

A 'Genetikai polimorfizmus és földrajzi variabilitás kárpát-medencei endemikus lepke taxonok populációiban' c. OTKA pályázat (T 046612) zárójelentése

A pályázat célkitűzése az antropogén hatások eredményeként kialakuló habitat fragmentáció genetikai következményeinek tanulmányozása volt. Vizsgálataink során a genetikai változatosság szintjét és szerkezetét tártuk fel két Lycaenidae faj (*Aricia artaxerxes issekutzi* és *Plebejus sephirus*) populációiban. Eredményeink alapján megállapítottuk a differenciálódás mértékét és mintázatát a populációk között, vagyis felmértük a fragmentálódás és az izoláció hatását a variabilitás szerkezetére. Összefüggést kerestünk továbbá a populációk természetvédelmi státusza (habitat zavartsági szintje, populációméret, izoláció foka) és variabilitásuk mértéke között.

Minták

Aricia artaxerxes issekutzi – 2002 és 2004 között a Bükk-hegységben 3 populációból történt mintavétel (Zsidó-rét, Kecskeláb-rét, Nagymező). Az Aggteleki Karszt területéről a 3 év alatt összesen 22 minta származott 8 populációból (Tohonya-völgy, Szőlőhegy, Teresztenyei-fennsík, Ménes-völgy, Szelcepuszta, Dénes-töbör, Haragistya, Hacava).

Plebejus sephirus – 2001 és 2005 között 3 populációból történt mintavétel: Sóshartyán, Tokaj és Szentendrei-sziget. Ez utóbbi populációban csak 2001-ben történt gyűjtés. Így a 3 év alatt összesen 12 minta származott a 3 populációból.

Az enzim polimorfizmus vizsgálata

Aricia artaxerxes issekutzi – A variabilitás mértékét 19 enzim lokuszon vizsgáltuk, melyek közül 2-nél egyik mintában sem jelent meg alternatív allél. Egy lokuszon csak egy mintában találtunk alternatív allélt, míg 3 további esetében a legtöbb minta monomorfnak mutatkozott. Ugyanakkor számos lokuszon tapasztaltunk rendkívül magas allélszámot (8, 10, 11, sőt 20). Így az *A. artaxerxes issekutzi* teljes allélkészlete 126-nak adódott a 19 vizsgált lokuszon.

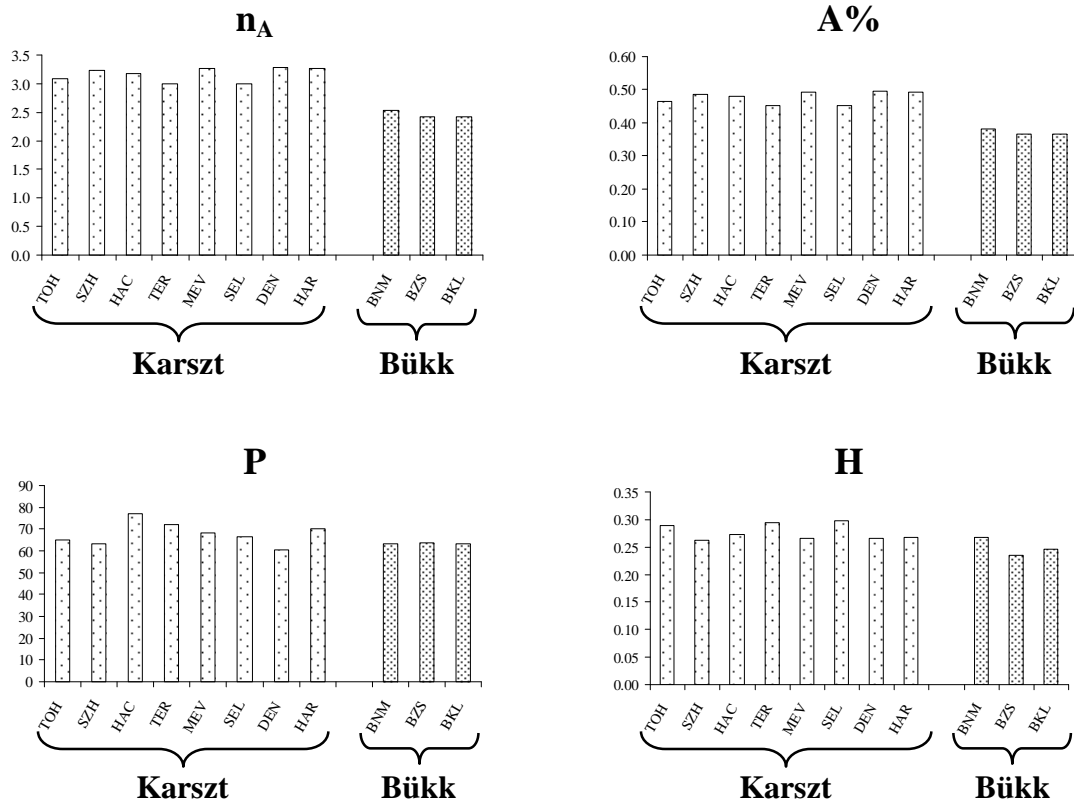
Plebejus sephirus – A variabilitás mértékét 14 enzim lokuszon vizsgáltuk, melyek közül kettőn egyik mintában sem jelent meg alternatív allél. Alacsony szintű variabilitást mutatott, egy további lokusz. Több lokuszon tapasztaltunk viszont relatíve magas allélszámot (5, 6 és 8). A *P. sephirus* teljes allélkészlete 55-nak adódott a 14 vizsgált lokuszon.

Eredmények

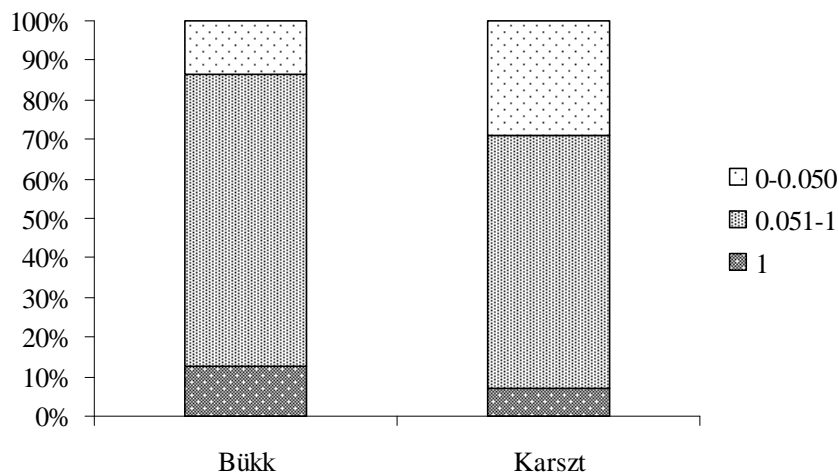
Aricia artaxerxes issekutzi

A polimorfizmus mértéke:

Az *A. artaxerxes issekutzi* populációkban magas szintű variabilitást tapasztaltunk: az átlagos allélszám lokuszonként (n_A) 2,97-nek, a polimorf lokuszok aránya (P) 66.6%-nak, míg az átlagos heterozigóta gyakoriság (H) 0,270-nak adódott a 27 mintában. Kiszámítottuk továbbá azt is, hogy a faj teljes allélkészletének az egyes populációk milyen hányadát hordozzák (A). Megállapítottuk, hogy a minták átlagosan a faj teljes allélkészletének a 48%-t tartalmazták. A polimorfizmus mutatói jelentősen különböztek az egyes populációkban (1. ábra). A régiók szintjén azonban szignifikáns különbségek csak két paraméterben ($n_A: F_{1,25}=32,1$ $P<0,001$; $A\%: \chi^2_1=21,29$ $P<0,001$) mutatkoztak, amelyek jelentősen magasabbak voltak a karszti populációkban mint a bükkiekben.



1. ábra: Az *Aricia artaxerxes issekutzi* populációk polimorfizmusának mutatói az egyes populációkban. n_A : lokuszonkénti átlagos allélszám; $A\%$: a faj allélkészletének hányada; P : polimorf lokuszok aránya, H : átlagos heterozigóta gyakoriság.



2. ábra: A különböző gyakoriságú allélok megoszlása az *Aricia artaxerxes issekutzi* mintákban. Sötét satírozás: fixálódott allél; közepesen erős satírozás: gyakori allél; gyenge satírozás: ritka allél.

A mintákban összehasonlítottuk a különböző gyakorisággal előforduló allélok megoszlását. Három kategóriát különítettünk el: fixálódott allél ($p=1$); gyakori allél ($0.051 \leq p < 1$); ritka allél ($0 < p \leq 0,050$). A két régió jelentős különbséget mutatott az allélok megoszlásában ($\chi^2_2=32,06$ $P < 0,001$). A karszti mintákban gyakrabban fordultak elő ritka allélok, míg a bükkiekben nagyobb számban jelentek meg a fixálódott allélok (2. ábra).

A populációk közötti genetikai differenciálódás mértéke

1. táblázat: Az F-statisztika és a Fisher-féle egzakt teszt eredményei. F_{IT} : a totális genetikai variációt reprezentáló index; F_{IS} : a mintákon belüli variációt reprezentáló index; F_{ST} : fixációs index, ami a minták közötti variációt reprezentálja. A zárójeles számok azt mutatják, hogy hány lokuszon volt szignifikáns a differenciálódás a minták között. **: $0,01 < P < 0,05$; ***: $P < 0,001$.

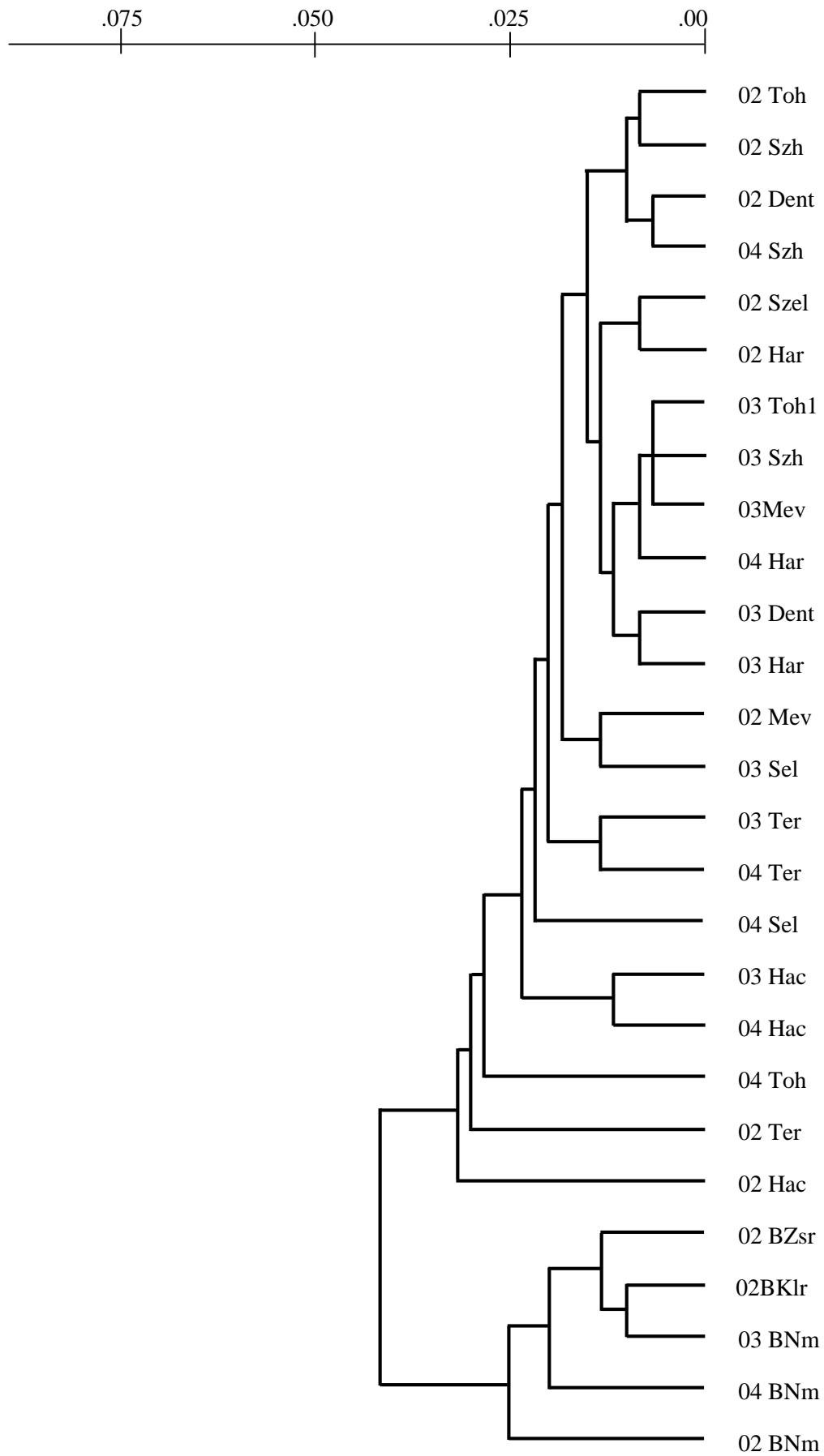
	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	Fisher teszt
Bükk	0.158**	0.152**	0.008* (1/15)	*** (3/15)
Karszt	0.182**	0.167**	0.019** (10/16)	*** (11/16)
Totál	0.186**	0.165**	0.026** (13/17)	*** (15/17)

Az F-statisztika eredményei alátámasztották a populációk magas szintű variabilitását (1. táblázat: F_{IT}). A variabilitás nagyobb hányada mutatkozott a populációkon belül (1. táblázat: F_{IS} koefficiens). A szignifikáns F_{IS} értékek számottevő heterozigóta hiányra utaltak a populációkban. A genetikai differenciálódás az összes minta között szignifikáns volt ugyan, de mértéke alacsonynak adódott (1. táblázat: F_{ST}). Ugyanakkor a fixációs index csaknem minden lokuszon szignifikánsnak mutatkozott (1. táblázat: Totál – $15/17=0.88$).

Mivel az *A. artaxerxes issekutzi* populációk két földrajzi régióból származtak, lehetővé vált a variabilitás földrajzi mintázatának tanulmányozása is. Ennek első lépéseként elvégeztük az F-statisztikát szűkített adathalmazon, a két régió mintáira külön-külön. Az eredmények azt mutatták, hogy a régiókon belül alacsonyabb volt a differenciálódás mértéke, mint a teljes adathalmazra számítva (1. táblázat). Különösen nyilvánvaló volt ez a differenciális lokuszok arányát tekintve (1. táblázat: Karszt – $10/16=0.63$; Bükk – $1/15=0.07$). Hasonló eredményt kaptunk a Fisher-féle egzakt tesztben is (1. táblázat: Karszt – $11/16=0.69$; Bükk – $3/15=0.2$). Ugyanakkor az eredmények azt is mutatták, hogy a bükki minták közötti differenciálódás alacsonyabb szintű volt, mint a karsztiak között. Ez a különbség mind az F_{ST} értékekben, mind pedig a differenciáló lokuszok számában megmutatkozott.

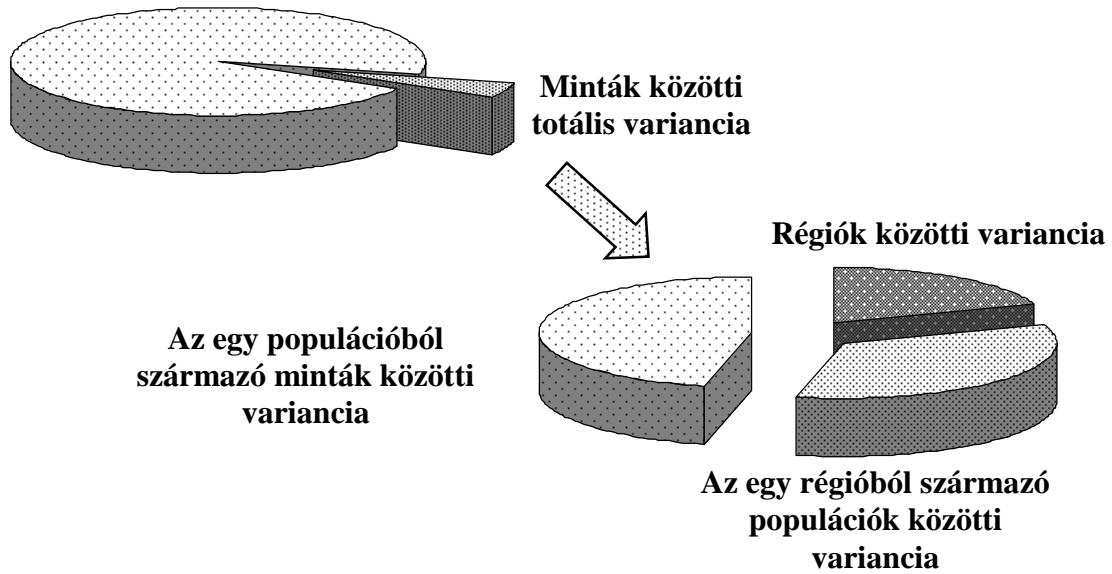
A következő lépésben kiszámoltuk a minták közötti Nei-féle genetikai távolságokat, és a távolságmátrix alapján dendrogramot szerkesztettünk. A dendrogram egyértelműen mutatta a két földrajzi régióból származó minták elkülönülését (3. ábra). Az azonos populációból származó minták azonban a dendrogram különböző ágaiban klasztereződtek. Ez arra utalt, hogy az allélfrekvencia jelentős mértékben fluktuál generációról generációra.

A genetikai variancia szerkezetét AMOVA segítségével is tanulmányoztuk. Ebben az analízisben a genetikai variációt felosztottuk mintákon belüli és minták közötti komponensekre. A minták közötti variációt tovább bontottuk populáción belüli (generációk közötti variancia) és populációk közötti (térbeli variancia) komponensekre. A térbeli varianciát pedig régiókon belüli és régiók közötti tagokra választottuk szét.



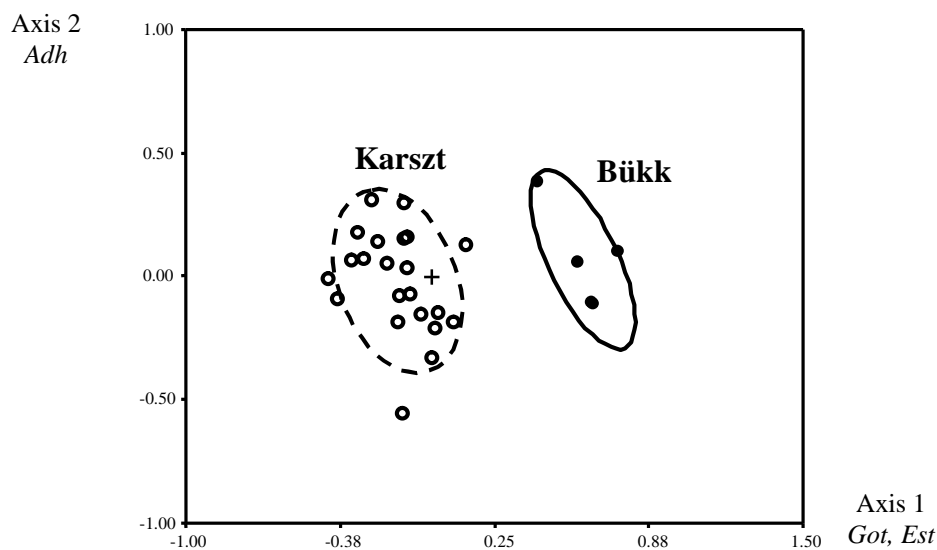
3. ábra: A Nei-féle genetikai távolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogram.

Mintákon belüli variancia



4. ábra: A teljes genetikai variancia tagolódása az *A. artaxerxes issekutzi* populációkban az AMOVA eredménye alapján.

Az *A. artaxerxes issekutzi* populációk esetében a genetikai variancia 96%-a a mintákon belül mutatkozott, és csak 4%-át magyarázták a minták közötti különbségek (4. ábra). A minták közötti teljes varianciának csaknem a fele (48,6%) a populációkon belül volt megfigyelhető (generációk közötti variancia, azaz időbeli variabilitás). A térbeli variancia (populációk közötti komponens) közel azonos arányban oszlott meg a régiókon belül és a régiók között (4. ábra). A régiók közötti komponens relatíve magas aránya szintén azt támasztotta alá, hogy az *A. artaxerxes issekutzi* populációk genetikai varianciájának földrajzi mintázata van.



5. ábra: A főkomponens analízis eredményei. Az első tengely a variancia 31,5%-t, míg a második a 12,3%-t magyarázta

A főkomponens analízis eredményei alátámasztották a genetikai variabilitás földrajzi mintázatát. A mintákat jelképező pontok két jól elkülönült felhőt alkottak a változók redukált terében (5. ábra). A két régió mintái az első tengely mentén differenciálódtak. Ez a tengely a teljes genetikai variancia 31,5%-t magyarázta. A tengely kialakításában elsősorban a *Got* és az *Est* lokuszok vettek részt.

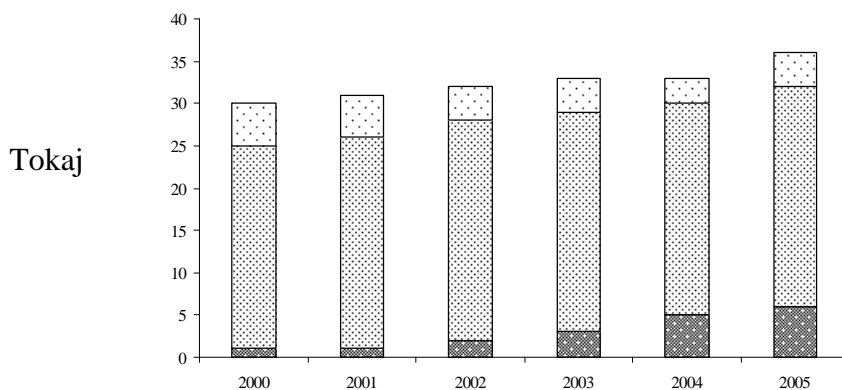
Plebejus sephirus

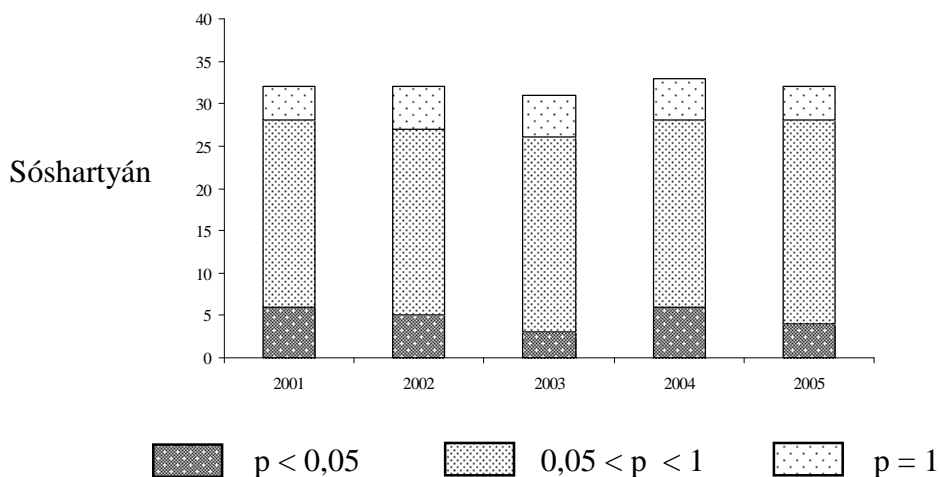
A polimorfizmus mértéke

2. táblázat: A polimorfizmus mutatói a *Plebejus sephirus* három vizsgált populációjában. N: átlagos mintaszám; n_A : lokuszonkénti átlagos allélszám; A%: a faj teljes allélkészletének a populációban megjelenő hányada; P: polimorf lokuszok aránya; H: átlagos heterozigóta gyakoriság; F_{IS} : a genetikai variancia mintákon belüli komponensét jellemző index.

Populáció	N	n_A	A%	P	H	F_{IS}
Tokaj	24,3	2,18	70,9	64,3	0,250	0,246***
Sóshartyán	35,3	2,05	69,1	51,4	0,199	0,217**
Szentendre	14	2,11	56,4	57,1	0,224	0,181*
Átlag	24,5	2,11	65,4	57,6	0,224	0,229**

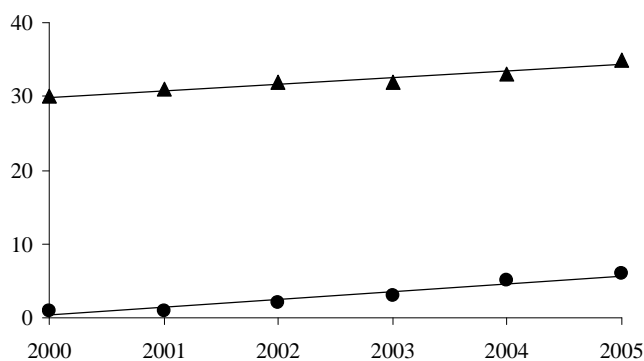
A *P. sephirus* populációkban magas szintű variabilitást tapasztaltunk: az átlagos allél szám lokuszonként (n_A) 2,11-nek, a polimorf lokuszok aránya (P) 57,6%-nak, míg az átlagos heterozigóta gyakoriság (H) 0,224-nek adódott a 12 mintában (2. táblázat). Kiszámítottuk továbbá azt is, hogy a faj teljes allél készletének az egyes populációk milyen hányadát hordozzák (A%). Megállapítottuk, hogy a minták átlagosan a faj teljes allél készletének a 65,4%-át tartalmazták. A polimorfizmus mutatói jelentősen különböztek a tokaji és a sóshartyáni populációkban. A különbségek két paraméterben szignifikánsnak mutatkoztak: átlagos allél szám (n_A : $P=0,008$) és átlagos heterozigóta gyakoriság (H: $P=0,002$). Mindkét mutató jelentősen magasabb volt a tokaji mintákban, mint a sóshartyániakban.





6. ábra: A különböző gyakoriságú allélok megoszlása a tokaji és a sóshartyáni populációban gyűjtött mintákban.

Összehasonlítottuk a mintákban a különböző gyakorisággal előforduló allélok megoszlását. Három kategóriát különítettünk el: fixálódott allél ($p=1$); gyakori allél ($0,051 \leq p < 1$); ritka allél ($0 < p \leq 0,050$). A két populáció (Tokaj és Sósartyán) különbséget mutatott az allélok megoszlásának egyenletességében. Míg a sóshartyáni mintákban a ritka és a fixálódott allélok száma közel azonos volt a vizsgált években, addig a tokaji mintákban az allél szám fokozatosan növekedését figyeltük meg (6. ábra). Megállapítottuk, hogy az allél szám növekedése elsősorban a ritka allélok számának növekedésével magyarázható (7. ábra).



7. ábra: A minták összes (▲) és ritka (●) allél száma a tokaji populációban gyűjtött mintákban.

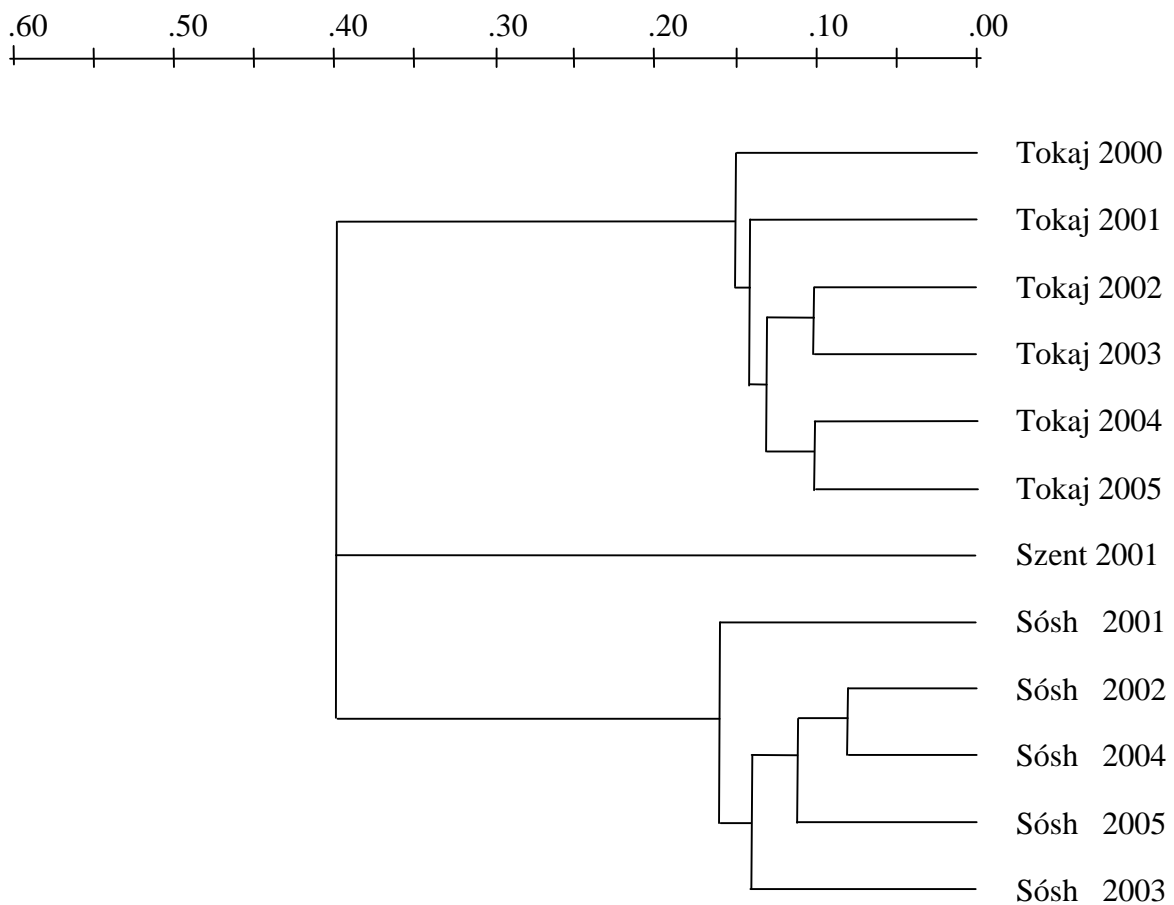
A populációk közötti genetikai differenciálódás mértéke

Az F-statisztika eredményei alátámasztották a populációk magas szintű variabilitását (3. táblázat: F_{IT}). A variabilitás nagyobb hányada mutatkozott a populációkon belül (3. táblázat: F_{IS} koefficiens). A szignifikáns F_{IS} értékek számottevő heterozigóta hiányra utaltak a populációkban. A genetikai differenciálódás az egyes populációkból különböző években gyűjtött minták között szignifikáns volt ugyan, de mértéke alacsonynak adódott (3. táblázat:

F_{ST}). Ugyanakkor a fixációs index populációk közötti értéke magas volt, és csaknem minden lokuszon szignifikánsnak mutatkozott (3. táblázat: Totál – $10/12=0,83$).

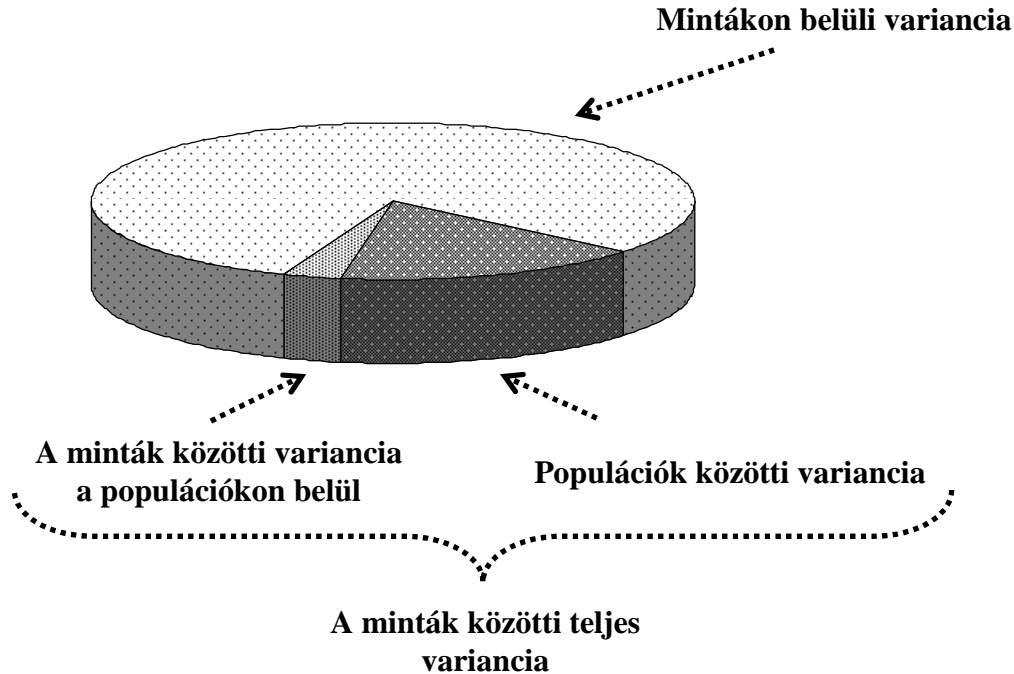
3. táblázat: Az F-statisztika és a Fisher-féle egzakt teszt eredményei. F_{IT} : a totális genetikai variációt reprezentáló index; F_{IS} : a mintákon belüli variációt reprezentáló index; F_{ST} : fixációs index, ami a minták közötti variációt reprezentálja. A zárójeles számok azt mutatják, hogy hány lokuszon volt szignifikáns a differenciálódás a minták között. **: $0,01 < P < 0,05$; ***: $P < 0,001$.

	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	Fisher teszt
Tokaj	0.265**	0.246**	0.026** (6/11)	*** (6/11)
Sóshartyán	0.239**	0.217**	0.029** (3/11)	*** (5/11)
Totál	0.380**	0.229**	0.195** (10/12)	*** (10/12)

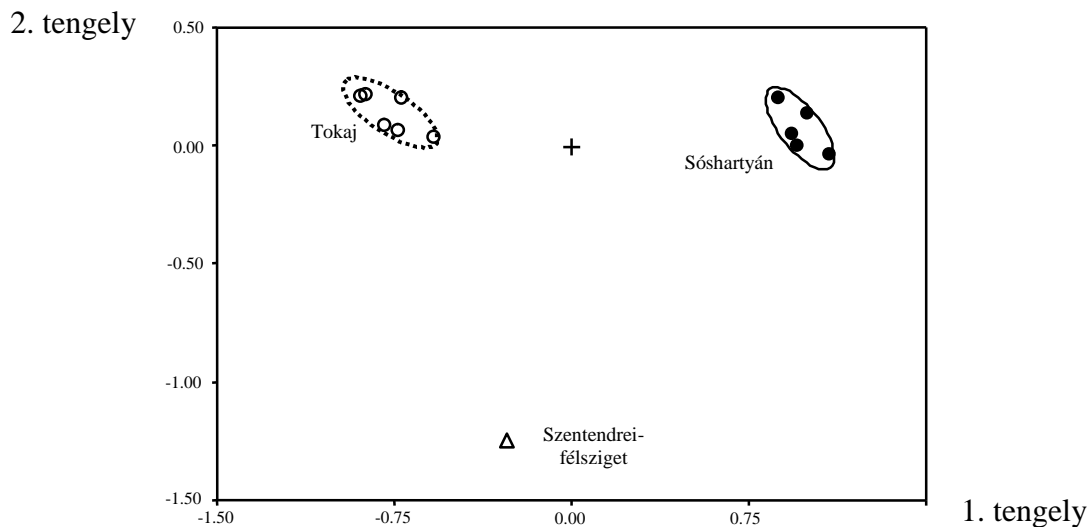


8. ábra: A Nei-féle genetikai távolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogram a *Plebejus sephirus* mintákra.

A következő lépésben kiszámoltuk a minták közötti Nei-féle genetikai távolságokat, és a távolságmátrix alapján dendrogramot szerkesztettünk. A dendrogram egyértelműen mutatta a három populációból származó minták elkülönülését (8. ábra). A különböző években gyűjtött minták azonban nem klasztereződtek szisztematikusan a dendrogram különböző ágaiban. Ez arra utalt, hogy az allélfrekvencia bizonyos mértékig fluktuál generációról generációra.



9. ábra: A teljes genetikai variancia tagolódása a *P. sephirus* mintákban az AMOVA eredménye alapján.



10. ábra: A *P. sephirus* minták allélfrekvencia adatai alapján végzett főkomponens analízis eredményei. Az első tengely a variancia 69,4%-át, míg a második a 14,7%-át magyarázta.

A *P. sephirus* minták esetében a genetikai variancia 80%-a a mintákon belül mutatkozott, míg 20%-át magyarázták a minták közötti különbségek (9. ábra). A minták közötti teljes varianciának csak kis hányada (3%) volt megfigyelhető a populációkon belül (generációk közötti variancia, azaz időbeli variabilitás). Ezzel szemben a populációk közötti komponens, vagyis a térbeli variancia meglehetősen nagy hányadát (17%) tette ki a minták közötti totális varianciának (9. ábra).

A főkomponens analízis eredményei alátámasztották a populációk közötti jelentős mértékű differenciálódást. A mintákat jelképező pontok három jól elkülönült felhőt alkottak a változók redukált terében (10. ábra). A tokaji és a sóshartyáni minták az első tengely mentén differenciálódtak. Ennek a tengelynek a kialakításában elsősorban a *Me* és *Pgm* lokuszok vettek részt. Ugyanakkor a szentendrei minta a 2. tengely mentén különült el a másik két populációtól, melyet főleg a *Me* és az *Adh* lokuszok határoztak meg.

Összefoglalás

Az *A. artaxerxes issekutzi* populációk rendkívül variábilisak, ugyanakkor alacsony közöttük a genetikai differenciálódás mértéke. A populációk genetikai szerkezete földrajzi mintázatot mutatott. Kimutattuk a faj bükki populációinak alacsony szintű variabilitását a karszti populációkhoz képest. A Bükkben a populációk habitatjai egyre jobban beszűkültek és átalakultak, ezért a populációk mérete jelentősen lecsökkent. A kisméretű populációkban megindult a genetikai variabilitás eróziója, amely mindennek előtt az allélszám csökkenésében, a ritka allélok elvesztésében nyilvánul meg. Az a tény, hogy a bükki populációk között nem mutatkozott magasabb szintű differenciálódás, mint a karszton élők között arra utal, hogy az egyedszám csökkenés nem régen következett be.

A *P. sephirus* populációk valamivel kevésbé variábilisak, mint az *A. artaxerxes issekutzi* populációk, ugyanakkor a genetikai differenciálódás mértéke sokkal magasabb közöttük. A tokaji populációban kimutattuk, hogy 2000-ben a variabilitás relatíve alacsony szintű volt, ami fokozatosan nőtt 2005-ig. A tokaji habitatban ugyanis 2000-ben tűz pusztított a vegetációs periódus elején, ami a *P. sephirus* populáció számottevő hányadát elpusztította. A palacknyak hatás eredményeként lecsökkent a populáció variabilitása (alacsony allél szám és heterozigóta gyakoriság). 2000 és 2005 között azonban a populáció regenerálódásával párhuzamosan nőtt az allélok, elsősorban a ritka allélok száma.

Az eredményekből született publikációk:

Bereczki Judit, Pecsénye Katalin és Varga Zoltán 2004. A morfológiai változatosság szerkezetének időbeli változása az *Aricia artaxerxes issekutzi* (Lepidoptera: Lycaenidae) két Kárpát-medencei populációjában. Természetvédelmi Közlemények 11: 329-336.

K. Pecsénye, E. Meglécz, Á. Kenyeres, J. Bereczki and Z. Varga 2005. A genetikai variabilitás szerkezete három nappali lepke faj (Nymphalidae) hazai populációiban: *Parnassius mnemosyne*, *Euphydryas maturna* és *Aricia artaxerxes issekutzi*. pp. 135-149. In Jordán F. (szerk.) A DNS-től a Globális Felmelegedésig. A 70 éves Vida Gábor köszöntése. Scientia Kiadó, Budapest

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

- K. Pecsénye, J. Bereczki and Z. Varga 2007. High level of genetic variation in *Arícia artaxerxes issekutzi* (Lepidoptera: Lycaenidae) populations in Northern Hungary. (publikálásra benyújtva)
- K. Pecsénye, J. Bereczki, A. Tóth and Z. Varga. The structure of genetic variation in *Plebejus sephirus* populations in Hungary. (in preparation)
- K. Pecsénye, J. Bereczki and Z. Varga. Loss of genetic variation in small endangered *Arícia artaxerxes issekutzi* (Lepidoptera: Lycaenidae) populations in Northern Hungary. (in preparation)