

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A környezet hatása kétéltűek kémiai védekezésének
változatosságára**

**Environmental factors shaping the variability of
amphibian chemical defences**

Üveges Bálint

Témavezető: Dr. Hettyey Attila



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék / Table of contents

Magyar nyelvű tézisek	1
Bevezetés.....	1
Célkitűzések és módszerek	3
Új tudományos eredmények.....	6
Összefoglalás.....	7
Köszönetnyilvánítás	8
Theses in English	10
Introduction	10
Aims and methods.....	12
Novel scientific results	15
Discussion	16
Acknowledgements	17
Irodalomjegyzék/References	18
Publikációs jegyzék / List of Publications	23

Bevezetés

Fenotípusos plaszticitás

A fajok populációi folyamatosan evolválódnak, hogy alkalmazkodjanak azon környezeti tényezőkhöz, amelyek között élniük és szaporodniuk kell. A biotikus és abiotikus környezeti feltételek azonban az egyes egyedek élete során is állandóan változnak, amelyekre az organizmusoknak rugalmasan kell tudniuk válaszolni, hogy megfeleljenek a kihívásoknak (West-Eberhard, 2003). Ennek megfelelően az élőlények egyedei képesek fenotípusukat a környezeti változókhoz igazítani, úgy, hogy megváltoztathatják élettanukat, morfológiájukat, fejlődésük és növekedésük ütemét, illetve viselkedésüket (Harvell, 1990; Tollrian & Harvell, 1999; West-Eberhard, 2003; Miner *et al.*, 2005). Egy adott genotípus e képességét, hogy eltérő környezetben eltérő fenotípusokat hozzon létre, fenotípusos plaszticitásnak hívjuk (West-Eberhard, 1989; Futuyma, 1998; West-Eberhard, 2003; Pigliucci, 2005) és az élővilág sokszínűségének kialakításában, valamint az ökológiai és evolúciós folyamatokban betöltött alapvető szerepe széleskörűen elismert (Harvell, 1990; Tollrian & Harvell, 1999; Agrawal, 2001; West-Eberhard, 2003; Miner *et al.*, 2005; Fordyce, 2006; Pfennig *et al.*, 2010). Az indukálható védekezések (Harvell, 1990; Tollrian & Harvell, 1999) a fenotípusos plaszticitás speciális esetei, amelyeket biotikus környezeti hatások, például ragadozók, versenytársak, kórokozók vagy paraziták váltanak ki.

A mérgező anyagok felhalmozása és használata ökológiailag és evolúciósan is fontos adaptáció a fajok közötti kölcsönhatások tekintetében és az élet minden doménjében elterjedt (Keeler & Tu, 1991; Singh & Tu, 1996; Mebs, 2001; Brodie, 2009; Fry *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2011; Casewell *et al.*, 2013; Makarova *et al.*, 2013). Bár az ellenségek által kiváltott, indukálható méregtermelés jelensége jól ismert a növények esetében (Tollrian & Harvell, 1999; Chen, 2008; McCall & Fordyce, 2010), az ritkán kutatott, hogy az állatok is képesek-e veszély esetén plasztikus válaszra méregtermelésük fokozásával vagy mérgeanyagaik szelektív kifejezésével (Hettyey *et al.*, 2014).

A kémiai védekezés indukálhatósága az állatvilágban

A mérgeanyagok predációban betöltött funkciója (Fry *et al.*, 2009; Casewell *et al.*, 2013) mellett az is elterjedt, hogy az állatok ellenfeleik elrettentésére alkalmazzák őket (Mebs, 2001; Brodie, 2009). Ezt nevezzük kémiai védekezésnek. Ilyen mérgeanyagokat számos faj esetében leírtak már, és sokszor az ellenfelekre (pl. ragadozókra és potenciálisan parazitákra és

kórokozókra) kifejtett hatásuk is jól ismert (Blum, 1981; Tachibana, 1988; Pawlik, 1993; Toledo & Jared, 1995; Mebs, 2001; Cunha Filho *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2008; Savitzky *et al.*, 2012). Ezen felül az állati toxinokat intenzíven kutatják gyógyszeripari jelentőségük miatt is (Fox & Serrano, 2007; King, 2011).

Annak fényében, hogy ennyi tudunk a természetesen előforduló mérgeanyagokról, az állatokról, amelyek hasznosítják őket, valamint a mérgeknek az ily módon védett fajok és ellenfelek ökológiájában és evolúciójában betöltött fontos szerepéről (pl. Brodie *et al.*, 2002; Hanifin *et al.*, 2008; Dobler *et al.*, 2012), meglepő, hogy a kémiai védekezés indukálhatósága kevés figyelmet kapott a múltban (Hettyey *et al.*, 2014). Csupán néhány kutatás foglalkozott az indukálható kémiai védekezés témakörével, amelyek azt találták, hogy a szesszilis gerinctelenek, ragadozó általi veszélynek vagy strukturális sérülésnek kitéve, mérgetermelésük fokozásával reagálnak (Ebel *et al.*, 1997; Slattery *et al.*, 2001; Thornton & Kerr, 2002), csakúgy mint a barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalai szennyező anyagok esetében (Bókony *et al.*, 2017). Az, hogy ragadozók kiváltanak-e plasztikus választ a mérgetermelésben, a gerincesek esetén vitatható (Benard & Fordyce, 2003; Hagman *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2015; Bucciarelli *et al.*, 2017). Ennek oka az, hogy az ezt megelőző kutatások vagy olyan fajokat vizsgáltak (kaliforniai götte, *Taricha torosa*, Bucciarelli *et al.*, 2017), amelyek aktív mérgetermelése kétséges (Daly, 2004; Chau *et al.*, 2011; Bane *et al.*, 2014, de lásd Hanifin *et al.*, 2002; Lehman *et al.*, 2004), vagy amelyekben a mérgeanyagok aktív szintézisét nem sikerült explicit módon kimutatni abban az életszakaszban, amikor az indukáló környezeti hatást érzékelték az állatok (Benard & Fordyce, 2003; Hagman *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2009). Továbbá néhány esetben a kutatók manuálisan szimulálták a ragadozók támadását (Marion *et al.*, 2015; Bucciarelli *et al.*, 2017). Lehetséges, hogy e módszerrel egy nem szelektív, általános stresszválaszt váltottak ki az állatokból, nem pedig kifejezetten ragadozók elleni védekezést. Emellett jóformán semmit nem tudunk ebben a tekintetben a versenytársak szerepéről és az indukált védekezés költségeiről (Benard & Fordyce, 2003; Hagman *et al.*, 2009; Hettyey *et al.*, 2014).

Kétéltűek mint modellállatok

A kétéltűek a fenotípusos plaszticitás kutatásának klasszikus modellállatai (Miner *et al.*, 2005). Főleg a farkatlan kétéltűek (békák) ebihalairól mutatták ki, hogy sokféle környezeti hatás, például ragadozók vagy versenytársak jelenlétében képesek megváltoztatni morfológiájukat, viselkedésüket és számos életmenet jellemzőjüket (Laurila *et al.*, 1998; Chivers *et al.*, 1999;

Lardner, 2000; Van Buskirk & McCollum, 2000; Relyea, 2001; Van Buskirk, 2002; Van Buskirk & Arioli, 2002; Relyea, 2003; 2004; Kishida & Nishimura, 2005; Steiner, 2007). Ezen felül a kétéltűek sokféle méreganyagot használnak önvédelemre (Toledo & Jared, 1995; Daly, 2003), tehát alkalmas modellállatok a kémiai védekezés ökológiájának és evolúciójának kutatására.

A kétéltűek között az egyik legközismertebb, mérgező bőrváladékkal rendelkező csoport a varangyok (Bufonidae család; Toledo & Jared, 1995). A varangyméreg fő összetevői az ún. bufadienolidok (Flier *et al.*, 1980; Krenn & Kopp, 1998; Mebs *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010), amelyek kardiotoxikus hatású, Na⁺/K⁺ ATPáz gátló szteroid származékok (Flier *et al.*, 1980; Pierre & Xie, 2006; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Lingrel, 2010). A varangyok ezeket az anyagokat már nagyon korai fejlődésű stádiumuktól kezdve tartalmazzák (Mebs *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2009; Bókony *et al.*, 2016; Bókony *et al.*, 2017; Ujszegi *et al.*, 2017), habár azt, hogy az ebihalak képesek lennének a bufadienolidok aktív termelésére, eddig nem sikerült egyértelműen bizonyítani (Benard & Fordyce, 2003; Hayes *et al.*, 2009). Mindazonáltal a bufadienolidok hatékonyan védik a varangyokat sok ragadozó, sőt, *in vitro* körülmények között, paraziták és kórokozók ellen is (Kruse & Stone, 1984; Henrikson, 1990; Denton & Beebe, 1991; Peterson & Blaustein, 1991; Lawler & Hero, 1997; Cunha Filho *et al.*, 2005; Gunzburger & Travis, 2005; Tempone *et al.*, 2008). Ezenfelül megfigyelték, hogy a varangyok ebihalai negatívan hatnak versenytársaikra, például más békafajok ebihalaira (Licht, 1967; Wilbur & Alford, 1985). Felvetődött, hogy az ebihalak kémiai anyagokkal érik el ezt (Licht, 1967), és legalább egy esetben (Crossland & Shine, 2012) a bufadienolidokra terelődött a gyanú az allelopatikus hatás kapcsán (Reigosa *et al.*, 2006). Ezek a méreganyagok tehát a varangyok számára fontos szerepet játszanak számos környezeti veszély kivédésében.

Célkitűzések és módszerek

Az itt felsorakoztatott kísérletekben a fő célkitűzésünk az volt, hogy vizsgáljuk a ragadozó és versenytársak által indukált kémiai védekezést a gerincesek esetében, a barna varangy (*Bufo bufo*), mint modellállat segítségével. E faj ebihalai kevésbé plasztikusak másokéihoz képest, ha indukált morfológiai vagy viselkedésbeli védekezéstről van szó (Laurila *et al.*, 1998; Lardner, 2000; Van Buskirk, 2002), de már életük korai szakaszától kezdve tartalmazznak bufadienolidokat (Mebs *et al.*, 2007; Bókony *et al.*, 2016; Bókony *et al.*, 2017; Ujszegi *et al.*,

2017) és számos ragadozó kerüli az elfogyasztásukat (Henrikson, 1990; Denton & Beebee, 1991). Ez azt sugallja, hogy a barna varangy ebihalak elsősorban hatékony méregarzenáljukra támaszkodnak az ellenfelek elleni védekezésben. A tézis szövegében az egyes kéziratokra, publikált cikkekre, illetve tartalmukra azok félkövéren szedett, római betűvel jelzett számaival hivatkozok (**I-IV**).

Kísérleteink során a varangy ebihalakat a laborban, illetve kültéri mezokozmoszokban neveltük. A mezokozmoszok önfenntartó kísérleti rendszerek, amelyek közel természetes körülményeket biztosítanak az ebihalaknak. Kétéltűekkel kapcsolatos vizsgálatok esetén ezek olyan, pár litertől kb. 1000 literig terjedő űrtartalmú tartályok, amelyek tartalmazznak az állatok számára búvóhelyet (általában leveleket), illetve természetesen előforduló fito- és zooplankton (pl. Van Buskirk, 2002; Relyea, 2004; Bókony *et al.*, 2017). A kémiai analízishez az ebihalakat 70 %-os (**I.** és **III.** cikk) vagy abszolút (**II.** és **IV.** cikk), HPLC tisztaságú metanolban konzerváltuk. Az állatok méreganyagait nagyteljesítményű folyadékkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométerrel (HPLC-DAD-MS) elemeztük. A kísérletek után a megmaradt állatokat minden esetben visszaengedtük a természetbe a befogásuk helyén. A méregtartalommal kapcsolatos adatokat általános, illetve általánosított lineáris kevert modellekkel elemeztük az R szoftver segítségével (R Development Core Team, 2017).

► **I. cikk** *A kémiai védekezés indukálhatósága és ontogenezise*

A kísérlet során a fő célunk az volt, hogy tanulmányozzuk a kémiai védekezés változását az egyedfejlődés során, ebihalakon és metamorfózison átesett fiatal egyedeken, megvizsgáljuk, hogy a ragadozókra utaló kémiai jelek jelenléte indukál-e változást a méregtermelésben az ontogenezis folyamán, illetve, hogy felmérjük a plasztikus kémiai védekezés energetikai költségeit.

Ehhez 10 varangypár utódait használtuk. Közvetlenül a petékből való kikelés után mintaként konzerváltunk 4 ebihalat minden családból, hogy meghatározzuk a bufadienolid tartalom alapszintjét a lárvális fejlődés elején. Ezek után az ebihalakat hármasával, 1,5 liter helyreállított szűrt vízben (reconstituted soft water, RSW), laboratóriumban neveltük tovább. Háromfaktoros kísérleti elrendezést alkalmaztunk két ragadozó kezeléssel (kontroll vagy ragadozókra utaló kémiai jelek jelenléte, amelyeket külön tartott sebes acsa lárvák, *Aeshna cyanea*; és felnőtt, hím pettyes göté, *Lissotriton vulgaris* szolgáltattak), két táplálékmennyiséggel (*ad libitum* vagy csökkentett) és 4 mintavételezési időponttal az

ebihal stádium folyamán, illetve frissen átalakult békák esetében. Összesen 200 minta kémiai összetételét elemeztük.

► **II. cikk** *Versenyársak által indukált kémiai védekezés*

Ebben a vizsgálatban kísérletesen teszteltük azon hipotéziseket, hogy a saját, vagy más fajból származó versenyársak megnövekedett méregtermelést indukálnak varangyokban és, hogy a varangy ebihalak képesek allelokemikáliákként hasznosítani a bufadienolidokat, ezzel elnyomva versenyártaikat.

Ehhez 9-9 frissen rakott varangy petezsinórból, illetve erdei béka (*Rana dalmatina*) petecsomóból gyűjtöttünk petéket és a kikelő ebihalakat 40 literes kültéri mezokozmoszokban neveltük különböző egyedsűrűségeken. A denzitásokat úgy választottuk ki, hogy azok alacsony, közepes és magas versengést reprezentáljanak. Három kezelési csoport csak varangy ebihalakat tartalmazott, hogy teszteljük, az ebihalak megváltoztatják-e a bufadienolidok termelését a fajtársak egyedszámának függvényében. További három kezelési csoportban keverve tartottuk a két fajból származó ebihalakat, hogy összehasonlíthassuk a fajtársak és a másfajú ebihalak hatását. Végül két kezelési csoport csak erdei béka ebihalakat tartalmazott, amelyek kontrollként szolgáltak annak tesztelésére, hogy a varangy ebihalak jelenléte gátolja-e fejlődésüket és növekedésüket. A kísérlet lezárásakor minden ebihalat megmértünk, és a varangy ebihalakat metanolban ($n = 398$), míg az erdei béka ebihalakat 50%-os etanolban ($n = 216$) tartósítottuk. Az ebihalak fejlődési stádiumát sztereomikroszkóp segítségével határoztuk meg.

► **III. cikk** *A kémiai védekezés indukálhatósága különböző ragadozók által*

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy az ebihalak megváltoztatják-e méregtermelésüket általában véve ragadozók jelenlétében, illetve négy olyan, filogenetikailag egymástól távol eső ragadozó faj esetén, amelyek veszélyességükben is nagymértékben eltérnek egymástól. Emellett felmértük a ragadozókra adott válasz adaptív voltát is.

Ehhez 12 családból származó varangy ebihalakat 130 literes kültéri mezokozmoszokban neveltünk sebes aca lárva (*A. cyanea*, ezentúl szitakötő), hátonúszó poloska imágó (*Notonecta* sp.), juvenilis tüskés pikó (*Gastersoteus aculeatus*) vagy felnőtt, hím pettyes göte (*L. vulgaris*) jelenlétében vagy hiányában. Mezokozmoszokként egy ragadozót részlegesen alámerített ketrecekben tartottunk. A kémiai analízishez kétszer vettünk mintát,

egyrészt a kísérlet 13. vagy 14. napján ($n = 60$), majd a metamorfózis kezdetekor ($n = 60$). Vizsgáltuk továbbá az ebihalak viselkedését, testtömegét, morfológiáját, az ebihal stádium hosszát és túlélésüket is.

A ragadozókra adott válasz adaptív voltának vizsgálatához predációs tesztet végeztünk a következőképpen. A kísérlet 13. napján egyenként 6 varangy ebihalat és 6 gyepi béka (*Rana temporaria*) ebihalat helyeztünk át 40 literes tartályokba. Minden ragadozó fajhoz és varangy családhoz két ilyen tartályt használtunk. Az egyik tartályba 6, ragadozóval együtt nevelt varangy ebihal került, a másikba pedig 6 kontroll egyed. Így 96 tartályt kaptunk (4 ragadozófaj \times 2 ragadozó kezelés, azaz, hogy az ebihalak ragadozóval vagy nélkülük nevelkedtek-e \times 12 család). Egy nap akklimatizációs periódus után (a kísérlet 14. napján) a tartályokba behelyeztük a hozzájuk rendelt szabadon úszó ragadozó egyedet is. A kísérlet végén megszámloltuk a túlélő ebihalakat és megmértük a ragadozók testméretét.

► **IV. cikk** *Ragadozó indukált kémiai védekezés különböző populációkban*

Ebben a kísérletben a ragadozók által indukált kémiai védekezés populációk közötti változatosságát vizsgáltuk meg.

Ehhez 10-10 varangy petezsinórból gyűjtöttünk petéket 6 különböző tóból. A tavak közül 3, halakat is tartalmazó állandó víztest, míg 3, halak nélküli, időszakos kistó volt. A kikelő ebihalakat a laborban, 0,7 liter RSW-ben neveltük óriás szitakötőktől (*Anax imperator*), felnőtt csapó sügérektől (*Perca fluviatilis*) vagy felnőtt, hím pettyes gőtéktől (*L. vulgaris*) származó szaganyagok jelenlétében vagy hiányában. A kísérlet lezárásakor minden ebihalat ($n = 240$) metanolban tartósítottunk.

Új tudományos eredmények

- Kimutattuk, hogy a barna varangy ebihalai plasztikus kémiai védekezéssel, azaz a bufadienolid termelés fokozásával reagálnak táplálékhiány esetén (**I. cikk**), illetve versenytársak (**II. cikk**) és ragadozók jelenlétére (**IV. cikk**).
- Az ebihalak a megfigyelt plasztikus válaszokat ugyanabban a (lárvális) életszakaszban fejezték ki, mint amikor a kiváltó kémiai szignál is jelen volt.
- Bizonyítottuk, hogy kételtűek ebihalai képesek *de novo* méregtermelésre (**I. cikk**).

- ▶ Megfigyeltük a bufadienolid tartalom korai életszakaszokban történő változásának egy eddig le nem írt mintázatát, amely összefügg az ebihalak ragadozókkal szembeni érzékenységének változásával az egyedfejlődés során (**I. cikk**).
- ▶ Azt találtuk, hogy kísérleti kezeléstől függetlenül, a varangy ebihalak gyakran áldozatául estek a szitakötő lárváknak és kisebb mértékben a hátonúszó poloskáknak, míg a tüskés pikók és a pettyes götéek számára az esetek többségében ehetetlennek bizonyultak (**III. cikk**).
- ▶ Szabadon úszó szitakötő lárváknak kiteve, az ezzel a ragadozóval nevelt ebihalak jobban éltek túl, mint kontroll körülmények között tartott társaik (**III. cikk**).
- ▶ Populációk közötti különbségeket figyeltünk meg a ragadozók által indukált válasz erősségében a bufadienolidok számát tekintve, ugyanakkor a származási hely nem volt hatással a bufadienolidok összmenyiségére (**IV. cikk**).

Összefoglalás

Összességében, az itt bemutatott kutatások az állati kémiai védekezés plasztikusságának eddigi legátfogóbb vizsgálatát képezik. Nyilvánvaló az eredményeink alapján, hogy számos környezeti hatás képes indukálni a barna varangy ebihalak méregtermelését (lásd még Bókony *et al.*, 2017), amely arra utalhat, hogy a bufadienolidok többféle veszély ellen is hatékony védelmet biztosítanak. Habár nem találtunk arra utaló bizonyítékot, hogy e vegyületek más fajokkal szemben allelopatikus hatással bírnának (**II. cikk**), azt kimutattuk, hogy a megfigyelt méregmennyiség megvédi az ebihalakat a gerinces ragadozóktól, de kevésbé hatékony a gerinctelen ragadozókkal szemben, amelyek adaptálódhattak, hogy mérsékeljék a bufadienolidok hatását (**III. cikk**). Tehát a ragadozó és préda közötti koevolúciós fegyverkezési versenyben bizonyos ragadozókkal szemben a varangyok állnak nyeresre a szaporodó helyeiken, míg mások esetében nem.

Eredményeink azt is sugallják, hogy az egyedfejlődés során megfigyelhető bufadienolid mennyiség változás az ontogenezis során megjósolhatóan alakuló predációs veszélyhez való alkalmazkodás következménye és így konstitutív, életkor függő változást képvisel a ragadozók elleni védelemben (**I. cikk**).

Fontos, hogy eredményeink valószínűleg az egyidejűleg ható természetes szelekció következményeit tükrözik, hiszen a méregtermelésben bekövetkezett indukált változásokat

ugyanabban a környezetben figyeltük meg, amelyben az ebihalak az indukáló kémiai szignálokat, tehát a táplálékhiányt (**I. cikk**), a versenytársakat (**II. cikk**), illetve a ragadozókra utaló szaganyagokat (**IV. cikk**) észlelték. Ezen felül, a megfigyelt változásokat olyan ragadozók okozták, amelyek a természetben együtt fordulnak elő a barna varangy ebihalakkal (**IV. cikk**).

Megválaszolatlan marad azonban a kérdés, hogy végtére is mennyire költséges az indukálható kémiai védekezés és kifejeződése milyen csereviszonyban áll más fontos életmenet jellemzőkkel (**I. és III. cikk**). Azonban a költségek sok esetben nehezen kimutathatóak (DeWitt *et al.*, 1998; Pigliucci, 2005), részben mivel nem feltétlenül nyilvánulnak meg a plasztikus válasszal egy időben, különösen olyan fajoknál, amelyek, a kételtűekhez hasonlóan, komplex életmenettel rendelkeznek (Tollrian & Harvell, 1999; Van Buskirk & Saxer, 2001; Benard, 2004; Steiner, 2007).

Összességében vizsgálataink rávilágítanak azon környezeti tényezők sokszínűségére, amelyek befolyásolhatják a gerincesek kémiai védekezésének kifejeződését és hatékonyságát, mint például a ragadozók és a kémiai védettséget élvező prédáik koevolúciós története, a ragadozók méreg érzékenysége, vagy más környezeti faktorok hatása (lásd még Bókony *et al.*, 2016; Bókony *et al.*, 2017). Ezért, ha plasztikus kémiai védekezés kimutatására törekszünk, figyelembe kell vennünk e sokszínűség jelentőségét. A jövőbeli kutatásoknak célja kell, hogy legyen a ragadozók és versenytársak kombinált hatásának egyértelmű vizsgálata. Szintén további vizsgálatok szükségesek, hogy a bufadienolidok más veszéllyel (pl. kannibalizmussal és kórokozókkal) szembeni hatékonyságát egyértelműen tesztelhesük (de lásd Ujszegi *et al.*, 2017).

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom családomnak és barátnőmnek, Szabó Krisztinának, akik folyamatos támogatása lehetővé tette, hogy megvalósítsam gyermekkori álmomat, hogy biológus lehessek; témavezetőmnek, Hettyey Attilának és statisztika gurumnak, Bókony Veronikának a bizalmukért és útmutatásukért; Kathi Mahrnak, Herbert Hoinak, Szederkényi Márknak, valamint a Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport minden korábbi és jelenlegi munkatársának segítségükért, és a remek munkahelyi hangulatért; Móricz Ágnesnek és Krüzselyi Dánielnek a HPLC analízisekben nyújtott segítségükért és minden szerzőtársamnak tanácsaikért és konstruktív kritikáikért. Külön köszönettel tartozom korábbi témavezetőmnek,

Üveges B.: A környezet hatása kételtűek kémiai védekezésének változatosságára
Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Varga Zoltánnak, továbbá Verebélyi Viktóriának a kísérleti állatokról készített rajzaiért és, hogy megengedte, hogy felhasználjam őket a disszertációmban. A következő szervezetek és pályázatok nyújtottak anyagi segítséget a disszertációban közölt kutatások elvégzéséhez: az Osztrák Tudomány- és Kutatásügyi Minisztérium egy Sparkling Science projektje (BmWF, SPA 04/171), egy FP7 Marie Curie Career Integration Grant (PCIG13-GA-2013-631722), a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja (LP2012-24/2012), az MTA Fiatal Kutatói programja és Bolyai János ösztöndíja, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K-115402).

Introduction

Phenotypic plasticity

Populations of species constantly evolve to adapt to various environmental conditions under which they have to live and propagate. However, abiotic and biotic environmental conditions perpetually change even during the lifetime of individuals, therefore organisms have to possess flexible responses to be able to adapt to the diverse challenges at hand (West-Eberhard, 2003). Indeed, individuals can adjust their phenotype to environmental factors by changing their physiology, morphology, development and growth rate, as well as behaviour (Harvell, 1990; Tollrian & Harvell, 1999; West-Eberhard, 2003; Miner *et al.*, 2005). This ability of a given genotype to produce different phenotypes under different environmental conditions is called phenotypic plasticity (West-Eberhard, 1989; Futuyma, 1998; West-Eberhard, 2003; Pigliucci, 2005) and its fundamental effects on shaping diversity, and ecological and evolutionary processes have been extensively recognised (Harvell, 1990; Tollrian & Harvell, 1999; Agrawal, 2001; West-Eberhard, 2003; Miner *et al.*, 2005; Fordyce, 2006; Pfennig *et al.*, 2010). Inducible defences (Harvell, 1990; Tollrian & Harvell, 1999) are special cases of phenotypically plastic responses to biotic environmental factors, such as predators, competitors, pathogens and parasites.

An ecologically and evolutionary important adaptation in interspecific interactions is the accumulation and use of toxic substances, which is widespread in all domains of life (Keeler & Tu, 1991; Singh & Tu, 1996; Mebs, 2001; Brodie, 2009; Fry *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2011; Casewell *et al.*, 2013; Makarova *et al.*, 2013). While the ability of inducible expression of toxins in response to disturbance by enemies is well-known in plants (Tollrian & Harvell, 1999; Chen, 2008; McCall & Fordyce, 2010), it is scarcely studied if animals are capable of displaying plastic responses to threats by upregulating the synthesis of toxins or selectively expressing them (Hettyey *et al.*, 2014).

Inducibility of animal chemical defences

Apart from their function in predation (Fry *et al.*, 2009; Casewell *et al.*, 2013), the utilization of toxic or noxious compounds for deterring enemies, i.e. chemical defence, is also widespread (Mebs, 2001; Brodie, 2009). Such deterrent compounds have been identified in various taxa, and their effects on adversaries (such as predators, and potentially parasites and pathogens) are well-known in many cases (Blum, 1981; Tachibana, 1988; Pawlik, 1993; Toledo & Jared, 1995;

Mebs, 2001; Cunha Filho *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2008; Savitzky *et al.*, 2012). Moreover, animal toxins are intensively studied as starting points in pharmaceutical research (Fox & Serrano, 2007; King, 2011).

Given that we possess such a vast knowledge about naturally occurring toxins and their host animals, and that toxins play such an important role in the ecology and evolution of chemically defended species and their enemies (e.g. Brodie *et al.*, 2002; Hanifin *et al.*, 2008; Dobler *et al.*, 2012), it is surprising that the inducibility of chemical defences has received little attention in the past (Hettyey *et al.*, 2014). Only a few studies have tested for inducible chemical defences in animals, showing that sessile invertebrates respond to predation risk or structural damage with increased toxin production (Ebel *et al.*, 1997; Slattery *et al.*, 2001; Thornton & Kerr, 2002), and common toad (*Bufo bufo*) tadpoles respond similarly to contaminants (Bókony *et al.*, 2017). Whether predators induce toxin synthesis in vertebrate prey has remained controversial (Benard & Fordyce, 2003; Hagman *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2015; Bucciarelli *et al.*, 2017) since former studies tested in this regard either species (California newts, *Taricha torosa*; Bucciarelli *et al.*, 2017) whose ability to actively synthesise toxic compounds is doubtful (Daly, 2004; Chau *et al.*, 2011; Bane *et al.*, 2014, but see Hanifin *et al.*, 2002; Lehman *et al.*, 2004), or species in which active production was not explicitly demonstrated in the same life stage when the inducing environmental factors were presented to animals (Benard & Fordyce, 2003; Hagman *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2009). Furthermore, some former studies used manually simulated predator attacks (Marion *et al.*, 2015; Bucciarelli *et al.*, 2017). By using such an approach, the authors may have induced a non-selective, general stress response in their test animals rather than an anti-predator defence. Also, close to nothing is known about the effect of competitors and the costs of induced defences in this regard (Benard & Fordyce, 2003; Hagman *et al.*, 2009; Hettyey *et al.*, 2014).

Amphibians as model organisms

Amphibians are classic model organisms in phenotypic plasticity research (Miner *et al.*, 2005). Especially tadpoles of anurans (i.e. frogs and toads) have been shown to display plastic changes in morphology, behaviour and several life-history traits against various environmental factors, including predators and competitors (Laurila *et al.*, 1998; Chivers *et al.*, 1999; Lardner, 2000; Van Buskirk & McCollum, 2000; Relyea, 2001; Van Buskirk, 2002; Van Buskirk & Arioli, 2002; Relyea, 2003; 2004; Kishida & Nishimura, 2005; Steiner, 2007). Moreover, amphibians

are also known to utilize a plethora of toxic compounds for self-defence (Toledo & Jared, 1995; Daly, 2003), therefore they are suitable model organisms for studying the ecology and evolution of induced chemical defences.

Among anurans, bufonid toads are one of the most notorious for having toxic skin secretions (Toledo & Jared, 1995). The main toxic components of bufonid poison are bufadienolides (Flier *et al.*, 1980; Krenn & Kopp, 1998; Mebs *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010), which are cardiotoxic steroid derivatives with a Na⁺/K⁺ ATPase inhibitory function (Flier *et al.*, 1980; Pierre & Xie, 2006; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Lingrel, 2010). Toads contain these compounds from a very early age on (Mebs *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2009; Bókony *et al.*, 2016; Bókony *et al.*, 2017; Ujszegi *et al.*, 2017), however, active toxin production in the tadpole stage has not been explicitly demonstrated before (Benard & Fordyce, 2003; Hayes *et al.*, 2009). Nonetheless, bufadienolides effectively deter many predator species, and inhibit even some parasites and pathogens *in vitro* (Kruse & Stone, 1984; Henrikson, 1990; Denton & Beebee, 1991; Peterson & Blaustein, 1991; Lawler & Hero, 1997; Cunha Filho *et al.*, 2005; Gunzburger & Travis, 2005; Tempone *et al.*, 2008). Furthermore, toad tadpoles have been observed to have strong negative effects on competitors, such as larvae of other anuran species (Licht, 1967; Wilbur & Alford, 1985). It has been proposed that amphibian tadpoles interfere with each other using chemical compounds (Licht, 1967), and although the mediating agents are not known, in one case (Crossland & Shine, 2012), bufadienolides have been suggested as potential culprits causing the allelopathic effect (Reigosa *et al.*, 2006). Therefore, bufadienolides may play an important role in the defence of toads against multiple environmental threats.

Aims and methods

In the studies presented here, our general aim was to investigate predator- and competitor-induced chemical defence in vertebrates using tadpoles of the common toad (*Bufo bufo*) as model organisms. Common toad tadpoles are less plastic than other species in terms of inducible morphological or behavioural defences (Laurila *et al.*, 1998; Lardner, 2000; Van Buskirk, 2002), but contain bufadienolide toxins already in the larval stages (Mebs *et al.*, 2007; Bókony *et al.*, 2016; Bókony *et al.*, 2017; Ujszegi *et al.*, 2017) and several predators find them unpalatable (Henrikson, 1990; Denton & Beebee, 1991). This suggests that toad tadpoles are mainly dependent on an effective toxin arsenal for deterring enemies. Throughout the text I

refer to the corresponding scientific papers and their content using bold-faced roman numbers (I – IV).

In our studies we kept tadpoles in the laboratory or in outdoor mesocosms. Mesocosms are self-sustaining experimental areas, which provide semi-natural circumstances for focal animals. In research involving amphibian tadpoles, mesocosms are containers in the size range from a couple to approximately 1000 litres, that contain shelter (usually leaves) and are inoculated with naturally occurring phyto- and zooplankton (e.g. Van Buskirk, 2002; Relyea, 2004; Bókonyi *et al.*, 2017). We sampled toad tadpoles for the chemical analysis by conserving them in 70 percent (Papers I and III) or absolute methanol (Papers II and IV). We analysed toxin content using high-performance liquid chromatography with diode-array detection and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). After the experiments we released all remaining animals at the site of their collection. We analysed data regarding toxin content using general and generalized linear mixed-effects models in R (R Development Core Team, 2017).

► **Paper I** *Ontogenetic variation and inducibility of chemical defence*

During this experiment, our aims were to examine ontogenetic variation in bufadienolide content of common toads during their larval and post-metamorphic life stages, to investigate if cues on predation threat induce changes in toxin production during ontogeny and to assess the energetic costs associated with plastic responses in toxin synthesis.

For this experiment we used the offspring of 10 adult toad pairs. Upon hatching, we sampled 4 tadpoles from each family to estimate the baseline bufadienolide content at the start of larval development. After hatching, we kept toad tadpoles in the laboratory in groups of three in 1.5 L reconstituted soft water (RSW). We employed a three-factorial experimental design with two predator-cue treatments (control vs. chemical cues on predation risk, provided by separately housed southern hawker larvae, *Aeshna cyanea*; and adult, male smooth newts, *Lissotriton vulgaris*), two food levels (*ad libitum* vs. limited food), and four sampling occasions during the larval and early metamorphic life stages. We analysed 200 samples in total.

► **Paper II** *Competitor-induced chemical defence*

This study intended to experimentally test the hypothesis that conspecific or heterospecific competitors induce elevated bufadienolide synthesis in toads, and to investigate if toad tadpoles are capable of utilizing their toxins as allelochemicals to suppress competitors.

We collected eggs from nine freshly laid common toad clutches and from nine freshly laid agile frog (*Rana dalmatina*) clutches and raised the tadpoles in 40 L outdoor mesocosms in differing densities. The densities were chosen to reflect low, medium and high levels of competition. Three treatment groups contained only toad tadpoles to test if the production of bufadienolides is adjusted to the density of conspecifics. Three treatment groups contained tadpoles of both species to compare the effect of conspecifics to the effect of heterospecifics on the production of bufadienolides. Finally, two treatment groups contained agile frog tadpoles only, serving as controls for testing whether toad tadpoles inhibit the growth and development of heterospecific larvae. At the termination of the experiment we weighed all tadpoles and we preserved toad tadpoles ($n = 398$) in methanol and agile frog tadpoles ($n = 216$) in 50 % ethanol. We identified the developmental stage of all tadpoles by stereomicroscopic examination.

► **Paper III** *Inducibility of chemical defence by different predators*

In this study we investigated whether tadpoles adjust their chemical defences to predation threat in general and specifically to the presence of four, phylogenetically distantly related predator species largely differing in voraciousness, and assessed the adaptive value of the induced defence.

We raised toad tadpoles from 12 families in 130 L outdoor mesocosms in the presence or absence of larvae of the southern hawker (*A. cyanea*, hereafter dragonfly), adult backswimmers (*Notonecta* sp.), juvenile three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) or adult male smooth newts (*L. vulgaris*). Predators were housed in partially submerged cages, one cage per mesocosm. We collected samples for the chemical analysis on two occasions: first, we haphazardly selected one individual from each mesocosm 13 or 14 days after start of the experiment ($n = 60$); second, we conserved one toad tadpole to start metamorphosis from each mesocosm ($n = 60$). We collected further data on tadpole behaviour, body mass, morphology, length of larval development, and survival.

To assess the adaptive value of induced defences, on day 13 of the experiment we placed 6 toad tadpoles each into 40 L predation-trial tubs, accompanied by 6 common frog (*Rana*

temporaria) tadpoles. For each predator species and each toad family we used two predation-trial tubs: we introduced 6 toad tadpoles that had been raised with predators into one of the tubs, and we placed 6 predator-naïve control toad tadpoles into the other tub. This resulted in 96 predation-trial tubs (4 predator species × 2 toad tadpole treatment, i.e. raised with or without a predator × 12 families). After a 24-hour acclimatization period for tadpoles (on day fourteen) we released the assigned predator into each predation-trial tub. After termination we counted survivors of both tadpole species and assessed body size of predators.

► **Paper IV** *Among population variation in predator-induced chemical defence*

During this experiment our aim was to test for among-population differences in predator-induced chemical defences of common toads.

We collected eggs from ten common toad egg strings from each of six water bodies. Three of these water bodies are permanent ponds inhabited by fish, while the other three are temporary ponds lacking fish. We kept toad tadpoles individually, in 0.7 L RSW in the laboratory in the presence or absence of predator cues from larvae of the emperor dragonfly (*Anax imperator*), adults of the European perch (*Perca fluviatilis*) or adult males of the smooth newt (*L. vulgaris*). At the termination of the experiment we conserved all 240 individuals for chemical analysis.

Novel scientific results

- We demonstrated plastic chemical defence, i.e. an increase in bufadienolide content, induced by food deprivation (**Paper I**), conspecifics (**Paper II**) and predators (**Paper IV**).
- Tadpoles displayed the observed plastic responses in the same (larval) life stages when the inducing cues were presented.
- We demonstrated *de novo* synthesis of toxic compounds in amphibian larvae (**Paper I**).
- We observed a hitherto undescribed pattern of change in bufadienolide content during early life of bufonid toads, which mirrors ontogenetic change in tadpole vulnerability to predators (**Paper I**).

- ▶ Regardless of experimental treatment, toad tadpoles were vulnerable to dragonfly larvae and to a lesser degree to backswimmers, but were mostly unpalatable to backswimmers and smooth newts (**Paper III**).
- ▶ When exposed to free-ranging dragonfly larvae, toad tadpoles that developed in the presence of caged specimens of this predator had higher survival compared to their predator-naïve conspecifics (**Paper III**).
- ▶ We detected variation among tadpoles according to population of origin in the intensity of predator-induced changes in the number of bufadienolide compounds, but not in the intensity of responses in total bufadienolide quantity (**Paper IV**).

Discussion

Together, our studies represent the most comprehensive investigation of plastic chemical defences in any animal species to date. It is clear from our results, that various environmental factors can induce bufadienolide synthesis in common toads (see also Bókony *et al.*, 2017), suggesting that toxins may be effective against multiple threats. Albeit we did not find allelopathic effects of these compounds against heterospecific competitors (**Paper II**), we show that the observed bufadienolide levels effectively deter vertebrate predators, but are less efficient in fending off invertebrates, which may have evolved adaptations to mitigate effects of bufadienolides (**Paper III**). Thus, in the co-evolutionary arms race between predators and prey, toad tadpoles seem to have an advantage over some, but not all predators in breeding ponds.

Our results also suggest that changes in toxin content during development may be consequences of adaptation to predictable variation in predation risk during ontogeny, and therefore represent constitutive age-dependent changes in defence against predators (**Paper I**).

Importantly, our findings are likely to reflect the outcome of concurrent natural selection because we observed inducible changes in toxin synthesis manifesting in the same environment in which study organisms experienced the inducing cues, i.e. food deprivation (**Paper I**), competition (**Paper II**) and cues on predation threat (**Paper IV**), and also because the observed changes were induced by predators that co-occur with common toad tadpoles in natural populations (**Paper IV**).

Unanswered remains however the question of how costly ultimately induced chemical defences are and how their expression trades off against other important life-history traits

(**Papers I and III**). After all, costs are often challenging to demonstrate (DeWitt *et al.*, 1998; Pigliucci, 2005), partly because they do not necessarily appear synchronously with the plastic response, and especially so in species with complex life histories, such as amphibians (Tollrian & Harvell, 1999; Van Buskirk & Saxer, 2001; Benard, 2004; Steiner, 2007).

Collectively, our studies highlight the diversity of factors which can influence the expression and effectiveness of vertebrate chemical defences, such as the co-evolutionary history of predators and their chemically defended prey, the sensitivity of predators to toxins, as well as exposure of prey to environmental stimuli other than predation (see also Bókony *et al.*, 2016; Bókony *et al.*, 2017). Therefore, to detect plastic chemical defences, it is necessary to consider the implications of this complexity. Future studies should focus on explicitly testing the combined effect of conspecifics and predatory cues on toxin synthesis. Further experiments are also needed to explicitly test the effectiveness of bufadienolides against other threats (e.g. pathogens or cannibalism, but see Ujszegi *et al.*, 2017).

Acknowledgements

I would like to thank my family and my girlfriend, Krisztina Szabó, whose continuous support made it possible to fulfil my childhood dream and become a biologist; my supervisor, Attila Hettyey, and my master in statistics, Veronika Bókony, for their trust and guidance; Kathi Mahr, Herbert Hoi, Márk Szederkényi and all former and current colleagues at the Lendület Evolutionary Ecology Research Group for their help and for providing a pleasant work environment; Ágnes Móricz and Dániel Krüzselyi for their assistance with the HPLC analyses; and all co-authors for their suggestions and constructive criticism. I owe special thanks to my former supervisor Dr. Varga Zoltán, and further to Viktória Verebélyi for her illustrations of study animals and her permission to use them in my dissertation. Financial support for the work presented in the dissertation was provided by a Sparkling Science Project of the Federal Ministry of Science and Research, Austria (BmWF, SPA 04/171), an FP7 Marie Curie Career Integration Grant (PCIG13-GA-2013-631722), the Lendület programme (LP2012-24/2012) of the Hungarian Academy of Sciences (MTA), the MTA Young Researcher programme, the MTA János Bolyai Scholarship and the National Research, Development and Innovation Office (NKFIH) of Hungary (K-115402).

Irodalomjegyzék/References

- Agrawal, A.A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294**: 321-326.
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A. & Furey, A. 2014. Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins* **6**: 693-775.
- Benard, M.F. & Fordyce, J.A. 2003. Are induced defenses costly? Consequences of predator-induced defenses in western toads, *Bufo boreas*. *Ecology* **84**: 68-78.
- Benard, M.F. 2004. Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**: 651-673.
- Blum, M.S. 1981. *Chemical defenses of Arthropods*. Academic Press Inc. , New York, USA.
- Bókony, V., Móricz, Á.M., Tóth, Z., Gál, Z., Kurali, A., Mikó, Z., Pásztor, K., Szederkényi, M., Tóth, Z., Ujszegi, J., Üveges, B., Krüzselyi, D., Capon, R.J., Hoi, H. & Hettyey, A. 2016. Variation in chemical defense among natural populations of common toad, *Bufo bufo*, tadpoles: the role of environmental factors. *Journal of Chemical Ecology* **42**: 329-338.
- Bókony, V., Mikó, Z., Móricz, Á.M., Krüzselyi, D. & Hettyey, A. 2017. Chronic exposure to a glyphosate-based herbicide makes toad larvae more toxic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**: 20170493.
- Brodie, E.D., III 2009. Toxins and venoms. *Current Biology* **19**: R931-R935.
- Brodie, E.D., Jr., Ridenhour, B.J. & Brodie, E.D., III. 2002. The evolutionary response of predators to dangerous prey: Hotspots and coldspots in the geographic mosaic of coevolution between garter snakes and newts. *Evolution* **56**: 2067-2082.
- Bucciarelli, G.M., Shaffer, H.B., Green, D.B. & Kats, L.B. 2017. An amphibian chemical defense phenotype is inducible across life history stages. *Scientific Reports* **7**: 8185.
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A. & Fry, B.G. 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 219-229.
- Chau, R., Kalaitzis, J.A. & Neilan, B.A. 2011. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquatic Toxicology* **104**: 61-72.
- Chen, M.S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* **15**: 101-114.
- Chivers, D.P., Kiesecker, J.M., Marco, A., Wildy, E.L. & Blaustein, A.R. 1999. Shifts in life history as a response to predation in western toads (*Bufo boreas*). *Journal of Chemical Ecology* **25**: 2455-2463.
- Corning, P.A. & Szathmáry, E. 2015. "Synergistic selection": A Darwinian frame for the evolution of complexity. *Journal of Theoretical Biology* **371**: 45-58.
- Crossland, M.R. & Shine, R. 2012. Embryonic exposure to conspecific chemicals suppresses cane toad growth and survival. *Biology Letters* **8**: 226-229.
- Cunha Filho, G.A., Schwartz, C.A., Resck, I.S., Murta, M.M., Lemos, S.S., Castro, M.S., Kyaw, C., Pires, O.R., Jr., Leite, J.R., Bloch, C., Jr. & Schwartz, E.F. 2005. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon* **45**: 777-782.
- Daly, J.W. 2003. Ernest Guenther Award in Chemistry of Natural Products. Amphibian skin: A remarkable source of biologically active arthropod alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**: 445-452.
- Daly, J.W. 2004. Marine toxins and nonmarine toxins: Convergence or symbiotic organisms? *Journal of Natural Products* **67**: 1211-1215.

- Denton, J. & Beebee, T.J.C. 1991. Palatability of anuran eggs and embryos. *Amphibia-Reptilia* **12**: 111-112.
- DeWitt, T.J., Sih, A. & Wilson, D.S. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 77-81.
- Dobler, S., Dalla, S., Wagschal, V. & Agrawal, A.A. 2012. Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na,K-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 13040-13045.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H.J. & Proksch, P. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 1451-1462.
- Flier, J., Edwards, M.W., Daly, J.W. & Myers, C.W. 1980. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na⁺,K⁺-ATPase. *Science* **208**: 503-505.
- Fordyce, J.A. 2006. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2377-2383.
- Fox, J.W. & Serrano, S.M.T. 2007. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: An overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Current Pharmaceutical Design* **13**: 2927-2934.
- Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D.A., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C. & Rodríguez de la Vega, R.C. 2009. The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **10**: 483-511.
- Futuyma, D.J. 1998. *Evolutionary biology*, 3. edn. Sinauer Associates, Sunderland.
- Gao, H., Zehl, M., Leitner, A., Wu, X., Wang, Z. & Kopp, B. 2010. Comparison of toad venoms from different *Bufo* species by HPLC and LC-DAD-MS/MS. *Journal of Ethnopharmacology* **131**: 368-376.
- Gunzburger, M.S. & Travis, J. 2005. Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *Journal of Herpetology* **39**: 547-571.
- Hagman, M., Hayes, R.A., Capon, R.J. & Shine, R. 2009. Alarm cues experienced by cane toad tadpoles affect post-metamorphic morphology and chemical defences. *Functional Ecology* **23**: 126-132.
- Hanifin, C.T., Brodie, E.D., III & Brodie, E.D., Jr. 2002. Tetrodotoxin levels of the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*, increase in long-term captivity. *Toxicon* **40**: 1142-1153.
- Hanifin, C.T., Brodie, E.D., Jr. & Brodie, E.D., III 2008. Phenotypic mismatches reveal escape from arms-race coevolution. *PLoS Biology* **6**: e60.
- Harvell, C.D. 1990. The ecology and evolution of inducible defenses. *Quarterly Review of Biology* **65**: 323-340.
- Hayes, R.A., Crossland, M.R., Hagman, M., Capon, R.J. & Shine, R. 2009. Ontogenetic variation in the chemical defenses of cane toads (*Bufo marinus*): toxin profiles and effects on predators. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 391-399.
- Henrikson, B.-I. 1990. Predation on amphibian eggs and tadpoles by common predators in acidified lakes. *Holarctic Ecology* **13**: 201-206.
- Hettyey, A., Tóth, Z. & Van Buskirk, J. 2014. Inducible chemical defences in animals. *Oikos* **123**: 1025-1028.
- Keeler, R.F. & Tu, A.T. 1991. *Toxicology of plant and fungal compounds*. CRC Press, New York, USA.

- King, G.F. 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy* **11**: 1469-1484.
- Kishida, O. & Nishimura, K. 2005. Multiple inducible defences against multiple predators in the anuran tadpole, *Rana pirica*. *Evolutionary Ecology Research* **7**: 619-631.
- Krenn, L. & Kopp, B. 1998. Bufadienolides from animal and plant sources. *Phytochemistry* **48**: 1-29.
- Kruse, K.C. & Stone, B.M. 1984. Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) learn to avoid feeding on toad (*Bufo*) tadpoles. *Animal Behaviour* **32**: 1035-1039.
- Lardner, B. 2000. Morphological and life history responses to predators in larvae of seven anurans. *Oikos* **88**: 169-180.
- Laurila, A., Kujasalo, J. & Ranta, E. 1998. Predator-induced changes in life history in two anuran tadpoles: effects of predator diet. *Oikos* **83**: 307-317.
- Lawler, K.L. & Hero, J.-M. 1997. Palatability of *Bufo marinus* tadpoles to a predatory fish decreases with development. *Wildlife Research* **24**: 327-334.
- Lehman, E.M., Brodie, E.D., Jr. & Brodie, E.D., III 2004. No evidence for an endosymbiotic bacterial origin of tetrodotoxin in the newt *Taricha granulosa*. *Toxicon* **44**: 243-249.
- Licht, L.E. 1967. Growth inhibition in crowded tadpoles: intraspecific and interspecific effects. *Ecology* **48**: 736-745.
- Lingrel, J.B. 2010. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annual Review of Physiology* **72**: 395-412.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. 2013. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research* **41**: 4360-4377.
- Marion, Z.H., Fordyce, J.A. & Fitzpatrick, B.M. 2015. Extending the concept of diversity partitioning to characterize phenotypic complexity. *The American Naturalist* **186**: 348-361.
- Maynard Smith, J. 1982. The evolution of social behaviour - a classification of models. In: *Current problems in sociobiology* (K. s. C. S. Group, ed., pp. 29-44. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Maynard Smith, J. 1998. *Evolutionary genetics*, 2. edn. Oxford University Press, Oxford, UK.
- McCall, A.C. & Fordyce, J.A. 2010. Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? *Journal of Ecology* **98**: 985-992.
- Mebs, D. 2001. Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon* **39**: 87-96.
- Mebs, D., Wagner, M.G., Pogoda, W., Maneyro, R., Kwet, A. & Kauert, G. 2007. Lack of bufadienolides in the skin secretion of red bellied toads, *Melanophryniscus* spp. (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology* **144**: 398-402.
- Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K. & Relyea, R.A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 685-692.
- Pawlik, J.R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews* **93**: 1911-1922.
- Peterson, J.A. & Blaustein, A.R. 1991. Unpalatability in anuran larvae as a defense against natural salamander predators. *Ethology Ecology & Evolution* **3**: 63-72.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D. & Moczek, A.P. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 459-467.
- Pierre, S.V. & Xie, Z. 2006. The Na,K-ATPase receptor complex. *Cell Biochemistry and Biophysics* **46**: 303-315.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 481-486.

- R Development Core Team 2017. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing (<http://www.R-project.org/>).
- Reigosa, M.J., Pedrol, N. & González, L. 2006. *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Relyea, R.A. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology* **82**: 523-540.
- Relyea, R.A. 2003. How prey respond to combined predators: A review and an empirical test. *Ecology* **84**: 1827-1839.
- Relyea, R.A. 2004. Fine-tuned phenotypes: Tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology* **85**: 172-179.
- Savitzky, A.H., Mori, A., Hutchinson, D.A., Saporito, R.A., Burghardt, G.M., Lillywhite, H.B. & Meinwald, J. 2012. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. *Chemoecology* **22**: 141-158.
- Schoner, W. & Scheiner-Bobis, G. 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **7**: 173-189.
- Singh, B.R. & Tu, A.T. 1996. *Natural Toxins 2: Structure, mechanism of action, and detection*, 1 edn. Springer US, New York, USA.
- Slattery, M., Starmer, J. & Paul, V.J. 2001. Temporal and spatial variation in defensive metabolites of the tropical Pacific soft corals *Sinularia maxima* and *S. polydactyla*. *Marine Biology* **138**: 1183-1193.
- Steiner, U.K. 2007. Linking antipredator behaviour, ingestion, gut evacuation and costs of predator-induced responses in tadpoles. *Animal Behaviour* **74**: 1473-1479.
- Tachibana, K. 1988. Chemical defense in fishes. In: *Bioorganic Marine Chemistry*, Vol. 2 (P. J. Scheuer, ed.), pp. 117-138. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Tempone, A.G., Pimenta, D.C., Lebrun, I., Sartorelli, P., Taniwaki, N.N., de Andrade Jr, H.F., Antoniazzi, M.M. & Jared, C. 2008. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon* **52**: 13-21.
- Thornton, R.S. & Kerr, R.G. 2002. Induction of pseudopterosin biosynthesis in the Gorgonian *Pseudopteroorgia elisabethae*. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 2083-2090.
- Toledo, R.C. & Jared, C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology* **111**: 1-29.
- Tollrian, R. & Harvell, C.D. 1999. *The ecology and evolution of inducible defences*. Princeton University Press, New Jersey, USA.
- Ujszegi, J., Móricz, Á.M., Krüzselyi, D. & Hettyey, A. 2017. Skin toxin production of toads changes during early ontogeny but is not adjusted to the microbiota of the aquatic environment. *Evolutionary Ecology* **31**: 925-936.
- Van Buskirk, J. & McCollum, S.A. 2000. Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: morphology and behaviour influence mortality risk from predation. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 336-347.
- Van Buskirk, J. & Saxer, G. 2001. Delayed costs of an induced defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evolution* **55**: 821-829.
- Van Buskirk, J. 2002. A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. *The American Naturalist* **160**: 87-102.
- Van Buskirk, J. & Arioli, M. 2002. Dosage response of an induced defense: How sensitive are tadpoles to predation risk? *Ecology* **83**: 1580-1585.
- West-Eberhard, M.J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **20**: 249-278.

Üveges, B.: Environmental factors shaping the variability of amphibian chemical defences

Theses for doctoral (PhD) dissertation

- West-Eberhard, M.J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, USA.
- Wilbur, H.M. & Alford, R.A. 1985. Priority effects in experimental pond communities: Responses of *Hyla* to *Bufo* and *Rana*. *Ecology* **66**: 1106-1114.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H. & Inouye, M. 2011. Toxin-antitoxin systems in Bacteria and Archaea. *Annual Review of Genetics* **45**: 61-79.



Nyilvántartási szám: DEENK/257/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Üveges Bálint
Neptun kód: V5TNQV
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043270

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Bókony, V., **Üveges, B.**, Móricz, Á. M., Hettyey, A.: Competition induces increased toxin production in toad larvae without allelopathic effects on heterospecific tadpoles.
Funct. Ecol. 32 (3), 667-675, 2018. ISSN: 0269-8463.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.12994>
IF: 5.63 (2016)
2. **Üveges, B.**, Fera, G., Móricz, Á. M., Krüzselyi, D., Bókony, V., Hettyey, A.: Age- and environment-dependent changes in chemical defences of larval and post-metamorphic toads.
BMC Evol Biol. 17 (137), 1-10, 2017. ISSN: 1471-2148.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-017-0956-5>
IF: 3.221 (2016)

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (6)

3. Bókony, V., **Üveges, B.**, Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Nemesházi, E., Csíkvári, O., Hettyey, A.:
Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes.
Sci. Total Environ. 634, 1335-1345, 2018. ISSN: 0048-9697.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.363>
IF: 4.9 (2016)
4. **Üveges, B.**, Mahr, K., Szederkényi, M., Bókony, V., Hoi, H., Hettyey, A.: Experimental evidence for beneficial effects of projected climate change on hibernating amphibians.
Sci Rep. 6 (26754), 1-7, 2016. EISSN: 2045-2322.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26754>
IF: 4.259





5. Mizsei, E., **Üveges, B.**, Vági, B., Szabolcs, M., Lengyel, S., Pfliegler, V. P., Nagy, Z. T., Tóth, J. P.:
Species distribution modelling leads to the discovery of new populations of one of the least
known European snakes, *Vipera ursinii graeca*, in Albania.
Amphib. Reptil. 37 (1), 55-68, 2016. ISSN: 0173-5373.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/15685381-00003031>
IF: 1.287
6. Bókony, V., Móricz, Á. M., Tóth, Z., Gál, Z., Kurali, A., Mikó, Z., Pásztor, K., Szederkényi, M., Tóth,
Z., Ujszegi, J., **Üveges, B.**, Krüzselyi, D., Capon, R. J., Hoi, H., Hettyey, A.: Variation in
chemical defense among natural populations of common toad, *Bufo bufo*, tadpoles: the role
of environmental factors.
J. Chem. Ecol. 42 (4), 329-338, 2016. ISSN: 0098-0331.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-016-0690-2>
IF: 2.385
7. **Üveges, B.**, Halpern, B., Péchy, T., Posta, J., Komlósi, I.: Characteristics and heritability analysis
of head scales of the Hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*, Méhely 1893).
Amphib. Reptil. 33 (3-4), 393-400, 2012. ISSN: 0173-5373.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/15685381-00002842>
IF: 0.68
8. Mizsei, E., **Üveges, B.**: Novel defensive behaviours of both sexes of *Vipera ursinii graeca*
(Serpentes: Viperidae).
Herpetol Notes. 5, 481-483, 2012. ISSN: 2071-5773.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,362

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,851**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2018.06.19.

