Environment and Heritage, South Australia.
- Arntzen JW (1978): Some hypotheses on postglacial migrations of the fire-bellied toad *Bombina bombina* (Linnaeus) and the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus). *Journal of Biogeography* 5: 339–345.
- Arntzen JW, Denoël M, Miaud C, Andreone F, Vogrin M, Edgar P, Trontelj P, Jelić D, Zakšek V (2009): *Proteus anguinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T18377A8173419.
- Arntzen JW, Kuzmin S, Beebe T, Papenfuss T, Sparreboom M, Ugurtas IH, Anderson S, Anthony B, Andreone F, Tarkhishvili D, Ishchenko V, Ananjeva N, Orlov N, Tuniyev B (2009): *Lissotriton vulgaris*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T59481A11931846.
- Arntzen JW, Wielstra B, Wallis GP (2014): The modality of nine *Triturus* newt hybrid zones assessed with nuclear, mitochondrial and morphological data. *Biological Journal of the Linnean Society* 113: 604–622.
- Arteaga-Navarro AF, Guayasamin JM (2011): A new frog of the genus *Pristimantis* (Amphibia: Strabomantidae) from the high Andes of southeastern Ecuador, discovered using morphological and molecular data. *Zootaxa* 2876: 17–29.
- Babik W, Branicki W, Crnobrnja-Isailović J, Cogălniceanu D, Sas I, Olgun K, Poyarkov NA, Garcia-París M, Arntzen JW (2005): Phylogeography of two European newt species – discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology* 14: 2475–2491.
- Babik W, Branicki W, Sandera M, Litvinchuk S, Borkin LJ, Irwin JT, Rafiński J (2004): Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology* 13: 1469–1480.
- Balázs G, Lewarne B, Herczeg G (2015): In situ underwater tagging of aquatic organisms: a test using the cave-dwelling olm, *Proteus anguinus*. *Annales Zoologici Fennici* 52: 160–166.
- Balázs G, Lewarne B, Herczeg G (2020): Extreme site fidelity of the olm (*Proteus anguinus*) revealed by a long-term capture–mark–recapture study. *Journal of Zoology*.
- Bálint M, Ujvárosi L, Theissinger K, Lehrian S, Mészáros N, Pauls SU (2011): The Carpathians as a major diversity hotspot in Europe. In: Zachos FE & Habel JC (Eds), *Biodiversity Hotspots*. Springer, London, pp. 189–205.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Bani L, Pisa G, Luppi M, Spilotros G, Fabbri E, Randi E, Orioli V (2015): Ecological connectivity assessment in a strongly structured fire salamander (*Salamandra salamandra*) population. *Ecology and Evolution* 5: 3472–3485.

- Barbour T, Noble G (1920): Some amphibians from northwestern Peru, with a revision of the genera *Phyllobates* and *Telmatobius*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 63: 395–427.
- Barker J, Grigg G (1977): *A Field Guide to Australian Frogs*. Rigby, Adelaide, 229 pp.
- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM (2014): Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology* 48: 1819–1827.
- Bass MS, Finer M, Jenkins CN, Kreft H, Cisneros-Heredia DF, McCracken SF, Pitman NCA, English PH, Swing K, Villa G, Di Fiore A, Voigt CC, Kunz TH (2010): Global conservation significance of Ecuador's Yasuni National Park. *PLoS ONE* 5: e8767.
- Beaumont MA, Nielsen R, Robert C, Hey J, Gaggiotti O, Knowles L, Estoup A, Panchal M, Corander J, Hickerson M, Sisson SA, Fagundes N, Chikhi L, Beerli P, Vitalis R, Cornuet JM, Huelsenbeck J, Foll M, Yang Z, Rousset F, Balding D, Excoffier L (2010): In defence of model-based inference in phylogeography. *Molecular Ecology* 19: 436–446.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002): Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics* 162: 2025–2035.
- Beeman K (1998): Digital signal analysis, editing, and synthesis. In: *Animal Acoustic Communication*. Springer, pp. 59–103.
- Bell BD (1982): The amphibian fauna of New Zealand. In: Newman DG (Ed), *New Zealand Herpetology*. New Zealand Wildlife Service, Wellington, pp. 27–89.
- Bell BD, Carver S, Mitchell NJ, Pledger S (2004): The recent decline of a New Zealand endemic: how and why did populations of Archey's frog *Leiopelma archeyi* crash over 1996–2001? *Biological Conservation* 120: 189–199.
- Bell G (1977): The life of the smooth newt (*Triturus vulgaris*) after metamorphosis. *Ecological Monographs* 47: 279–299.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2009): GenBank. *Nucleic Acids Research* 37: D26–D31.
- Bernal MH, Lynch JD (2008): Review and analysis of altitudinal distribution of the Andean anurans in Colombia. *Zootaxa* 1826: 1–25.
- Bhagwat SA, Willis KJ (2008): Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits? *Journal of Biogeography* 35: 464–482.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007): Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Bielby J, Cooper N, Cunningham AA, Garner TWJ, Purvis A (2008): Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters* 1: 82–90.
- Bizjak Mali L, Sket B (2019): History and biology of the black *Proteus* (*Proteus anguinus parkelj* Sket & Arntzen 1994; Amphibia: Proteidae): A review. *Folia Biologica et Geologica* 60: 5.
- Blank L, Sinai I, Bar-David S, Peleg N, Segev O, Sadeh A, Kopelman NM, Templeton AR, Merila J, Blaustein L (2013): Genetic population structure of the endangered fire salamander (*Salamandra infraimmaculata*) at the southernmost extreme of its distribution. *Animal Conservation* 16: 412–421.
- Blaustein AR, Walls SC, Bancroft BA, Lawler JJ, Searle CL, Gervasi SS (2010): Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity* 2: 281.
- Blotto BL, Lyra ML, Cardoso MCS, Rodrigues MT, Dias IR, Marciano-Jr E, Vechio FD, Orrico VGD, Brandão RA, Lopes de Assis C, Lantyer-Silva AS, Rutherford MG, Gagliardi-Urrutia G, Solé M, Baldo D, Nunes I, Cajade R, Torres A, Grant T, Jungfer KH, da Silva HR, Haddad CFB, Faivovich J (2020): The phylogeny of the Casque-headed Treefrogs (Hylidae: Hylinae: Lophyohylini). *Cladistics* 37: 36–72.
- Böhme M, Schneeweiß N, Fritz U, Schlegel M, Berendonk T (2007): Small edge populations at risk: genetic diversity of the green lizard (*Lacerta viridis viridis*) in Germany and implications for conservation management. *Conservation Genetics* 8: 555–563.
- Boitani L, Maiorano L, Baisero D, Falcucci A, Visconti P, Rondinini C (2011): What spatial data do we need to develop global mammal conservation strategies? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366: 2623–2632.
- Bokermann WCA (1966): O gênero *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 38: 335–344.
- Borowsky RL, Vidthayanon C (2001): Nucleotide diversity in populations of balitorid cave fishes from Thailand. *Molecular Ecology* 10: 2799–2805.
- Boulenger GA (1900): Descriptions of new batrachians and reptiles collected by Mr. P. O. Simons in Peru. *Annals and Magazine of Natural History* 6: 181–186.
- Boulton AJ, Fenwick GD, Hancock PJ, Harvey MS (2008): Biodiversity, functional roles and ecosystem services of groundwater invertebrates. *Invertebrate Systematics* 22: 103–116.
- Božić V (2014): *Illustrated history of speleology in Croatia*. Croatian Mountaineering Society, Zagreb.
- Bradburd GS, Ralph PL, Coop GM (2013): Disentangling the effects of geographic and ecological isolation on genetic differentiation. *Evolution* 67: 3258–3273.
- Bradic M, Beerli P, García-De León FJ, Esquivel-Bobadilla S, Borowsky RL (2012): Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evolutionary Biology* 12: 9.

- Brandley MC, Guiher TJ, Pyron RA, Winne CT, Burbrink FT (2010): Does dispersal across an aquatic geographic barrier obscure phylogeographic structure in the diamond-backed watersnake (*Nerodia rhombifer*)? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 552–560.
- Brassel KE, Reif D (1979): A procedure to generate Thiessen polygons. *Geographical Analysis* 11: 289–303.
- Brereton R, Bennett S, Mansergh I (1995): Enhanced greenhouse climate change and its potential effect on selected fauna of south-eastern Australia: A trend analysis. *Biological Conservation* 72: 339–354.
- Breuil M, Guillaume CP (1985): Étude électrophorétique de quelques populations de Tritons alpestres neoténiques (*Triturus alpestris*, Amphibia, Caudata, Salamandridae) du sud de la Yougoslavie. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 109: 377–389.
- Brito J, Almandariz AC, Batallas DR, Ron SR (2017a): Nueva especie de rana bromelícola del género *Pristimantis* (Amphibia: Craugastoridae), meseta de la Cordillera del Cóndor, Ecuador. *Papéis Avulsos de Zoologia* 57: 177–195.
- Brito J, Batallas D, Yáñez-Muñoz MH (2017b): Ranas terrestres *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) de los bosques montanos del río Upano, Ecuador: lista anotada, patrones de diversidad y descripción de cuatro especies nuevas. *Neotropical Biodiversity* 3: 125–156.
- Brito J, Batallas-Revelo D, Velalcázar D (2014): Nueva especie de rana terrestre del género *Pristimantis* (Amphibia: Craugastoridae), meseta de la Cordillera del Cóndor. *Papéis Avulsos de Zoologia* 54: 435–446.
- Broquet T, Ménard N, Petit E (2007): Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 8: 249–260.
- Bruford MW, Wayne RK (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development* 3: 939–943.
- Buj I, Marcic Z, Caleta M, Sanda R, Geiger MF, Freyhof J, Machordom A, Vukic J (2017): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE* 12: e0187366.
- Burns EL, Eldridge MDB, Crayn DM, Houlden BA (2007): Low phylogeographic structure in a widespread endangered Australian frog *Litoria aurea* (Anura: Hylidae). *Conservation Genetics* 8: 17–32.
- Burns EL, Eldridge MDB, Houlden BA (2004): Microsatellite variation and population structure in a declining Australian hylid *Litoria aurea*. *Molecular Ecology* 13: 1745–1757.
- Caminer MA, Ron SR (2014): Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. *ZooKeys* 370: 1–68.
- Campos TF, de Lima MG, Nascimento FACD, dos Santos EM (2014): Larval morphology and advertisement call of *Phyllodytes acuminatus* Bokermann, 1966 (Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil. *Zootaxa* 3779: 93–100.
- Caramaschi U, da Silva HR, Britto-Pereira MC (1992): A new species of *Phyllodytes* (Anura, Hylidae) from Southern Bahia, Brazil. *Copeia* 1992: 187–191.
- Caramaschi U, Peixoto OL, Rodrigues MT (2004): Revalidation and redescription of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional* 62: 185–191.
- Carey C, Alexander MA (2003): Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions* 9: 111–121.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009): Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785–789.
- Carnaval ACOQ, Puschendorf R, Peixoto OL, Verdade VK, Rodrigues MT (2006): Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth* 3: 41–48.
- Carr DL (2004): Tropical deforestation. In: Janelle DG, Warf B & Hansen K (Eds), *WorldMinds: Geographical Perspectives on 100 Problems: Commemorating the 100th Anniversary of the Association of American Geographers 1904–2004*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 293–298.
- Carstens BC, Degenhardt JD, Stevenson AL, Sullivan J (2005): Accounting for coalescent stochasticity in testing phylogeographical hypotheses: modelling Pleistocene population structure in the Idaho giant salamander *Dicamptodon aterrimus*. *Molecular Ecology* 14: 255–265.
- Carvajal-Endara S, Coloma LA, Morales-Mite MA, Guayasamin JM, Székely P, Duellman WE (2019): Phylogenetic systematics, ecology, and conservation of marsupial frogs (Anura: Hemiphraetidae) from the Andes of southern Ecuador, with descriptions of four new biphasic species. *Zootaxa* 4562: 1–102.
- Catling PC, Hertog A, Burt RJ, Forrester RI, Wombey JC (1999): The short-term effect of cane toads (*Bufo marinus*) on native fauna in the Gulf Country of the Northern Territory. *Wildlife Research* 26: 161–185.
- Catullo RA, Doughty P, Keogh JS (2014): A new frog species (Myobatrachidae: *Uperoleia*) from the Northern Deserts region of Australia, with a redescription of *U. trachyderma*. *Zootaxa* 3753: 251–262.
- Catullo RA, Keogh JS (2021): Seen only once: an evolutionarily distinct species of Toadlet (Uperoleia: Myobatrachidae) from the Wessel Islands of northern Australia. *Zootaxa* 5057: 52–68.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967): Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution* 21: 550–570.
- Chan KO, Grismer LL (2021): Correcting for body size variation in morphometric analysis. *bioRxiv* 2021.05.17.444580.

- Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015): Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* 4: s13742-13015-10047-13748.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, Mack MC, Diaz S (2000): Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405: 234–242.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31: 497–500.
- Chiou KL, Bergey CM (2018): Methylation-based enrichment facilitates low-cost, noninvasive genomic scale sequencing of populations from feces. *Scientific Reports* 8: 1975.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Clulow S, Swan M (2018): *A Complete Guide to Frogs of Australia*. Australian Geographic, 336 pp.
- Cobos MC, Penichet CN, Valarezo-Aguilar K (2015): First record of an American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) population in Loja, Ecuador. *IRCF Reptiles & Amphibians* 22: 46–48.
- Cocroft RB, Ryan MJ (1995): Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* 49: 283–303.
- Cogălniceanu D, Székely P, Samoilă C, Iosif R, Tudor M, Plăiașu R, Stănescu F, Rozyłowicz L (2013): Diversity and distribution of amphibians in Romania. *ZooKeys* 296: 35–57.
- Cogger HG (1975): *Reptiles and Amphibians of Australia*. Reed, Sydney.
- Cogger HG, Cameron EE, Cogger HM (1983): *Zoological Catalogue of Australia*. Australian Government Publishing Service: Canberra.
- Collins JP, Storfer A (2003): Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89–98.
- Coloma LA, Quiguango-Ubillús A (2018): *Atelopus ignescens*, accessed on 13 September 2021. Centro Jambatu. 2011–2021. Anfíbios de Ecuador.
- Corander J, Marttinen P, Mäntyniemi S (2006): Bayesian identification of stock mixtures from molecular marker data. *Fishery Bulletin* 104: 550–558.
- Cornuet JM, Ravigné V, Estoup A (2010): Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics* 11: 401.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008): Inferring population history with diy abc: A user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24: 2713–2719.
- Courchamp F, Chapuis JL, Pascal M (2003): Mammal invaders on islands: impact, control and control impact. *Biological Reviews* 78: 347–383.
- Courtice GP, Grigg GC (1975): A taxonomic revision of the *Litoria aurea* complex (Anura: Hylidae) in southeastern Australia. *Australian Zoologist* 18: 149–163.
- Covacevich J, Archer M (1975): The distribution of the Cane Toad, *Bufo marinus*, in Australia and its effects on indigenous vertebrates. *Memoirs of the Queensland Museum* 17: 305–310.
- Cristescu ME (2014): From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 566–571.
- Cristescu ME, Hebert PDN (2018): Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49: 209–230.
- Crossland MR (2000): Direct and indirect effects of the introduced toad *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) on populations of native anuran larvae in Australia. *Ecography* 23: 283–290.
- Cruz CAG, Feio RN (2007): Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. In: Nascimento LB & Oliveira ME (Eds), *Herpetologia no Brasil II*. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, pp. 117–126.
- Cruz D, Marciano-JR E, Napoli MF (2014): Advertisement and courtship calls of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Anura: Hylidae). *Zootaxa* 3774: 97–100.
- Csilléry K, Blum MG, Gaggiotti OE, Francois O (2010): Approximate Bayesian computation (ABC) in practice. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 410–418.
- Cullings KW (1992): Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233–240.
- Culver DC, Master LL, Christman MC, Hobbs HH (2000): Obligate Cave Fauna of the 48 Contiguous United States. *Conservation Biology* 14: 386–401.
- Culver DC, Pipan T (2019): *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. Oxford University Press.
- Culver DC, Sket B (2000): Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies* 62: 11–17.
- Cunha MS, Napoli MF (2016): Calling site selection by the bromeliad-dwelling treefrog *Phyllodytes melanomystax* (Amphibia: Anura: Hylidae) in a coastal sand dune habitat. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 51: 144–151.
- Da Mota PS, de Oliveira MIRR, Napoli MF, Weber LN (2020): Comparative analysis of the chondrocranium and hyobranchial skeleton of bromeliad arboreal frog larvae of the genus *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae). *Zootaxa* 4895: 239–250.

- de Queiroz K (2020): An updated concept of subspecies resolves a dispute about the taxonomy of incompletely separated lineages. *Herpetological Review* 51: 459–461.
- Deharveng L, Stoch F, Gibert J, Bedos A, Galassi D, Zagmajster M, Brancelj A, Camacho A, Fiers F, Martin P, Giani N, Magniez G, Marmonier P (2009): Groundwater biodiversity in Europe. *Freshwater Biology* 54: 709–726.
- Deiner K, Walser JC, Mächler E, Altermatt F (2015): Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation* 183: 53–63.
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, Pellier-Cuit S, Pompanon F, Taberlet P, Miaud C (2011): Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6:e23398.
- Dely O Gy (1959): Examen du *Triton alpestre* (*Triturus alpestris*), spécialement en vue des populations de la Hongrie et des Carpathes. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 5: 255–315.
- Dely O Gy (1964): Környezettani és rendszertani vizsgálatok az alpesi gótén. Dissertation for Candidate of Science degree. Budapest, 369 pp.
- Dely O Gy (1967): Kétéltűek–Amphibia, Magyarország Állatvilága. *Fauna Hungaricae* 20(3), Akadémia Kiadó, Budapest, 78 pp.
- Denoël M (1994): Le Triton alpestre, *Triturus alpestris* (Laurenti, 1768). *Les Naturalistes Belges* 75: 47–64.
- Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts (2009): *Litoria raniformis* in Species Profile and Threats Database. Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts, Canberra. Available from: <http://www.environment.gov.au/sprat> [Letölteve 2009 december 3-án]
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, delAngel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler B, Daly MJ (2011): A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics* 43: 491–498.
- Dias I, Medeiros T, Vila Nova M, Solé M (2014a): Amphibians of Serra Bonita, southern Bahia: a new hotspot within Brazil’s Atlantic Forest hotspot. *ZooKeys* 449: 105–130.
- Dias IR, Mira-Mendes CV, Solé M (2014b): Rapid inventory of herpetofauna at the APA (environmental protection area) of the Lagoa Encantada and Rio Almada, Southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 7: 627–637.
- Dias IR, Novaes-e-Fagundes G, Neto AM, Zina J, Garcia C, Recoder RS, Dal Vechio F, Rodrigues MT, Solé M (2020): A new large canopy-dwelling species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic Forest of the State of Bahia, Northeastern Brazil. *PeerJ* 8:e8642.
- Didham RK, Tylianakis JM, Hutchison MA, Ewers RM, Gemmill NJ (2005): Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 470–474.
- Dixo M, Metzger JP, Morgante JS, Zamudio KR (2009): Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation* 142: 1560–1569.
- Dolmen D (1981): Local migration, rheotaxis and philopatry by *Triturus vulgaris* within a locality in central Norway. *British Journal of Herpetology* 6: 151–158.
- Domingues RR, Garrone-Neto D, Hilsdorf AWS, Gadig OBF (2019): Use of mucus as a non-invasive sampling method for DNA barcoding of stingrays and skates (batoid elasmobranchs). *Journal of Fish Biology* 94:512–516.
- Donnellan SC, Catalano S, Pederson S, Mitchell K, Suhendran A, Price LC, Daughy P, Richards SJ (2021): Revision of the *Litoria watjulumensis* (Anura: Pelodyadidae) group from the Australian monsoonal tropics, including the resurrection of *L. spaldingi*. *Zootaxa* 4933: 211–240.
- Donnellan SC, Mahony MJ (2004): Allozyme, chromosomal and morphological variability in the *Litoria lesueuri* species group (Anura: Hylidae), including a description of a new species. *Australian Journal of Zoology* 52: 1–28.
- Donnellan SC, McGuigan K, Knowles R, Mahony M, Moritz C (1999): Genetic evidence for species boundaries in frogs of the *Litoria citropa* species group (Anura: Hylidae). *Australian Journal of Zoology* 47: 275–293.
- Druett J (1983): *Exotic Intruders: The Introduction of Plants and Animals into New Zealand*. Heinemann, Auckland
- Dubois A, Raffaëlli J (2009): A new ergotaxonomy of the family Salamandridae Goldfuss, 1820 (Amphibia, Urodela). *Alytes* 26: 1–85.
- Duellman WE (1974): A systematic review of the marsupial frogs (Hylidae: *Gastrotheca*) of the Andes of Ecuador. *Occasional Papers of the Museum of Natural Science* 22: 1–27.
- Duellman WE, Lehr E (2009): Terrestrial breeding frogs (Strabomantidae) in Peru. *Natur- und Tier-Verlag, Naturwissenschaft, Münster*, 382 pp.
- Duellman WE, Lehr E, Venegas PJ (2006): Two new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Andes of northern Peru. *Zootaxa* 1285:51–64.
- Duellman WE, Pramuk JB (1999): Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) in the Andes of northern Peru. *Scientific Papers of the Natural History Museum, University of Kansas* 13: 1–78.
- Duellmann WE (1970): The hylid frogs of Middle America. *Monograph of the Museum of Natural History, The University of Kansas* 1: 1–753.

- Duellmann WE, Trueb L (1986): Biology of Amphibians. McGraw–Hill, New York, 670 pp.
- Dufresnes C, Suchan T, Smirnov NA, Denoël M, Rosanov JM, Litvinchuk SN (2021): Revisiting a speciation classic: comparative analyses support sharp but leaky transitions between *Bombina* toads. *Journal of Biogeography* 48: 548–560.
- Dumas P, Chris B (1998): The olfaction in *Proteus anguinus*: a behavioural and cytological study. *Behavioural Processes* 43:107–113.
- Durand JP, Delay B (1981): Influence of temperature on the development of *Proteus anguinus* (Caudata: Proteidae) and relation with its habitat in the subterranean world. *Journal of Thermal Biology* 6: 53–57.
- Durand JP, Parzefall J (1987): Comparative study of the rheotaxis in the cave salamander *Proteus anguinus* and his epigean relative *Necturus maculosus* (Proteidae, Urodela). *Behavioural Processes* 15: 285–291.
- Eda ARAR, Bishop PJ, Altobelli JT, Godfrey SS, Stanton JAN (2023): Screening for *Batrachochytrium dendrobatidis* in New Zealand native frogs: 20 years on. *New Zealand Journal of Ecology* 47(2): 3531.
- Edgar RC (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Edwards SR (1971): Taxonomic notes on South American *Colostethus* with descriptions of two new species (Amphibia, Dendrobatidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 84: 147–162.
- Egea-Serrano A, Solé M (2017): Effects of insecticides on a phytotelmata-breeding amphibian. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 422–428.
- Ehmann H (2013): Nullarbor crossing and biodiversity risk: Focus on the spotted-thighed bellfrog. *Caring for Country*, newsletter of Natural Resources Alinytjara Wilurara. Letöltve: [http://www.naturalresources.sa.gov.au/alinytjara-wilurara/search-results?dlv_AW%20DLV%20search%20results=\(keyword=september%20edition%202013%20newsletter\)](http://www.naturalresources.sa.gov.au/alinytjara-wilurara/search-results?dlv_AW%20DLV%20search%20results=(keyword=september%20edition%202013%20newsletter)).
- Elmer KR, Cannatella DC (2009): Three new species of leaf litter frogs from the upper Amazon forests: cryptic diversity within *Pristimantis “ockendeni”* (Anura: Strabomantidae) in Ecuador. *Zootaxa* 1784: 11–38.
- Eriksson J, Hohmann G, Boesch C, Vigilant L (2004): Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology* 13: 3425–3435.
- Estes RD, Darevsky I (1977): Fossil amphibians from the Miocene of the north Caucasus, USSR. *Journal of The Palaeontological Society of India* 20: 164–169.
- Eterovick PC, Queiroz-Carnaval ACO, Borges-Nojosa DM, Silvano DL, Segalla MV, Sazima I (2005): Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica* 37: 166–179.
- 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, 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(3): 564–567.
- Faircloth BC (2008): msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources* 8: 92–94.
- Faucher L, Godé C, Arnaud JF (2016): Development of Nuclear Microsatellite Loci and Mitochondrial Single Nucleotide Polymorphisms for the Natterjack Toad, *Bufo (Epidalea) calamita* (Bufonidae), Using Next Generation Sequencing and Competitive Allele Specific PCR (KASPar). *Journal of Heredity* 107: 660–665.
- Ferreira RB, Schineider JAP, Teixeira RL (2012): Diet, Fecundity, and Use of Bromeliads by *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae) in Southeastern Brazil. *Journal of Herpetology* 46(1): 19–24.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423–425.
- Ficetola GF, Coissac E, Zundel S, Riaz T, Shehzad W, Bessière J, Taberlet P, Pompanon F (2010): An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* 11: 434.
- Ficetola GF, Manenti R, Taberlet P (2019): Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: species distribution, the microbiome, and much more. *Amphibia-Reptilia* 40: 129–148.
- Fijarczyk A, Nadachowska K, Hofman S, Litvinchuk SN, Babik W, Stuglik M, Gollmann G, Choleva L, Cogălniceanu D, Vukov T, Džukić G, Szymura JM (2011): Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. *Molecular Ecology* 20: 3381–3398.
- Filipi K, Marková S, Searle JB, Kotlík P (2015): Mitogenomic phylogenetics of the bank vole *Clethrionomys glareolus*, a model system for studying end-glacial colonization of Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82: 245–257.
- Fitzinger LJ (1850): Über den *Proteus anguinus* der Autoren. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse* 5: 291–303.
- Ford MA (1989): Vocalisation of the green frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*, including species-specific male calls. *New Zealand Journal of Zoology* 16: 17–23.
- Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmill NJ (2007): Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2: e1109.
- Fouquet A, Loebmann D, Castroviejo-Fisher S, Padial JM, Orrico VG, Lyra ML, Roberto IJ, Kok PJR, Haddad CFB, Rodrigues MT (2012): From Amazonia to the Atlantic forest: molecular phylogeny of Phyzelaphryniinae

- frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 547–561.
- Fouquet A, Vences M, Salducci MD, Meyer A, Marty C, Blanc M, Gilles A (2007): Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 567–582.
- Fouquet A, Santana-Cassini C, Haddad CFB, Pech N, Trefaut-Rodrigues M (2014): Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41: 855–870.
- Franco-Mena D, Guayasamin JM, Andrade-Brito D, Yáñez-Muñoz MH, Rojas-Runjaic FJM (2023): Unveiling the evolutionary relationships and the high cryptic diversity in Andean rainfrogs (Craugastoridae: Pristimantis myersi group). *PeerJ*. 11:e14715.
- Frankham R (2010): Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics* 11: 661–663.
- Frankham R (2015): Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. *Molecular Ecology* 24: 2610–2618.
- Frost DR (2025): Amphibian species of the world: An online reference. Version 6.2, letöltve 2025 február 25. American Museum of Natural History. Available from: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>.
- Funk WC, Caminer M, Ron SR (2012): High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 1806–1814.
- Fusinatto LA, Alexandrino J, Haddad CFB, Brunes TO, Rocha CFD, Sequeira F (2013): Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *PLoS ONE* 8: e79504.
- Gábris G, Mari L (2007): The Pleistocene beheading of the Zala River (West Hungary). *Földrajzi Értesítő* 56: 39–50.
- Gál JT (2013): Detection of *Proteus anguinus* using environmental DNA in Croatia. M.Sc. Thesis. Szent István University.
- Gallardo H (1978): Presencia de Loja y su provincia. Loja, Ecuador: Editorial de la Casa de la Cultura Benjamín Carrión.
- García-París M Jockusch EL (1999): A mitochondrial DNA perspective on the evolution of Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura). *Journal of Zoology* 248: 209–218.
- García-R JC, Mendoza ÁM, Ospina O, Cardenas H, Castro F (2014): A morphometric and molecular approach to define three closely related species of frogs of the genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from the Cordillera Occidental in Colombia. *Journal of Herpetology* 48: 220–227.
- Gardner MG, Fitch AJ, Bertozzi T, Lowe AJ (2011): Rise of the machines – recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources* 11: 1093–1101.
- Garza JC, Williamson EG (2001): Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305–318.
- Gastner MT, Newman MEJ (2004): Diffusion-based method for producing density-equalizing maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101(20): 7499–7504.
- Gehara M, Canedo C, Haddad CFB, Vences M (2013): From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conservation Genetics* 14: 973–982.
- Gehara M, Crawford AJ, Orrico VGD, Rodríguez A, Lötters S., Fouquet A Barrientos LS, Brusquetti F, De la Riva I, Ernst R, Urrutia GG, Glaw F, Guayasamin JM, Hölting M, Jansen M, Kok PJR, Kwet A, Lingnau R, Lyra M, Moravec J, Pombal JP, Rojas-Runjaic FJM, Schulze A, Señaris JC, Solé M, Rodrigues MT, Twomey E, Haddad CFB, Vences M, Köhler J (2014): High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: continental phylogeography of the Neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. *PLoS ONE* 9: e103958.
- Geyle HM, Hoskin CJ, Bower DS., Catullo R Clulow S, Driessen M, Daniels K, Garnett ST, Gilbert D, Heard GW, Hero J-M, Hines HB, Hoffmann EP, Hollis G, Hunter DA, Lemckert F, Mahony M, Marantelli G, McDonald KR, Mitchell NJ, Newell D, Roberts JD, Scheele BC, Scroggie MP, Vanderduys E, Wassens S, West M, Woinarski JCZ, Gillespie GR (2021): Red hot frogs: identifying the Australian frogs most at risk of extinction. *Pacific Conservation Biology* 28(3) 211–223.
- Giam X, Scheffers BR, Sodhi NS, Wilcove DS, Ceballos G, Ehrlich PR (2012): Reservoirs of richness: least disturbed tropical forests are centres of undescribed species diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 67–76.
- Gibert J, Culver DC, Dole-Olivier M-J, Malard F, Christman MC, Deharveng L (2009): Assessing and conserving groundwater biodiversity: synthesis and perspectives. *Freshwater Biology* 54: 930–941.
- Gibert J, Deharveng L (2002): Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *BioScience* 52: 473–481.
- Gill B Whitaker T (1996): *New Zealand Frogs and Reptiles*. David Bateman, Auckland.

- Gillespie GR, Roberts JD, Hunter D, Hoskin CJ, Alford RA, Heard GW, Hines H, Lemckert F, Newell D, Scheele BC (2020): Status and priority conservation actions for Australian frog species. *Biological Conservation* 247: 108543.
- Gippner S, Strowbridge N, Šunje E, Capstick M, Amat F, Bogaerts S, Merabet K, Preissler K, Galán P, Martínez-Solano I, Bonato L, Steinfartz S, Velo-Antón G, Dufresnes C, Elmer KR, Vences M (2024): The effect of hybrids on phylogenomics and subspecies delimitation in *Salamandra*, a highly diversified amphibian genus. *Salamandra* 60: 105–128.
- Goldberg CS, Pilliod DS, Arkle RS, Waits LP (2011): Molecular detection of vertebrates in stream water: A demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS ONE* 6.
- Gorički Š, Trontelj P (2006): Structure and evolution of the mitochondrial control region and flanking sequences in the European cave salamander *Proteus anguinus*. *Gene* 378: 31–41.
- Gosner KL (1960): A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183–190.
- Gottstein Matočec S, Bakran-Petricioli T, Bedek J, Bukovec D, Buzjak S, Franičević M et al (2002): An overview of the cave and interstitial biota of Croatia. *Natura Croatica* 11: 1–112.
- Goudet J (1995): FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Goudet J, Raymond M, de Meeüs T, Rousset F (1996): Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1933–1940.
- Guarnizo CE, Paz A, Munoz-Ortiz A, Flechas SV, Mendez-Narvaez J, Crawford AJ (2015): DNA barcoding survey of anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the impact of the Andes on cryptic diversity. *PLOS One* 10: e0127312.
- Guayasamin JM, Arteaga AF (2013): A new species of the *Pristimantis orestes* group (Amphibia: Strabomantidae) from the high Andes of Ecuador, Reserva Mazar. *Zootaxa* 3616: 345–356.
- Guayasamin JM, Krynak T, Krynak K, Culebras J, Hutter CR (2015): Phenotypic plasticity raises questions for taxonomically important traits: a remarkable new Andean rainfrog (*Pristimantis*) with the ability to change skin texture. *Zoological Journal of the Linnean Society* 173: 913–928.
- Guayasamin JM, Vieira J, Glor RE, Hutter CR (2019): A new glassfrog (Centrolenidae: *Hyalinobatrachium*) from the Topo River Basin, Amazonian slopes of the Andes of Ecuador. *Amphibian and Reptile Conservation* 13: 133–144.
- Gubányi A, Vörös J, Kiss I, Babocsay G, Dankovics R, Kovács T, Molnár P, Somlai T (2010): Contribution to knowledge of the distribution of Italian Crested Newt (*Triturus carnifex*), Danube Crested Newt (*Triturus dobrogicus*) and European Fire-bellied Toad (*Bombina bombina*) in Hungary. *Állattani Közlemények* 95: 253–279.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005): Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712–715.
- Guisan A, Zimmermann NE (2000): Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* 135: 147–186.
- Gvoždík V, Benkovský N, Crottini A, Bellati A, Moravec J, Romano A, Sacchi R, Jandzik D (2013): An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguinae), survived in the Italian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 1077–1092.
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA, Loebmann D, Gasparini JL, Sazima I (2013): Guide to the amphibians of the Atlantic Forest: diversity and biology. Anolis Books, São Paulo, Brazil, 544 pp.
- Hale ML, Burg TM, Steeves TE (2012): Sampling for microsatellite-based population genetic estimates: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* 7(9): e45170.
- Hall TA (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hammouti N, Schmitt T, Seitz A, Kosuch J, Veith M (2010): Combining mitochondrial and nuclear evidences: a refined evolutionary history of *Erebia medusa* (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) in Central Europe based on the COI gene. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48: 115–125.
- Harrison RG (1993): Hybrids and hybrid zones: historical perspective. In: Harrison RG (ed.), *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Harzhauser M, Mandic O (2010): Neogene dreissenids in Central Europe: evolutionary shifts and diversity changes. In: Van der Velde G, Rajagopal S, Bij de Vaate A (Eds), *The zebra mussel in Europe*, Vol. 11, pp. 11–29. Margraf Publishers, Weikersheim/Backhuys Publishers.
- Häupl M, Tiedemann F (1978): Vertebrata 1. Typenkatalog der Herpetologischen Sammlung. Kataloge der Wissenschaftlichen Sammlungen des Naturhistorischen Museums in Wien 2: 7–34.
- Häupl M, Tiedemann F, Grillitsch H (1994): Vertebrata 1. Katalog der Typen der Herpetologischen Sammlung nach dem Stand vom 1. Jänner 1994. Kataloge der Wissenschaftlichen Sammlungen des Naturhistorischen Museums in Wien 9: 1–42.
- Heard GW, Scroggie MP, Malone BS (2012): The life history and decline of the threatened Australian frog, *Litoria raniformis*. *Austral Ecology* 37: 276–284.

- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hedges SB, Duellman WE, Heinicke MP (2008): New World direct-developing frogs (Anura: *Terrarana*): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737: 1–182.
- Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, Taylor MI, Ogden R, Limborg MT, Cariani A, Maes GE, Diopere E, Carvalho GR, Nielsen EE (2011): Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources* 11: 123–136.
- Herder J, Valentini A, Bellemain E, Dejean T, van Delft J, Thomsen PF, et al. (2014): Environmental DNA. A review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Contract No.: 2013104.
- Hero JM, Littlejohn MM, Marantelli G (1991): Frogwatch field guide to Victorian frogs. Department of Conservation and Environment, East Melbourne, Victoria, 108 pp.
- Herrero P, Arano B (1986): Cytogenetic and morphological studies on *Triturus alpestris cyreni*. In: Roček Z (ed.), *Studies in Herpetology*. Charles University Press, Praha, pp. 151–154.
- Hervant F, Mathieu J, Durand J (2001): Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *Journal of Experimental Biology* 204: 269–281.
- Hewitt GM (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Hewitt GM (2004): Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359(1442): 183–195.
- Heyer WR, Rand AS, Cruz CAG, Peixoto OL, Nelson CE (1990): Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31: 231–410.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005): Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS (2018): UFBboot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35: 518–522.
- Hoddle MS (2004): Restoring balance: using exotic species to control invasive exotic species. *Conservation Biology* 18: 38–49.
- Hof C, Araújo MB, Jetz W, Rahbek C (2011): Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature* 480: 516–519.
- Hoffman EA, Blouin MS (2004): Historical data refute recent range contraction as cause of low genetic diversity in isolated frog populations. *Molecular Ecology* 13: 271–276.
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, Böhm M, Brooks TM, Butchart SHM, et al. (2010): The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science* 330: 1503–1509.
- Hofman S, Spolsky C, Uzzell T, Cogălniceanu D, Babik W, Szymura JM (2007): Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Ecology* 16(11): 2301–2316.
- Hofreiter M, Mead JI, Martin P, Poinar HN (2003): Molecular caving. *Current Biology* 13: 693–695.
- Hollós A, Pecsénye K, Bereczki J, Bátor E, Rákossy L, Varga Z (2012): Pattern of genetic and morphometric differentiation in *Maculinea nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Carpathian Basin. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 58: 87–103.
- Holsinger JR (1993): Biodiversity of subterranean amphipod crustaceans: global patterns and zoogeographic implications. *Journal of Natural History* 27: 821–835.
- Homeier J, Werner F, Gradstein S, Breckle S, Richter M (2008): Potential vegetation and floristic composition of Andean forests in South Ecuador, with a focus on the RBSF. In: Beck E, Bendix J, Kottke I, Makeschin F, Mosandl R (Eds), *Gradients in a tropical mountain ecosystem of Ecuador*. Ecological Studies, no. 198. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 87–100.
- Hopkins WA (2007): Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal* 48(3): 270–277.
- Hoskin CJ (2007): Description, biology and conservation of a new species of Australian tree frog (Amphibia: Anura: Hylidae: *Litoria*) and an assessment of the remaining populations of *Litoria genimaculata* Horst, 1883: systematic and conservation implications of an unusual speciation event. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 549–563.
- Howarth FG (1983): Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology* 28: 365–389.
- Hughes L (2000): Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution* 15: 56–61.
- Hunter D, Clemann N, Coote D, Gillespie G, Hollis G, Scheele B, Phillips A, West M (2018): Frog declines and associated management response in south-eastern mainland Australia and Tasmania. In: Heatwole H, Rowley J (Eds), *Amphibian Biology. Vol. 11: Amphibian Conservation in Australia, New Zealand and Pacific Islands*. Surrey Beatty and Sons, Baulkham Hills, New South Wales, pp. 39–58.
- Hutter CR, Guayasamin JM (2015): Cryptic diversity concealed in the Andean cloud forests: two new species of rainfrogs (*Pristimantis*) uncovered by molecular and bioacoustic data. *Neotropical Biodiversity* 1: 36–59.

- Hutter CR, Lambert SM, Wiens JJ (2017): Rapid diversification and time explain amphibian richness at different scales in the Tropical Andes, Earth's most biodiverse hotspot. *The American Naturalist* 190: 828–843.
- Ineich I, Bochaton C, Policard JP (2015): «Les Grenouilles du Résident»: on the date of introduction of *Litoria aurea* (Lesson, 1826) (Hylidae) into New Caledonia and Wallis Island (Wallis and Futuna) by Europeans. *Herpetology Notes* 8: 495–499.
- Irodalomjegyzék**
- IUCN (2001): The IUCN Red List of Threatened Species. Categories and Criteria. Ver. 3.1. Cambridge: IUCN.
- Ivanović A, Aljančić G, Arntzen JW (2013): Skull shape differentiation of black and white olms (*Proteus anguinus anguinus* and *Proteus a. parkelj*): An exploratory analysis with micro-CT scanning. *Contributions to Zoology* 82: 107–114.
- James TY, Toledo LF, Rödder D, da Silva Leite D, Belasen AM, Betancourt-Román CM, Jenkinson TS, Soto-Azat C, Lambertini C, Longo AV, Ruggeri J, Collins JP, Burrowes PA, Lips KR, Zamudio KR, Longcore JE (2015): Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution* 5: 4079–4097.
- Jaramillo P (1955): Historia de Loja y su provincia. Quito: Casa de la Cultura Benjamín Carrión.
- Jehle R, Arntzen JW (2002): Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *The Herpetological Journal* 12: 1–9.
- Jelić D, Kuljerić M, Koren T, Treer D, Šalamon D, Lončar M, Podnar Lešić M, Janev Hutinec B, Bogdanović T, Mekinić S, Jelić K (2012): Red Book of Amphibians and Reptiles of Croatia. Ministry of Environment and Nature Protection; State Institute for Nature Protection, Zagreb.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011): “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4: 150–157.
- Jiménez de la Espada M (1870): Fauna neotropicalis species quaedam nondum cognitae. *Jornal de Ciências, Matemáticas, Physicas e Naturaes* 3: 57–65.
- Jones MT, Voss SR, Ptacek MB, Weisrock DW, Tonkyn DW (2006): River drainages and phylogeography: an evolutionary significant lineage of shovel-nosed salamander (*Desmognathus marmoratus*) in the southern Appalachians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 280–287.
- Juncá FA, Napoli MF, Cedraz J, Nunes I (2012): Acoustic characteristics of the advertisement and territorial calls of *Phyllodytes tuberculatus* Bokermann, 1966 (Amphibia: Anura: Hylidae). *Zootaxa* 3506: 87–88.
- Kahrs D (2006): American bullfrog eradication in Sycamore Canyon, Arizona, a natural open aquatic system. *Sonoran Herpetologist* 19: 74–77.
- 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.
- Kamoroff C, Daniele N, Grasso RL, Rising R, Espinoza T, Goldberg CS (2020): Effective removal of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) on a landscape level: long-term monitoring and removal efforts in Yosemite Valley, Yosemite National Park. *Biological Invasions* 22: 617–626.
- Karátson D (2015): Danube Bend: Miocene half-caldera and Pleistocene gorge. In: Lóczy D, ed. *Landscapes and Landforms of Hungary*. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 129–137.
- Kashiwagi T, Maxwell EA, Marshall AD, Christensen AB (2015): Evaluating manta ray mucus as an alternative DNA source for population genetics study: underwater-sampling, dry-storage and PCR success. *PeerJ* 3:e1188.
- Katoh K, Standley D (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kats LB, Ferrer RP (2003): Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* 9: 99–110.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Keely CC, Hale JM, Heard GW, Parris KM, Sumner J, Hamer AJ, Melville J (2015): Genetic structure and diversity of the endangered growling grass frog in a rapidly urbanizing region. *Royal Society Open Science* 2: 140255.
- Kéry M, Schaub M (2012): Bayesian Population Analysis Using WinBUGS – A Hierarchical Perspective. Waltham: Academic Press.
- Kéry M, Schmidt BR (2008): Imperfect detection and its consequences for monitoring for conservation. *Community Ecology* 9: 207–216.
- Kibbe WA (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* 35:43–46.
- Kieswetter CM, Schneider CJ (2013): Phylogeography in the northern Andes: complex history and cryptic diversity in a cloud forest frog, *Pristimantis wnigrum* (Craugastoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 417–429.
- Kilian A, Wenzl P, Huttner E, Carling J, Xia L, Blois H, Caig V, Heller-Uszynska K, Jaccoud D, Hopper C, Aschenbrenner-Kilian M, Evers M, Peng K, Cayla C, Hok P, Uszynski G (2012): Diversity Arrays Technology: a generic genome profiling technology on open platforms. *Methods in Molecular Biology* 888: 67–89.

- Kiss I, Hamer AJ, Vörös J (2021): Life-history modelling reveals trends in fitness and apparent survival of an isolated *Salamandra salamandra* population in an urbanised landscape. *European Journal of Wildlife Research* 67: 76.
- Kletecki E, Jalzic B, Rada T (1996): Distribution of the olm (*Proteus anguinus* Laur.) in Croatia. *Mémoires de Biospéologie* 23: 227–231.
- Klymus KE, Richter CA, Chapman DC, Paukert C (2015): Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation* 183: 77–84.
- Koehler J, Jansen M, Rodriguez A, Kok P, Toledo L, Emmrich M, et al. (2017): The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251: 1–124.
- Köhler J, Vieites DR, Ronald RM, Garcia FH, Glaw F, Steinke D, Vences M (2005): New amphibians and global conservation: A boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *BioScience* 55: 693–696.
- Kotlík P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, Searle JB (2006): A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14860–14864.
- Kovačević T (1984): Speleoloski objekti stajničko polja - staniste covjecje ribice (*Proteus anguinus* Laurenti). In: Malez M, ed. *The Ninth Yugoslavian Congress of Speleology*. Karlovac: Croatian Speleological Network. pp. 539–543.
- Kraus F, Campbell EW, Allison A, Pratt T (1999): *Eleutherodactylus* frog introductions to Hawaii. *Herpetological Review* 30: 21–25.
- Krstić N, Savić L, Jovanović G, Bodor E (2003): Lower Miocene lakes of the Balkan Land. *Acta Geologica Hungarica* 46: 291–299.
- Krupa AP, Jehle R, Dawson DA, Gentle LK, Gibbs M, Arntzen JW, Burke T (2002): Microsatellite loci in the crested newt (*Triturus cristatus*) and their utility in other newt taxa. *Conservation Genetics* 3: 87–89.
- Lahoz-Monfort JJ, Guillera-Arroita G, Tingley R (2016): Statistical approaches to account for false-positive errors in environmental DNA samples. *Molecular Ecology Resources* 16: 673–685.
- Lambeck K, Chappell J (2001): Sea level change through the last glacial cycle. *Science* 292:679–685.
- Langella O (1999): Populations v1.2.28: A population genetic software. Elérhető: <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Lefebure T, Douady CJ, Gouy M, Trontelj P, Briolay J, Gibert J (2006): Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15: 1797–1806.
- Lefort MC, Cruickshank RH, Descovich K, Adams NJ, Barun A, Emami-Khoyi A, Ridden J, Smith VR, Sprague R, Waterhouse B, Boyer S (2019): Blood, sweat and tears: a review of non-invasive DNA sampling. *Peer Community Journal*, 2: e16.
- Lehr E (2007): New eleutherodactylid frogs (Leptodactylidae: *Pristimantis*, *Phrynopus*) from Peru. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 159: 145–178.
- Lehr E, Coloma LA (2008): A minute new Ecuadorian Andean frog (Anura: Strabomantidae, *Pristimantis*). *Herpetologica* 64: 354–367.
- Lehr E, Duellman WE (2007): Two new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Cordillera Occidental in Peru. *Copeia* 2007: 140–149.
- Lehr E, Köhler G (2007): A new species of the *Pristimantis orestes* group (Anura: Leptodactylidae) from the Cordillera Occidental in northern Peru. *Zootaxa* 1621: 45–54.
- Lehr E, Von May R, Moravec J, Cusi JC (2017): Three new species of *Pristimantis* (Amphibia, Anura, Craugastoridae) from upper montane forests and high Andean grasslands of the Pui Pui Protected Forest in central Peru. *Zootaxa* 4299: 301–336.
- Lehtinen RM, Nussbaum RA, Richards CM, Cannatella DC, Vences M (2007): Mitochondrial genes reveal cryptic diversity in plant-breeding frogs from Madagascar (Anura, Mantellidae, *Guibemantis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1121–1129.
- Lesica P, Allendorf FW (1995): When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9: 753–760.
- Lever C (2003): *Naturalized Reptiles and Amphibians of the World* – Oxford University Press, New York
- Lewarne B, Balázs G, Smith RP (2010) *Vol. 1. The Vrelo "Vruljak" (Gorica) Hypogean part-Ecosystem, an interim description and hypogean bio-inventory together with an outline of its current conservation-management problems. -Spelaobiologica Bosniæ et Hercegovinæ- Monographs in Speleobiology and the Conservation-management of Karst Conduit-aquifer Ecosystems in the Dinaric Karst of Eastern Hercegovina, Bosnia & Hercegovina* (Ed B Lewarne). Trebinje.
- Librado P, Rozas J (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Lima MG, Lingnau R, Skuk GO (2008): The advertisement call of *Phyllodytes edelmoi* (Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology* 3: 118–121.
- Littlejohn M, Martin AA (1969): Mating call as an aid to the identification of the frogs of the Melbourne area. *Victorian Naturalist* 86: 126–127.

- Leonart J, Salat J, Torres GJ (2000): Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology* 205: 85–93.
- Loftus-Hills JJ (1971): Comparative aspects of auditory function in Australian anurans. *Australian Journal of Zoology* 21: 353–367.
- Löhmus RR, Linnamägi M (2012): Geographic variation in habitat requirements of two coexisting newt species in Europe. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 58(1): 69–86.
- Louette G (2012): Use of a native predator for the control of an invasive amphibian. *Wildlife Research* 39: 271–278.
- Louette G, Devisscher S, Adriaens T (2012): Control of invasive American bullfrog *Lithobates catesbeianus* in small shallow water bodies. *European Journal of Wildlife Researches* 59: 105–114.
- Luedtke JA, Chanson J, Neam K et al. (2023): Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature* 622: 308–314.
- Lužnik M, Kryštufek B, Bužan E (2011): Mitochondrial sequences do not support the independent taxonomic position of the extinct Alpine newt subspecies *Mesotriton alpestris lacusnigri*. *Amphibia-Reptilia* 32: 435–440.
- Lynch J (1969): Taxonomic notes on Ecuadorian frogs (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*). *Herpetologica* 25: 262–274.
- Lynch JD (1976): The species groups of the South American frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas* 61: 1–24.
- Lynch JD (1979): Leptodactylid frogs of the genus *Eleutherodactylus* from the Andes of southern Ecuador. *Miscellaneous Publication of the Museum of Natural History, University of Kansas* 66: 1–62.
- Lynch JD, Duellman WE (1997): Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in western Ecuador: Systematics, ecology, and biogeography, Natural History Museum, University of Kansas, USA
- Lytte DA, Poff NL (2004): Adaptation to natural flow regimes. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 94–100.
- Mace GM (2004): The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359: 711–719.
- Magalhães FDM, Juncá FA, Garda AA (2015): Tadpole and vocalisations of *Phyllodytes wuchereri* (Anura: Hylidae) from Bahia, Brazil. *Salamandra* 51: 83–90.
- Magri D, Vendramin GG, Comps B, Dupanloup I, Geburek T, Gomory D, Latalowa M, Litt T, Paule L, Roure JM, Tantau I, van der Knaap WO, Petit RJ, de Beaulieu JL (2006): A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199–221.
- Mahony M (1999): Review of the declines and disappearances within the bell frog species group (*Litoria aurea* species group) in Australia. In: 'Declines and Disappearances of Australian Frogs' (Ed. A Campbell) Environment Australia, Canberra, pp. 81–93.
- Mahony MJ, Hamer AJ, Pickett EJ, McKenzie DJ, Stockwell MP, Garnham JJ, Keely CC, Deboo ML, O'Meara J, Pollard CJ, Clulow S, Lemckert FL, Bower DS, Clulow J (2013): Identifying conservation and research priorities in the face of uncertainty: a review of the threatened bell frog complex in eastern Australia. *Herpetological Conservation Biology* 8: 519–538.
- Mahony MJ, Hines HB, Bertozzi T, Mahony S, Donnellan SC (2022): A sixth species of northern *Phyloria* (Anura: Myobatrachidae) from the uplands of the World Heritage forests of eastern Australia. *Zootaxa* 5104: 209–241.
- Mahony MJ, Knowles R, Foster R, Donnellan SC (2001): Systematics of the *Litoria citropa* (Anura: Hylidae) complex in northern New South Wales and southern Queensland, Australia, with the description of a new species. *Records of the Australian Museum* 53: 37–48.
- Mahony MJ, Moses B, Mahony S, Lemckert F, Donnellan SC (2020): A new species of frog in the *Litoria ewingii* species group (Anura: Pelodyadidae) from south-eastern Australia. *Zootaxa* 4858: 201–230.
- Maldonado N, Vivar F, Velez J (2005): Escenario natural de la cultura de Loja: esbozo de geografía física y humana – Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión, Editorial Gustavo Serrano, Loja, Ecuador
- Manni F, Guérard E, Heyer E (2004): Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76: 173–190.
- Mannise N, Trovati RG, Duarte JMB, Maldonado JE, González S (2018): Using non-invasive genetic techniques to assist in maned wolf conservation in a remnant fragment of the Brazilian Cerrado. *Animal Biodiversity and Conservation* 41(2): 315–319.
- Mantel N (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Marciano-Jr E, Lantyer-Silva AS, Solé M (2017): A new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic Forest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 4238: 135–142.
- Marčić Z, Buj I, Duplić A, Čaleta M, Mustafić P, Zanella D, Zupančić P, Mrakovčić M (2011): A new endemic cyprinid species from the Danube drainage. *Journal of Fish Biology* 79(2): 418–430.
- Marmonier P, Vervier P, Giber J, Dole-Olivier MJ (1993): Biodiversity in ground waters. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 392–395.
- Martínez-Solano I, Gonçalves HA, Arntzen JW, García-París M (2004): Phylogenetic relationships and biogeography of midwife toads (Discoglossidae: *Alytes*). *Journal of Biogeography* 31: 603–618.

- Martini AMZ, Fiaschi P, Amorim AM, Paixão JL (2007): A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 16: 3111–3128.
- McCann C (1961): The introduced frogs of New Zealand. *Tuatara* 8: 107–120.
- McCarthy MA, Parris KM (2004): Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology* 40: 780–786.
- McDonald KR, Rowley JLL, Richards SJ, Frankham GJ (2016): A new species of treefrog (*Litoria*) from Cape York Peninsula, Australia. *Zootaxa* 4171: 153–169.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA (2010): The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20(9): 1297–1303.
- McKinney ML, Lockwood JL (1999): Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 450–453.
- McLaughlin JF, Hellmann JJ, Boggs CL, Ehrlich PR (2002): Climate change hastens population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6070–6074.
- Meegaskumbura M, Bossuyt F, Pethiyagoda R, Manamendra-Arachchi K, Bahir M, Milinkovitch MC, Méhely L (1918): Fauna Regni Hungariae (Reptilia et Amphibia). Királyi Magyar Természettudományi Társulat, 13 pp.
- Mendoza ÁM, Ospina OE, Cárdenas-Henao H, García-R JC (2015): A likelihood inference of historical biogeography in the world's most diverse terrestrial vertebrate genus: diversification of direct-developing frogs (Craugastoridae: *Pristimantis*) across the Neotropics – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85: 50–58.
- Ministério do Meio Ambiente, MMA (2000): Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília, Brazil, 40 pp.
- Molnár P (2001): *Alpesi götte (Triturus alpestris* Laurenti, 1768) populációk morfológiái és élőhelypreferencia vizsgálat a hazai előfordulási területein. MSc thesis, University of Debrecen, 50 pp.
- Monmonier MS (1973): Maximum-difference barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* 5: 245–261.
- Morellato LPC, Haddad CFB (2000): Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786–792.
- Mráz P, Ronikier M (2016): Biogeography of the Carpathians: evolutionary and spatial facets of biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society* 119: 528–559.
- Müller J, Müller K, Neinhuis C, Quandt D (2010): PhyDe: Phylogenetic Data Editor, v 0.9971. Elérhető: <http://www.phyde.de>. Letöltve 2021 július 20.
- Mungomery RW (1935): The giant American toad (*Bufo marinus*). *Cane Growers' Quarterly Bulletin* 3: 21–27.
- Myers CW, Duellmann WE (1982): A new species of Hyla from Cerro Colorado, and other tree frog records and geographical notes from Western Panama. *American Museum Novitates* 2752: 1–32.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000): Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015): IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32: 268–274.
- Niedzicka M, Fijarczyk A, Dudek K, Stuglik M, Babik W (2016): Molecular Inversion Probes for targeted resequencing in non-model organisms. *Scientific Reports* 6: 24051.
- Nunes I, Santiago RS, Juncá FA (2007): Advertisement calls of four hylid frogs from the state of Bahia, northeastern Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology* 2: 89–96.
- Olden JD, Poff NL (2004): Ecological processes driving biotic homogenization: Testing a mechanistic model using fish faunas. *Ecology* 85: 1867–1975.
- Opdam P, Wascher D (2004): Climate change meets habitat fragmentation: Linking landscape and biogeographical scale levels in research and conservation. *Biological Conservation* 117: 285–297.
- Ordóñez-Delgado L, Ramón-Vivanco C, Ortiz-Chalan V (2019): Revisión sistemática del estado del conocimiento de los vertebrados del Parque Nacional Podocarpus. *La Granja* 30: 7–18.
- Ordóñez-Delgado L, Székely P, Székely D, Serrano F, Armijos-Ojeda D (2020): Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios del Abra de Zamora. Universidad Técnica Particular de Loja and Naturaleza & Cultura Internacional, Ecuador
- Ortega-Andrade HM, Blanco MR, Cisneros-Heredia DF, Arévalo NG, de Vargas-Machuca KGL, Sánchez-Nivicela JC et al. (2021): Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLOS ONE* 16: e0251027.
- Ortega-Andrade HM, Rodes Blanco M, Cisneros-Heredia DF et al. (2021): Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLOS ONE* 16: e0251027.
- Ortega-Andrade HM, Rojas-Soto OR, Valencia JH, de los Monteros AE, Morrone JJ, Ron SR, Cannatella DC (2015): Insights from integrative systematics reveal cryptic diversity in *Pristimantis* frogs (Anura: Craugastoridae) from the Upper Amazon Basin. *PLOS ONE* 10: e0143392.
- Osborne WS, Littlejohn MJ, Thomson SA (1996): Former distribution and apparent disappearance of the *Litoria aurea* complex from the Southern Tablelands of New South Wales and the Australian Capital Territory. *Australian Zoologist* 30: 190–198.

- Pabijan M, Wandycz A, Hofman S, Wecek K, Piwczyński M, Szymura JM (2013): Complete mitochondrial genomes resolve phylogenetic relationships within *Bombina* (Anura: Bombinatoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 63–74.
- Pabijan M, Zieliński P, Dudek K, Chloupek M, Sotiropoulos K, Liana M, Babik W (2015): The dissection of a Pleistocene refugium: Phylogeography of the smooth newt, *Lissotriton vulgaris*, in the Balkans. *Journal of Biogeography* 42: 671–683.
- Pabijan M, Zieliński P, Dudek K, Stuglik M, Babik W (2017): Isolation and gene flow in a speciation continuum in newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 116: 1–12.
- Padial JM, De la Riva I (2009): Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155: 97–122.
- Padial JM, Grant T, Frost DR (2014): Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825: 1–132.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M (2010): Review: The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 1–14.
- Páez NB, Ron SR (2019): Systematics of *Huicundomantis*, a new subgenus of *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) with extraordinary cryptic diversity and eleven new species. *ZooKeys* 868: 1–112.
- Palumbi SR, Martin AP, Romano SL, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991): The Simple Fool's Guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu: 24 pp.
- Papp MG, Papp COG (2000): Decline in a population of the treefrog *Phyllodytes luteolus* after fire. *Herpetological Review* 31: 93–95.
- Parker HW (1932): II.—Some new or rare reptiles and amphibians from Southern Ecuador. *Annals and Magazine of Natural History* 9: 21–26.
- Parker HW (1934): XXV.—Reptiles and amphibians from Southern Ecuador. *Annals and Magazine of Natural History* 14: 264–273.
- Parker HW (1938): The vertical distribution of some reptiles and amphibians in southern Ecuador. *Annals and Magazine of Natural History* 2: 438–450.
- Parzefall J, Durand JP, Sket B (1993): *Proteus anguinus* LAURENTI, 1768 – Grottenolm. In: Parzefall J, Durand JP, Sket B (Eds). *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. 4/1 Schwanzlurche (Urodela) I*. Wiesbaden: Aula-Verlag: 57–76.
- Peakall R, Smouse PE (2006): GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288–295.
- Peakall R, Smouse PE (2012): GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Pecsenye K, Tóth A, Bereczki J, Tóth JP, Katona G, Varga Z (2018): Surprising diversity in the Pannonian populations of Marsh Fritillary (*Euphydryas aurinia*, Lepidoptera: Nymphalidae): Morphometric and molecular aspects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56: 519–532.
- Pecsenye K, Tóth J, Bereczki J, Szolnoki N, Varga Z (2015): Genetic structure of *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera: Papilionidae) populations in the Carpathian Basin. *Organisms Diversity Evolution* 16: 809–819.
- Pecsenye K, Tóth JP, Bereczki J, Szolnoki N, Juhász E, Varga Z (2016): Genetic structure of *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera: Papilionidae) populations in the Carpathian Basin. *Organisms Diversity & Evolution* 16(4): 809–819.
- Pécskay Z, Lexa J, Szakács A, Balogh K, Seghedi I, Konecny V, Kovács M, Márton E, Kaliciak M, Sefara SV, Póka T, Gyarmati P, Edelstein O, Rosu E, Zec B (1995): Space and time distribution of Neogene-Quaternary volcanism in the Carpatho-Pannonian Region. *Acta Vulcanologica* 7: 15–28.
- Peixoto OL (1995): Associação de anuros a bromeliáceas na Mata Atlântica. *Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida, Seropédica* 17: 75–83.
- Peixoto OL, Caramaschi U, Freire EMX (2003): Two new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the State of Alagoas, Northeastern Brazil. *Herpetologica* 59: 235–246.
- Pepper M, Keogh JS, Chapple DG (2016): Molecular biogeography of Australian and New Zealand reptiles and amphibians. In: Ebach MC (Ed), *Handbook of Australasian Biogeography*. Boca Raton: CRC Press: 295–328
- Perry GH, Marioni JC, Melsted P, Gilad Y (2010): Genomic-scale capture and sequencing of endogenous DNA from feces. *Molecular Ecology* 19: 5332–5344.
- Pfenninger M, Schwenk K (2007): Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7: 121.
- Pichlmüller F, Straub C, Helfer V (2013): Skin swabbing of amphibian larvae yields sufficient DNA for efficient sequencing and reliable microsatellite genotyping. *Amphibia-Reptilia* 34: 517–523.
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP (2014): Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol Ecol Resour* 14: 109–115.
- Pilliod DS, Goldberg CS, Laramie MB, Waits LP (2013): Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species. *US Geological Survey Fact Sheet 20123146*: 4 pp.
- Pop AA, Pop VV, Csuzdi C (2010): Significance of the Apuseni Mountains (the Carpathians) in the origin and distribution of Central European earthworm fauna (Oligochaeta: Lumbricidae). *Zoology in the Middle East* 51: 89–110.

- Popart 1.7 [Online] (Elérhető: <http://popart.otago.ac.nz>)
- Posada D (2008): jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Posada D (2011): Collapse: Describing haplotypes from sequence alignments. [Online] (Elérhető: <http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html>)
- Pounds JA, Fogden MPL, Campbell JH (1999): Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398: 611–615.
- Pramuk JB, Kadivar F (2003): A new species of *Bufo* (Anura: Bufonidae) from southern Ecuador. *Herpetologica* 59: 270–283.
- Presti FT, Meyer J, Antas PTZ, Guedes NMR, Miyaki CY (2013): Non-invasive genetic sampling for molecular sexing and microsatellite genotyping of hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Genetics and Molecular Biology* 36: 129–133.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010): FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLOS ONE* 5: e9490.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Puechmaille SJ (2016): The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources* 16: 608–627.
- Pyke GH (2002): A review of the biology of the southern bell frog *Litoria raniformis* (Anura: Hylidae). *Australian Zoologist* 32: 32–48.
- Pyke GH, White AW, Bishop PJ, Waldman B (2002): Habitat-use by the green and golden bell frog *Litoria aurea* in Australia and New Zealand. *Australian Zoologist* 32: 12–31.
- QGIS (2021): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project
- Raffaëlli J (2018): Proposal for a new taxonomic arrangement of *Ichthyosaura alpestris* (Laurenti 1768) (Urodela Salamandridae), an iconic species with a complex phylogenetic structure. *Alytes* 36: 178.
- Rahbek C, Bloch H, Poulsen M, Rasmussen J (1995): The avifauna of the Podocarpus National Park – the “Andean jewel in the crown” of Ecuador’s protected areas. *Ornitologia Neotropical* 6: 113–120.
- Rahel F J (2002): Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 291–315.
- Raxworthy C J (1990): Review of the Smooth newt (*Triturus vulgaris*) subspecies, including an identification key. *The Herpetological Journal* 1(11): 481–492.
- Raymond M, Rousset F (1995): GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Rebelo R, Leclair M H (2003): Site tenacity in the terrestrial salamandrid *Salamandra salamandra*. *Journal of Herpetology* 37: 440–445.
- Recknagel H, Zakšek V, Delić T, Gorički Š, Trontelj P (2024): Multiple transitions between realms shape relict lineages of *Proteus* cave salamanders. *Molecular Ecology* 33: e16868.
- Recuero E, Buckley D, García-Paris M, Arntzen J W, Cogălniceanu D, Martínez-Solano I (2014): Evolutionary history of *Ichthyosaura alpestris* (Caudata Salamandridae) inferred from the combined analysis of nuclear and mitochondrial markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 81: 207–220.
- Recuero E, Martínez-Solano I (2002): *Triturus alpestris* (Laurenti 1768). Triton alpino. Pp. 58–60. In: Pleguezuelos J M, Márquez R, Lizana M (Eds): Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española, Madrid
- Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, Patmore J R M, Gough K C (2014): The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51: 1450–1459.
- Renner SS (2016): Return to Linnaeus’s focus on diagnosis not description: the use of DNA characters in the formal naming of species. *Systematic Biology* 65: 1085–1095.
- Reuther A U, Urdea P, Geiger C, Ivy-Ochs S, Niller H-P, Kubik P W, Heine K (2007): Late Pleistocene glacial chronology of the Pietrele Valley Retezat Mountains Southern Carpathians constrained by ¹⁰Be exposure ages and pedological investigations. *Quaternary International* 164–165: 151–169.
- Reyes-Puig C, Reyes-Puig J P, Velarde-Garcéz A D, Dávalos N, Mancero E, Navarrete M J, et al. (2019): A new species of terrestrial frog *Pristimantis* (Strabomantidae) from the upper basin of the Pastaza River Ecuador. *ZooKeys* 832: 113–133.
- Reyes-Puig J P, Yáñez-Muñoz M H, Libke Z, Vinuesa P, Carrión-Olmedo J C (2024): Phylogenetic diversity of the *Pristimantis anaiae* species group with a description of a new species of *Pristimantis* (Anura Strabomantidae) from Cerro Candelaria Tungurahua Ecuador. *Evolutionary Systematics* 8: 101–118.
- Ribeiro M C, Metzger J P, Martensen A C, Ponzoni F J, Hirota M M (2009): The Brazilian Atlantic Forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Ringler E (2018): Testing skin swabbing for DNA sampling in dendrobatid frogs. *Amphibia-Reptilia* 39(2): 245–251.

- Roberto IJ, Ávila RW (2013): The advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Peixoto Caramaschi & Freire 2003 (Anura Hylidae). *Zootaxa* 3669: 193–196.
- Robinson CT, Tockner K, Ward JV (2002): The fauna of dynamic riverine landscapes. *Freshwater Biology* 47: 661–677.
- Robinson M (1993): A field guide to frogs of south eastern Australia. From Port Augusta to Fraser Island including Tasmania. Australian Museum / Reed Books Chatswood. 112 pp.
- Roček Z (1974): Biometrical investigations of Central European populations of the Alpine newt *Triturus alpestris* (Laurenti 1768) (Amphibia Urodela). *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 5–6: 295–373.
- Roček Z, Joly P, Grossenbacher K (2003): *Triturus alpestris* (Laurenti 1768) – Bergmolch. Pp. 607–656. In: Grossenbacher K, Tiesmeier B (Eds): *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas; Band 4/IIA Schwanzlurche (Urodela) IIA Salamandridae II: Triturus I*. Aula-Verlag Wiebelsheim.
- Rodriguez D, Becker C G, Pupin N C, Haddad C F B, Zamudio K R (2014): Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology* 23: 774–787.
- Romero A (2011): The evolution of cave life. *American Scientific* 99: 144–151.
- Ron SR, Merino-Viteri A, Ortiz DA (2019): Anfíbios del Ecuador. Version 2019.0, Letöltve 2021. június 16., Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Elérhető: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
- Ron SR, Santos JC, Cannatella DC (2006): Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 392–403.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rouch R, Danielopol DL (1997): Species richness of microcrustacea in subterranean freshwater habitats. Comparative analysis and approximate evaluation. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 82: 121–145.
- Rousset F (1997): Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219–1228.
- Rowe G, Harris DJ, Beebe TJC (2006): Lusitania revisited: a phylogeographic analysis of the natterjack toad *Bufo calamita* across its entire biogeographical range. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39(2): 335–346.
- Rowley J, Mahony MJ, Hines HB, Myers S, Aplin KP, Price L, Donnellan SC (2021): Two new species from the *Litoria rubella* species group from eastern Australia. *Zootaxa* 5071: 1–41.
- Rowley JLL, Callaghan CT, Cutajar T, Portway C, Potter K, Mahony S, Trembath DF, Flemons P, Woods A (2019): FrogID: Citizen scientists provide validated biodiversity data on frogs of Australia. *Herpetological Conservation and Biology* 14: 155–170.
- Royle JA, Kéry M (2007): A Bayesian state-space formulation of dynamic occupancy models. *Ecology* 88: 1813–1823.
- Ruiz-González A, Madeira María José, Randi E, Abramov AV, Davoli F, Gómez-Moliner BJ (2013): Phylogeography of the forest-dwelling European pine marten (*Martes martes*): new insights into cryptic northern glacial refugia. *Biological Journal of the Linnean Society* 109(1): 1–18.
- Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS (2019): Past, present and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and application of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547.
- Saarma U, Ho SYW, Pybus OG, Kaljuste M, Tumanov IL, Kojola I, Vorobiev AA, Markov NI, Saveljev AP, Valdmann H, Lyapunova EA, Abramov AV, Mannil P, Korsten M, Vulla E, Pazetnov SV, Pazetnov VS, Putschkovskiy SV, Rokov AM (2007): Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in northeastern Europe and a new time frame for the formation of European brown bear lineages. *Molecular Ecology* 16: 401–413.
- Sadler RA, Pressey RL (1994): Reptiles and amphibians of particular conservation concern in the western division of New South Wales – a preliminary review. *Biological Conservation* 69: 41–54.
- Safi K, Armour-Marshall K, Baillie JEM, Isaac NJB (2013): Global patterns of evolutionary distinct and globally endangered amphibians and mammals. *PLoS ONE* 8: e63582.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH (2000): Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770–1774.
- Sánchez-Nivicela JC, Urgiles VL, Cedeño-Palacios J, Abad-Peñañiel H, Guayasamin JM (2021): Una fantástica nueva especie del grupo *Pristimantis orcesi* de los Andes sur de Ecuador. *Neotrop Biodivers* 6: 224–237
- Sanders MG (2021): Photographic field guide to Australian frogs. CSIRO Publishing. 376 pp.
- Santos LO, Costa RN, Solé M, Orrico VGD (2019): The tadpole of *Phyllodytes praeceptor* (Anura: Hylidae). *Zootaxa* 4623: 381–386.
- Schlegel P, Bulog B (1997): Population-specific behavioral electrosensitivity of the European blind cave salamander, *Proteus anguinus*. *Journal of Physiology Paris* 91: 75–79.
- Schmidt B, Schaub M, Steinfartz S (2007): Apparent survival of the salamander *Salamandra salamandra* is low because of high migratory activity. *Frontiers in Zoology* 4: 19.

- Schmidt BR, Kéry M, Ursenbacher S, Hyman OJ, Collins JP (2013): Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 646–653.
- Schmidt P, Weddelling K, Thomas M, Rottscheidt R, Tarkhnishvili D, Hachtel M (2006): Dispersal of *Triturus alpestris* and *T. vulgaris* in agricultural landscapes – comparing estimates from allozyme markers and capture-mark-recapture analysis. Proceedings of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica, Bonn.
- Schmitt T (2007): Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 11.
- Schmitt T, Seitz A (2001): 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 (2012): Extra-Mediterranean refugia: the rule and not the exception? *Frontiers in Zoology* 9: 22.
- Schneider CJ (2002): Sri Lanka: An amphibian hot spot. *Science* 298: 379–379.
- Schneider K, Culver DC (2004): Estimating subterranean species richness using intensive sampling and rarefaction curves in a high density cave region in West Virginia. *Journal of Cave and Karst Studies* 66: 39–45.
- Schulte U, Küsters D, Steinfartz S (2007): A PIT tag based analysis of annual movement patterns of adult fire salamanders (*Salamanca salamandra*) in a Middle European habitat. *Amphibia-Reptilia* 28: 531–536.
- Schultz MA (2008): Distribution and detectability of the southern bell frog *Litoria raniformis* in the South Australian River Murray floodplain. *Australian Zoologist* 34: 438–445.
- Scott IAW, Keogh S (2003): Genetic variability within and between populations of Corangamite water skink (*Eulamprus tympanum mariniae*) and Southern water skink (*Eulamprus tympanum tympanum*) in Western Victoria. Report to Natural Resources and Environment, Victoria, Australia.
- Segalla MV, Caramaschi U, Cruz CAG, Grant T, Haddad CFB, Garcia PCA, et al. (2016): Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira* 5: 34–46.
- Selkoe KA, Scribner KT, Galindo HM (2015): Waterscape genetics – applications of landscape genetics to rivers, lakes, and seas. In: Balkenhol N, Cushman SA, Storfer AT, Waits LP (Eds): *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*. John Wiley & Sons Ltd: 220–246.
- Sessions S, Bulog B, Mali LB (2015): The phoenix rises: reversal of cave adaptations in the blind cave salamander, *Proteus anguinus*? *The FASEB Journal* 29: LB36.
- Shaw G (1802): General zoology or systematic natural history. Volume III, Part 1. Amphibia. London: Thomas Davison.
- Shaw JLA, Clarke LJ, Wedderburn SD, Barnes TC, Weyrich LS, Cooper A (2016): Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation* 197: 131–138.
- Shutler D, Weatherhead PJ (1992): Surplus territory contenders in male red-winged blackbirds: where are the desperados? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 31: 97–106.
- Sillero N, Campos J, Bonardi A, Corti C, Creemers R, Crochet PA, Isailovic JC, Denoel M, Ficetola GF, Gonçalves J, Kuzmin S, Lymberakis P, de Pous P, Rodriguez A, Sindaco R, Speybroeck J, Toxopeus B, Vieites DR, Vences M (2014): Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 35: 1–31.
- Simon JE, Gasparini JL (2003): Descrição da vocalização de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto e Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitao* 16: 47–54.
- Simon JE, Peres J (2012): Revisão da distribuição geográfica de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto & Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitao* 29: 17–30.
- Sket B (1997): Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: Proteidae) and its possible explanation. *Journal of Biogeography* 24: 263–280.
- Sket B, Arntzen JW (1994): A black, non-troglomorphic amphibian from the karst of Slovenia: *Proteus anguinus parkelj* n. ssp. (Urodela: Proteidae). *Bijdragen tot de Dierkunde* 64: 33–53.
- Sket B, Paragamian K, Trontelj P (2004): A census of the obligate subterranean fauna of the Balkan Peninsula. In: Sket B, Paragamian K, Trontelj P (Eds). *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Dordrecht: Springer. pp. 309–322.
- Sommer RS, Benecke N (2005): The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. *Mammal Review* 35(2): 156–164.
- Sommer RS, Nadachowski A (2006): Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review* 36(4): 251–265.
- SOS Mata Atlântica (2014): Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica 2013–2014. São Paulo, Brazil. Elérhető: <http://mapas.sosma.org.br> (Letöltve 2016 December 29)
- Sotiropoulos K, Eleftherakos K, Džukić G, Kalezić ML, Legakis A, Polymeni RM (2007): Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 211–226.

- Sotiropoulos K, Eleftherakos K, Kalezić ML, Legakis A, Polymeni RM (2008): Genetic structure of the alpine newt, *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), in the southern limit of its distribution: implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 297–311.
- Sotiropoulos K, Tomović L, Džukić G, Kalezić ML (2001): Morphological differentiation of the alpine newt (*Triturus alpestris*) in the Balkans: taxonomic implications. *The Herpetological Journal* 11: 1–8.
- Speybroeck J, Beukema W, Crochet PA (2010): A tentative species list of the European herpetofauna (Amphibia and Reptilia) – an update. *Zootaxa* 2492: 1–27.
- Speybroeck J, Beukema W, Dufresnes C, Fritz U, Jablonski D, Lymberakis P, Martínez-Solano I, Razzetti E, Vamberger M, Vences M, Vörös J, Crochet PA (2020): Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. *Amphibia-Reptilia* 41: 139–189.
- Spolsky CM, Szymura JM, Uzzell T (2006): Mapping Bombina mitochondrial genomes: the conundrum of Carpathian *Bombina variegata* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44(1): 100–104.
- Staden R, Judge D, Bonfield J (2003): Analyzing sequences using the staden package and EMBOSS. In: Krawetz S, Womble D (Eds). *Introduction to Bioinformatics*. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 393–410.
- Steinfartz S, Kusters D, Tautz D (2004): Isolation and characterization of polymorphic tetranucleotide microsatellite loci in the fire salamander *Salamandra salamandra* (Amphibia: Caudata). *Molecular Ecology Notes* 4: 626–628.
- Steinfartz S, Veith M, Tautz D (2000): Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Molecular Ecology* 9: 397–410.
- Steinfartz S, Weitere M, Tautz D (2007): Tracing the first step to speciation: ecological and genetic differentiation of a salamander population in a small forest. *Molecular Ecology* 16: 4550–4561.
- Stewart JR, Lister AM (2001): Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* 16(11): 608–613.
- Stiver KA, Fitzpatrick J, Desjardins JK, Balshine S (2006): Sex differences in rates of territory joining and inheritance in a cooperatively breeding cichlid fish. *Animal Behaviour* 71: 449–456.
- Straub C, Pichlmüller F, Helfer V (2015): Population genetics of fire salamanders in a pre-Alpine urbanized area (Salzburg, Austria). *Salamandra* 51: 1–7.
- Stuart BL, Inger RF, Voris HK (2006): High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biology Letters* 2: 470–474.
- Sümeği P, Gulyás S, Jakab G (2008): Holocene paleoclimatic and paleohydrological changes in Lake Balaton as inferred from a complex quantitative environmental historical study of a lacustrine sequence of the Szigliget embayment. *Documenta Praehistorica* 35: 33–43.
- Sunnucks P (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199–203.
- Szabó K, Vörös J (2014): Distribution and hybridization of *Anguis fragilis* and *A. colchica* in Hungary. *Amphibia-Reptilia* 35: 135–140.
- Székely P, Eguiguren JS, Ordóñez-Delgado L, Armijos-Ojeda D, Székely D (2020): Fifty years after: a taxonomic revision of the amphibian species from the Ecuadorian biodiversity hotspot Abra de Zamora, with description of two new *Pristimantis* species. *PLOS ONE* 15:e0238306.
- Székely P, Eguiguren JS, Székely D, Ordóñez-Delgado L, Armijos-Ojeda D, Riofrío-Guamán ML, Cogălniceanu D (2018): A new minute *Pristimantis* (Amphibia: Anura: Strabomantidae) from the Andes of southern Ecuador. *PLOS ONE* 13:e0202332.
- Szymura JM, Barton NH (1986): Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *Bombina variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution* 40:1141–1159
- Tabarelli M, Cardoso da Silva JM, Gascon C (2004): Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. *Biodiversity and Conservation* 13: 1419–1425.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.
- Taberlet P, Waits L, Luikart G (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 323–327.
- Takahashi M, Saccò M, Kestel JH, Nester G, Campbell MA, van der Heyde M, Heydenrych MJ, Juszkiewicz DJ, Nevill P, Dawkins KL, Bessey C, Fernandes K, Miller H, Power M, Mousavi-Derazmahalleh M, Newton JP, White NE, Richards ZT, Allentoft ME (2023): Aquatic environmental DNA: a review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of the Total Environment* 873: 162322.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Taylor CM, Keppel G, O’Sullivan S, Peters S, Kerr GD, Williams CR (2020): Indiscriminate feeding by an alien population of the spotted-thighed frog (*Litoria cyclorhyncha*) in southern Australia and potential impacts on native biodiversity. *Australian Journal of Zoology* 67: 59–72.

- Theissinger K, Bálint M, Feldheim KA, Haase P, Johannesen J, Laube I, Pauls SU (2013): Glacial survival and post-glacial recolonization of an arctic–alpine freshwater insect (*Arcynopteryx dichroa*, Plecoptera, Perlodidae) in Europe. *Journal of Biogeography* 40: 236–248.
- Themudo GE, Arntzen JW (2007): Newts under siege: range expansion of *Triturus pygmaeus* isolates populations of its sister species. *Diversity and Distributions* 13: 580–586.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, de Siqueira MF, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Townsend Peterson A, Phillips OL, Williams SE (2004): Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145–148.
- Thomas L, Buckland ST, Rexstad EA, Laake JL, Strindberg S, Hedley SL, Bishop JRB, Marques TA, Burnham KP (2010): Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. *Journal of Applied Ecology* 47: 5–14.
- Thompson CF (1977): Experimental removal and replacement of territorial male Yellow-breasted chats. *The Auk* 94: 107–113.
- Thompson SA, Littlejohn MJ, Robinson WA, Osborne WS (1996): Taxonomy of the *Litoria aurea* complex: a re-evaluation of the Southern Tableland populations of the Australian Capital Territory and New South Wales. *Australian Zoologist* 30: 158–169.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012a): Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7: e41732.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MT, Orlando L, Willerslev E (2012b): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565–2573.
- Thomsen PF, Willerslev E (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4–18.
- Thomson GM (1922): *The Naturalisation of Animals and Plants in New Zealand*. Cambridge University Press, Cambridge
- Thurley T, Bell BD (1994): Habitat distribution and predation on a western population of terrestrial *Leiopelma* (Anura: Leiopelmatidae) in the northern King Country, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* 21: 431–436.
- Toledo LF, Martins IA, Bruschi DP, Passos MA, Alexandre C, Haddad CFB (2015): The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta Ethologica* 18: 87–99.
- Tóth Z, Mihók F, Nemesházi E (2021): Genetic differentiation over a small spatial scale in the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*). *Herpetological Journal* 31: 61–69.
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ (2016): W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44(W1): W232–W235.
- Trócsányi B, Schäffer D, Korsós Z (2007): A review of the amphibian and reptile fauna of Mecsek Mountains, with new herpetofaunistic data (SW Hungary). *Acta Naturalia Pannonica* 2: 189–206.
- Trontelj P, Douady CJ, Fišer C, Gibert J, Gorički Š, Lefébure T, Sket B, Zakšek V (2009): A molecular test for cryptic diversity in ground water: How large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology* 54(4): 727–740.
- Trontelj P, Gorički Š, Polak S, Verovnik R, Zakšek V, Sket B (2007): Age estimates for some subterranean taxa and lineages in the Dinaric Karst. *Acta Carsologica* 36(1): 183–189.
- Tyler MJ (1997): *The Action Plan for Australian Frogs*. Wildlife Australia, Environment Australia, Commonwealth Department of Environment, Sport and Territories, Canberra
- Tyler MJ, Davies M (1978): Species-groups within the Australopapuan hyloid frog genus *Litoria* Tschudi. *Australian Journal of Zoology, Supplementary Series, Number 63*: 1–47.
- Tzedakis PC, Emerson BC, Hewitt GM (2013): Cryptic or mystic? Glacial tree refugia in northern Europe. *Trends in Ecology & Evolution* 28(12): 696–704.
- Uiblein F, Durand JP, Juberthie C, Parzefall J (1992): Predation in caves: the effects of prey immobility and darkness on the foraging behaviour of two salamanders, *Euproctus asper* and *Proteus anguinus*. *Behavioural Processes* 28: 33–40.
- Ulloa C, Acevedo-Rodríguez P, Beck S, Belgrano MJ, Bernal R, Berry PE et al. (2017): An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science* 358: 1614–1617.
- Urgilés VL, Sánchez-Nivicela JC, Nieves C, Yáñez-Muñoz MH (2014): Terrestrial frogs in southern Andean ecosystems of Ecuador I: Two new species of *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) of the eastern versant. *Avances en Ciencias e Ingenierías Sección B* Quito 6: 51–59.
- Urgilés VL, Székely P, Székely D, Christodoulides N, Sánchez-Nivicela JC, Savage AE (2019): Genetic delimitation of *Pristimantis orestes* (Lynch, 1979) and *P. saturninoi* Brito et al 2017 and description of two new terrestrial frogs from the *Pristimantis orestes* species group (Anura, Strabomantidae). *ZooKeys* 864: 111–146.
- Ursenbacher S, Carlsson M, Helfer V, Tegelström H, Fumagalli L (2006): Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 15: 3425–3437.

- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004): MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Varga Z (1995): Geographic patterns of biological diversity in the Palearctic region and the Carpathian Basin. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 41: 71–92.
- Varga Z (2010): Extra-Mediterranean Refugia, Post-Glacial Vegetation History and Area Dynamics in Eastern Central Europe. In: Habel JC & Assmann T (Eds): *Relict species: Phylogeography and Conservation Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 57–87.
- Varga Z (2019): *Biogeográfia – az élet földrajza*. Pars Kft., Nagykovács, 610 pp
- Veitch CR, Clout MN (2002): Turning the tide: the eradication of invasive species. *Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission* 27: 1–3.
- Veith M, Steinfartz S, Zardoya R, Seitz A, Meyer A (1998): A molecular phylogeny of ‘true’ salamanders (family Salamandridae) and the evolution of terrestriality of reproductive modes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 36: 7–16.
- Velo-Antón G, Chambers EA, Poyarkov NA Jr, Canestrelli D, Bisconti R, Naumov B, Benítez MJF, Borisenko A, Martínez-Solano I (2023): COI barcoding provides reliable species identification and pinpoints cryptic diversity in Western Palearctic amphibians. *Amphibia-Reptilia* 44(4): 399–413.
- Vences M, Sanchez E, Hauswaldt JS, Eikermann D, Rodriguez A, Carranza S, Donaire D, Gehara M, Helfer V, Lötters S, Werner P, Schulz S, Steinfartz S (2014): Nuclear and mitochondrial multilocus phylogeny and survey of alkaloid content in true salamanders of the genus *Salamandra* (Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73: 208–216.
- Venczel M, Codrea VA (2018): A new proteid salamander from the early Oligocene of Romania with notes on the paleobiogeography of Eurasian proteids. *Journal of Vertebrate Paleontology* 38(5): e1508027.
- Venegas PJ, Duellman WE (2012): Two syntopic new species of the *Pristimantis orestes* group (Anura: Strabomantidae) from northwestern Peru. *Zootaxa* 3249: 47–59.
- Vernesi C, Hoban SM, Pecchioli E, Crestanello B, Bertorelle G, Rosà R, Hauffe HC (2015): Ecology, environment and evolutionary history influence genetic structure in five mammal species from the Italian Alps. *Biological Journal of the Linnean Society* 117(3): 428–446.
- Verovnik R, Sket B, Prevorcnik S, Trontelj P (2003): Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Genetica* 119: 155–165.
- Verovnik R, Sket B, Trontelj P (2004): Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology* 13: 1519–1532.
- Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M (2009): Vast underestimation of Madagascar’s biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8267–8272.
- Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M (2009): Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 8267–8272.
- Vines TH, Köhler SC, Thiel M, Ghira I, Sands TR, MacCallum CJ, Barton NH, Nürnberger B (2003): The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Evolution* 57: 1876–1888.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997): Human domination of Earth’s ecosystems. *Science* 277: 494–499.
- Voituron Y, De Fraipont M, Issartel J, Guillaume O, Clobert J (2011): Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms. *Biology Letters* 7: 105–107.
- Vörös J, Alcobendas M, Martínez-Solano M, García-París M (2006): Evolution of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Anura: Discoglossidae) in the Carpathian Basin: A history of repeated mt-DNA introgression across species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 705–718.
- Vörös J, Arntzen JW (2010): Weak population structuring in the Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*, inferred from allozymes. *Amphibia-Reptilia* 31: 339–346.
- Vörös J, Herczeg D, Fülöp A, Gál JT, Dán Á, Harnos K, Bosch J (2018): *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hungary: a review of recent and historical occurrence. *Acta Herpetologica* 13: 125–140.
- Vörös J, Herczeg D, Papp T, Monsalve-Carcano C, Bosch J (2020): First detection of *Ranavirus* infection in Hungary: A survey of amphibians. *Herpetology Notes* 13: 213–217.
- Vörös J, Kiss I, Puky M (2014) Amphibian Declines and Conservation in Hungary. In: Heatwole H, Wilkinson JW (Eds) *Status of Decline of Amphibians: Eastern Hemisphere*. Amphibian Biology Vol 11. Pelagic Publishing, Exeter: 99–130.
- Vörös J, Major Á (2007): Phylogeography and species composition of the two *Bombina* species and the *Triturus cristatus* species complex in the Carpathian Basin. In: Forró L (Ed) *The origin of the fauna of the Carpathian Basin*. Hungarian Natural History Museum, Budapest: 269–282.
- Vörös J, Márton O, Schmidt BR, Gál TJ, Jelić D (2017): Surveying Europe’s only cave-dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA. *PLoS ONE* 12(1): e0170945.

- Vörös J, Mikulíček P, Major Á, Recuero E, Arntzen JW (2016a): Phylogeographic analysis reveals northerly refugia for the riverine amphibian *Triturus dobrogicus* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society* 119: 974–991.
- Vörös J, Mitchell A, Waldman B, Goldstien S, Gemmell N (2008): Crossing the Tasman Sea: Inferring the introduction history of *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* (Anura: Hylidae) from Australia into New Zealand. *Austral Ecology* 33: 623–629.
- Vörös J, Ursenbacher S, Jelić D (2019): Population genetic analyses using 10 new polymorphic microsatellite loci confirms genetic subdivision within the Olm, *Proteus anguinus*. *Journal of Heredity* 110(2): 211–218.
- Vörös J, Ursenbacher S, Kiss I, Jelic D, Schweiger S, Szabó K (2016b): Increased genetic structuring of isolated *Salamandra salamandra* populations (Caudata: Salamandridae) at the margins of the Carpathian Mountains. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 55: 138–149.
- Vukov T, Kalezić ML, Tomović L, Krizmanić I, Jović D, Labus N, Džukić G (2013): Amphibians in Serbia – distribution and diversity patterns. *Bulletin of the Natural History Museum* 6: 90–112.
- Waldman B, van de Wolfshaar KE, Klena JD, Andjic V, Bishop PJ, Norman RJD (2001): Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance* 28: 9–11.
- Wassens S (2008) Review of the past distribution and decline of the southern bell frog *Litoria raniformis* in New South Wales. *Australian Zoologist* 34: 446–452.
- Weisrock DW, Papenfuss TJ, Macey JR, Litvinchuk SN, Polymeni R, Ugurtas IH, Zhao E, Jowkar H, Larson A (2006): A molecular assessment of phylogenetic relationships and lineage accumulation rates within the family Salamandridae (Amphibia, Caudata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 368–383.
- Weygoldt P (1981): Beobachtungen zur Fortpflanzungsbiologie von *Phyllodytes luteolus* (Wied, 1824) im Terrarium (Amphibia: Salientia: Hylidae). *Salamandra* 17: 1–11.
- White AW, Pyke GH (1999): Past distribution of *Litoria aurea* and *Litoria castanea* in the Bathurst-Orange Area of New South Wales. *Herpetofauna* 29: 2–9.
- Wielstra B, Canestrelli D, Cvijanović M, Denoël M, Fijarczyk A, Jablonski D, Liana M, Naumov B, Olgun K, Pabijan M, Pezzarossa A, Popgeorgiev G, Salvi D, Si Y, Sillero N, Sotiropoulos K, Zieliński P, Babik W (2018): The distributions of the six species constituting the smooth newt species complex (*Lissotriton vulgaris* sensu lato and *L. montandoni*) – an addition to the New Atlas of Amphibians and Reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 39(2): 252–259.
- Wielstra B, Crnobrnja-Isailovic J, Litvinchuk SN, Reijnen BT, Skidmore AK, Sotiropoulos K, Toxopeus AG, Tzankov N, Vukov T, Arntzen JW (2013): Tracing glacial refugia of *Triturus* newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. *Frontiers in Zoology* 10: 1–12.
- Wielstra B, Sillero N, Vörös J, Arntzen JW (2014): The distribution of the crested and marbled newt species (Amphibia: Salamandridae: *Triturus*) – an addition to the New Atlas of Amphibians and Reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 35: 376–381.
- Wielstra B, Zieliński P, Babik W (2017): The Carpathians hosted extra-Mediterranean refugia-within-refugia during the Pleistocene Ice Age: genomic evidence from two newt genera. *Biological Journal of the Linnean Society* 122(3): 605–613.
- Wiens JJ, Coloma LA (1992) A new species of the *Eleutherodactylus myersi* (Anura: Leptodactylidae) assembly from Ecuador. *Journal of Herpetology* 26: 196–207.
- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD (2005): The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851.
- Williams P, Humphries C, Araújo M (1999): Mapping Europe's biodiversity. In: Delbaere B (Ed) *Facts and Figures on Europe's biodiversity, State and Trends 1998–1999*. ECNC, Tilburg: 12–20.
- Willis KJ, Braun M, Sümegi P, Tóth A (1997): Does soil change cause vegetation change or vice versa? A temporal perspective from Hungary. *Ecology* 78: 740–750.
- Willis KJ, Rudner ZE, Sümegi P (2000): Full glacial forests of Central and South Eastern Europe. *Quaternary Research* 53: 203–213.
- Willis KJ, van Andel TH (2004): Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369–2387.
- Yáñez-Muñoz MH, Veintimilla-Yáñez D, Batallas D, Cisneros-Heredia DF (2019): A new giant *Pristimantis* (Anura, Craugastoridae) from the páramos of the Podocarpus National Park, southern Ecuador. *ZooKeys* 852: 137–156.
- Zacho CM, Riemsdijk I, De Cashan B, Vörös J, Allentoft ME (2025): The Bombina hybrid zone: a review of the legacy and future research directions. *Amphibia-Reptilia*, nyomtatásban.
- Zakšek V, Konec M, Trontelj P (2017): First microsatellite data on *Proteus anguinus* reveal weak genetic structure between the caves of Postojna and Planina. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2017: 1–6.
- Zeisset I, Beebe TJ (2001): Determination of biogeographical range: an application of molecular phylogeography to the European pool frog *Rana lessonae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 933–938.
- Zhang P, Wake DB (2009): Higher-level salamander relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 492–508.

- Zieliński P, Dudek K, Arntzen JW, Palomar G, Niedzicka M, Fijarczyk A, Liana M, Cogălniceanu D, Babik W (2019): Differential introgression across newt hybrid zones: Evidence from replicated transects. *Molecular Ecology* 28(21): 4811–4824.
- Zieliński P, Nadachowska-Brzyska K, Dudek K, Babik W (2016): Divergence history of the Carpathian and smooth newts modelled in space and time. *Molecular Ecology* 25(16): 3912–3928.
- Zieliński P, Nadachowska-Brzyska K, Wielstra B, Szkotak R, Covaciu-Marcov SD, Cogălniceanu D, Babik W (2013): No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Molecular Ecology* 22(7): 1884–1903.
- Zuiderwijk A (1997): *Triturus alpestris* (Laurenti, 1768). In: Gasc JP, Cabela A, Crnobrnja-Isailović J, Dolmen D, Grossenbacher K, Haffner P, Lescure J, Martens H, Martínez Rica JP, Maurin H, Oliveira ME, Sofianidou TS, Veith M, Zuiderwijk A (Eds) Atlas of amphibians and reptiles in Europe. Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris: 72–73.
- Zumel D, Buckley D, Ron SR (2022): The *Pristimantis trachyblepharis* species group, a clade of miniaturized frogs: description of four new species and insights into the evolution of body size in the genus. *Zoological Journal of the Linnean Society* 195: 315–354.

