



1949

**Édesvízi hidrák és szimbionták filogeográfiai és  
populációgenetikai vizsgálata**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

MIKLÓS MÁTÉ

Témavezető:

Tökölyi Jácint

egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2022



Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács a **Juhász Nagy Pál Doktori Iskola Evolúció- és Diverzitásbiológia doktori** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2022.

.....  
Miklós Máté

Tanúsítom, hogy **Miklós Máté** doktorjelölt **2017-2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Evolúció- és Diverzitásbiológia doktori** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2022.

.....  
Dr. Tökölyi Jácint

**Édesvízi hidrák és szimbiontaik filogeográfiai és populációgenetikai vizsgálata**

**Phylogeographic and population genetic study of freshwater hydras and their symbionts**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: **Miklós Máté** okleveles Hidrobiológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**  
(**Evolúció- és Diverzitásbiológia doktori** programja) keretében

Témavezető: Dr. Tökölyi Jácint

Az értekezés bírálói:

Dr. ....  
Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....  
tagok: Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 20... . . . . .

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
1.1. Általános bevezetés .....	1
1.2 A vizsgált modellszerkezet leírása .....	1
1.3 Általános vizsgálati célkitűzéseim .....	2
2. Tanulmányok.....	3
2.1. Kárpát-medencei <i>Hydra oligactis</i> populációk populációgenetikai összehasonlítása az eltérő szaporodási stratégiáik függvényében (1. tanulmány).....	3
2.1.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések.....	3
2.1.2. Anyagok és Módszerek .....	6
2.1.3. Eredmények.....	14
2.1.4. Diskusszió.....	22
2.2. Egy magyarországi <i>Hydra oligactis</i> populáció szezonális szaporodási stratégiájának vizsgálata (2. tanulmány).....	28
2.2.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések.....	28
2.2.2. Anyagok és Módszerek .....	31
2.2.3. Eredmények.....	33
2.2.4. Diskusszió.....	38
2.3. Egy magyarországi <i>Hydra oligactis</i> populáció szezonális genetikai változásának leírása egy kétéves periódus alatt (3. tanulmány).....	43
2.3.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések.....	43
2.3.2. Anyagok és Módszerek .....	46
2.3.3. Eredmények.....	49
2.3.4. Diskusszió.....	53
2.4. Kárpát-medencei <i>Hydra oligactis</i> populációk mikrobiom összetételének vizsgálata különböző szaporodási módok és élőhelytípusok függvényében (4. tanulmány).....	57
2.4.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések.....	57
2.4.2. Anyagok és Módszerek .....	59
2.4.3. Eredmények.....	61
2.4.4. Diskusszió.....	74
3. Összefoglalás.....	79
4. Summary .....	81
5. Köszönetnyilvánítás .....	83
6. Irodalomjegyzék.....	84
7. Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények listája .....	102

# 1. Bevezetés

## 1.1. Általános bevezetés

Az élővilág többsejtű eukarióta organizmusai esetében az ivaros szaporodás a legelterjedtebb szaporodási mód, hiszen az ide tartozó fajok több mint 99%-a ily módon szaporodik (Bell, 1982). Az ivaros szaporodó élőlények várhatóan előnyben vannak a heterogén környezetekben, mivel kihasználhatják a gyakoribb genetikai rekombináció előnyeit (Peck és mtsai, 1999), így lehetőséget teremtve a kedvező mutációk elterjedésének a populációkban, ezáltal lehetővé téve számukra, a különböző élőhelyekhez történő nagyobb mértékű alkalmazkodóképességet (Pound és mtsai, 2004). Ezzel szemben az ivartalan (klonális) szaporodás, ahol az utódok egyetlen szülőtől származnak, kisebb gyakorisággal figyelhetők meg az élővilágban, de a legtöbb nagyobb taxonómiai csoportban leírták már, kivéve az emlősöket és a madarakat (Avisé és mtsai, 1992). Az ivartalan módon szaporodó organizmusok populációi előnyben vannak a nagyobb szaporodási képességük miatt, mivel nem fizetik meg az ivaros szaporodás kétszeres költségét (Maynard-Smith, 1978), bár úgy gondolják, hogy kevésbé ellenállóak a környezeti feltételek változásaival szemben (Haldane, 1932). Feltételezhetően egyes organizmusok évmillióig sokasodhattak ivaros szaporodás nélkül (Welch és Meselson, 2000), bár napjainkra egyre több ritka ivaros szaporodási esetet figyeltek meg olyan fajoknál is, amelyeket korábban teljesen ivartalannak tekintettek (Maynard-Smith és mtsai, 1993; Tibayrenc és Ayala, 2002). Következésképpen a legtöbb faj, amely ivartalanul (klonálisan) szaporodik fakultatívan ivarosnak (vagy fakultatívan ivartalannak) tekinthető.

A doktori disszertációs munkám célja, a rendkívül összetett szaporodási rendszerrel rendelkező édesvízi hidrák természetes populációinak populációgenetikai és filogeográfiai vizsgálata volt. Az édesvízi hidrák szinte az egész világon elterjedt kontinentális álló- és folyóvizekben előforduló csalánozók (Cnidaria), melyek nem rendelkeznek medúza alakkal. A hidrák rendkívül változatos életmódjuk miatt fontos modellszervezetnek számítanak már az 1700 évektől kezdve a fejlődésbiológiában, ökofiziológiában, öregedéskutatásban és a mutualista gazda-szimbionta rendszerek tanulmányozásában.

## 1.2 A vizsgált modellszervezet leírása

A *Hydra oligactis* (Pallas, 1766) a csalánozók törzsébe (Hydrozoa osztályba) tartozó makroszkópikus édesvízi gerinctelen zooplankton fogyasztó, helytülő ragadozó. A *H. oligactis* Euráziában és Észak-Amerikában egyaránt elterjedt

(Martínez és mtsai, 2010) és gyakran megtalálható vízi élőhelyeken (Holstein, 1995; Schuchert, 2010), de a hidegebb és mélyebb víztesteket részesíti előnyben, mivel csak gyenge hősokk-választ képes generálni (Brennecke és mtsai, 1998). A *H. oligactis* életciklusa magába foglalja az ivartalan (bimbózás) és az ivaros szaporodást is (Reisa, 1973). Az ivartalan fázis általában tavasszal és kora nyáron következik be, míg az ivaros szaporodás nyár végén és ősszel történik (Reisa, 1973), mivel az őszi erős vízhőmérséklet-csökkenés váltja ki azt ezekben az állatokban (Lenhoff, 1983; Littlefield és mtsai, 1991; Reisa, 1973). Az ivaros szaporodás a gonádok (hímeknél herék, nőstényeknél peték; azaz váltivarú fajról beszélünk) képzéséből áll. A megtermékenyítést követően a zigóta leválik az anyaállatról és az aljzatra süllyed, majd a kikelése után újakezdi az ivartalan életszakaszát.

### 1.3 Általános vizsgálati célkitűzéseim

**1. tanulmány:** E tanulmányban a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a különböző párhuzamosan létező szaporodási stratégiák (ivartalan és ivaros) genetikai hátterét és differenciálódását a természetes *Hydra oligactis* populációkban.

**2. tanulmány:** Ebben a munkában megvizsgáltuk a tavasszal és ősszel gyűjtött polipokból alapított, standard laboratóriumi körülmények között tartott *H. oligactis* törzsek ivaros szaporodásra vonatkozó készülségi állapotát.

**3. tanulmány:** E munka fő célja az volt, hogy az előző vizsgálatban is szereplő *H. oligactis* populáció genetikai összetételének szezonális változását vizsgáljuk meg, valamint összevessük az egyedek ivaros készülségi állapotát a genotípusukkal.

**4. tanulmány:** Ebben a tanulmányban közép-európai víztestekben együtt élő édesvízi hidra fajok esetében (*H. oligactis*, *H. vulgaris* és *H. circumcincta*) vizsgáltuk a gazdaszervezethez tartozó mikrobiom taxonómiai diverzitását és annak eltéréseivel összefüggő külső és belső tényezőket.

## 2. Tanulmányok

### 2.1. Kárpát-medencei *Hydra oligactis* populációk populációgenetikai összehasonlítása az eltérő szaporodási stratégiáik függvényében (1. tanulmány)

#### 2.1.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések

A szaporodás ivaros és ivartalan formáinak egyazon életcikluson belüli jelenléte igen nagy hatással van a fakultatívan ivartalan organizmusok demográfiájára, genetikájára és életmenetére (Halkett és mtsai, 2005). Számos esetben az ivartalan és ivaros szaporodási formát különálló stratégiáknak tekintik, amelyeknek átlagosan különböző „fitnesz-eredményei” lesznek az adott környezeti feltételektől függően, ezért a szelekció igen eltérő módon alakítja őket (pl.: Gardner és Mangel, 1997). Ennek megfelelően számos fakultatívan klonális faj életmenet stratégiája jelentősen eltér egymástól a szaporodási módjuktól függően. Jónéhány élőlénycsoportban (pl.: növények, szivacsok, csalánozók, laposférgek, gyűrűsférgek, ágascsapú rákok) megfigyelhető, hogy számos ide tartozó ivartalanul szaporodó organizmus kisebb öregedést és jelentősen meghosszabbodott élettartamot mutat (összefoglalva: Nilsson Sköld és Obst, 2011, de lásd még Martínez és Levinton, 1992), mint az azonos fajhoz vagy közeli rokon taxonokhoz tartozó ivarosan szaporodó egyedek. Ez legjobban a csalánozók (Yoshida és mtsai, 2006), a planáriák (Baguña, 1998) és a gyűrűsférgek (Zattara és Bely, 2016) esetében figyelhető meg, ahol az ivartalan egyedek képesek az elveszett testrészek nagymértékű regenerálására, valamint elkerülik az öregedési folyamatokat is, pluripotens őssejtjeiknek köszönhetően (Aboobaker, 2011; Elliott és Sánchez Alvarado, 2013; Newmark és Alvarado, 2002; Rink, 2013; Tan és mtsai, 2012; Valenzano és mtsai, 2017). Ezzel szemben azok az egyedek/fajok, amelyek ivaros szaporodási stratégiát követnek, vagy ivartalan szaporodásról ivarosra váltanak, gyakran elveszítik regenerációs képességüket és ebben az esetben megnövekszik az öregedési arányuk (Baguña és mtsai, 1999; Kobayashi és Hoshi, 2002; Krois és mtsai, 2013; Tan és mtsai, 2012). Például az édesvízi csalánozók esetében a *Hydra oligactis* ivartalan egyedei évekig tarthatók a laboratóriumban anélkül, hogy megfigyelhető lenne a mortalitásuk korszpecifikus növekedése vagy a fekunditásuk csökkenése (Brien, 1953; Martínez és mtsai, 2010; Tomczyk és mtsai, 2015). Az ivartalan szaporodásról ivaros szaporodásra való áttérés esetükben azonban egy öregedésszerű folyamatot eredményez, amely az őssejtek eltűnéséből, a regenerációs képesség elvesztéséből, a testméret csökkenéséből és végső soron a mortalitás növekedéséből áll (Brien, 1953; Sebestyén és mtsai, 2018; Tomczyk és mtsai, 2020, 2019; Yoshida és mtsai, 2006).

Viszonylag könnyű megmagyarázni, hogyan alakulhattak ki a szaporodási módtól függő életmenet stratégiák, ha az ivartalan és az ivaros stratégiák allopatrikusan különböző környezetekben fordulnak elő. Például a klonális szaporodásra képes, édesvízi kistestű állatoknál az ivartalan és ivaros stratégiák gyakran genetikailag rögzítettek (Ament-Velásquez és mtsai, 2016; Pongratz és mtsai, 1998, 2003; Simon és mtsai, 2003). Ezen túlmenően egyes élőlények esetében megfigyelhető, hogy az ivartalan egyedek megjelenése csak az adott populáció elterjedési területének szélére (Peck és mtsai, 1998), vagy csak az efemer élőhelyekre korlátozódik (Dudycha és Hassel, 2013).

Viszont a különböző életmenetek evolúciója még érdekesebb, ha alternatív szaporodási stratégiák egyidejűleg léteznek ugyanabban a környezetben. Ha genetikailag elkülönülő ivaros és ivartalan leszármazási vonalak együtt fordulnak elő, az elmélet alapján azt várnánk, hogy az ivartalan vonalaknak lassan el kell tűnniük, mert lassan integrálják a kedvező mutációkat, de gyorsan halmozzák fel a káros mutációkat (Hadany és Beker, 2003; Kondrashov, 1988; Muller, 1964). Azonban bizonyos esetekben az együtt előforduló ivaros és ivartalan vonalak nem versengenek egymással ugyanazon élőhelyekért vagy erőforrásokért, hanem inkább különálló ökológiai niche-ekre specializálódnak (Barraclough és mtsai, 2003; Maynard-Smith, 1978; Vrijenhoek, 1984), ami így a két stratégia stabil együttélését eredményezheti. Az ilyen specializáció kriptikus fajok (morfológiailag hasonló, de genetikailag többé-kevésbé különálló entitások; Birky és Barraclough, 2009; Mayr, 1948; Peccoud és mtsai, 2009) kialakulásához vezethet, a szaporodási izolációt pedig tovább erősíthetik az eltérő szaporodási stratégiák különbségei. Összességében ez a folyamat genetikailag elkülönülő ivaros és ivartalan leszármazási vonalakat eredményez, amelyek különböző ökológiai nichekre specializálódtak, valamint eltérő életmenttel rendelkeznek és akár a fajképződés egy lépcsőfokának tekinthetők (erre van példa planária fajok esetében; Leria és mtsai, 2020).

A fakultatív klonalitás általában nagyon változó környezetben fordul elő, ahol a környezeti feltételektől függően ivartalan és ivaros szaporodási módok is egyaránt megfigyelhetők. Az ilyen fakultatívan klonális szervezetekben az ivartalan és ivaros stratégiák egyazon populáción belüli jelenléte a szaporodási mód fenotipikus plaszticitásának eredménye is lehet. A fenotipikus plaszticitás úgy definiálható, mint egy genotípus azon képessége, hogy különböző környezeti feltételeknek mellett különböző fenotípusokat fejezzen ki (Pigliucci és mtsai, 2006), de ennek kialakításában fontos tényező lehet az egyed belső állapota is (pl. egészségi/fiziológiai állapota, immunrendszer állapota, életkora; Hadany és Otto, 2007). A fenotipikus plaszticitás a szaporodási

módban akkor fordulhat elő, ha (I) ugyanazok az egyedek életük során ivaros/ivartalan szaporodási stratégiák között váltanak (azaz egyéni plaszticitás van, mint például ciklikus parthenogénekben), (II) amikor az adott klonális vonalon belül különböző ivaros/ivartalan stratégiákat fejeznek ki különböző klónok (ez a klonális plaszticitás) vagy (III) e kettő kombinációja, amikor az adott klón vonalba tartozó egyedek a szaporodási módok között váltanak, de erre eltérő hajlandóságot mutatnak. Jó példákat találhatunk a ciklikus partenogenezisre (I) levéltetvek (Moran, 1992), gyűrűsféreg (Learner és mtsai, 1978) és Cladocera esetében (Decaestecker és mtsai, 2009). A klonális plaszticitás (II) a planáriák (Pongratz és mtsai, 2003) és a Cladocera (Dudycha és Hassel, 2013) esetében fordul elő. A harmadik kategóriába (III) néhány Cladocera faj tartozik (Decaestecker és mtsai, 2009), de ebben a csoportban sok más élőlényt is lehet találni (talán a hidrát is beleértve; Tökölyi és mtsai, 2017b). Ezeknél a fajoknál az ivaros szaporodás, gyakran az egyed fennmaradása szempontjából kedvezőtlen és stresszes következményekkel jár. Valójában a fakultatívan klonális szervezetekben a szaporodási módnak mind az ökológiai feltételektől (Gardner és Mangel, 1997; Sakai, 1995), mind a belső fiziológiai állapottól (Hadany és Otto, 2007) függenie kell, úgy hogy a kedvező körülmények között (pl.: magas táplálékellátottság, alacsony kompetíció, kevés stresszor) élő, magas kondíciójú egyedek klonálisan szaporodnak, míg a kedvezőtlen körülmények esetén ivaros szaporodást folytatnak (Gardner és Mangel, 1997; Hadany és Otto, 2007; Sakai, 1995). A szaporodási mód és a hozzá kapcsolódó életmenet tehát plasztikus választ jelenthet a kedvező vagy kedvezőtlen környezetre, aminek külön jelentőséget ad, hogy ezek a különböző feltételek egyidejűleg is előfordulhatnak ugyanazon környezeten belül akár mikrokörnyezetek formájában is.

Ebben a tanulmányban arra törekedtünk, hogy felderítsük a *H. oligactis* populációkon belüli és azok közötti populációgenetikai struktúrát, amely a faj reprodukciós módjában megfigyelt eltéréseinek hátterében állhat. A *H. oligactis* jelentős szaporodási módtól függő eltéréseket mutat az életmenetében. Ez a faj kedvező körülmények között (meleg körülmények) ivartalanul szaporodik és nem mutatja az öregedés jeleit, de kedvezőtlen körülmények között (lehülés után) a polipok ivaros szaporodást folytatnak (Reisa, 1973), majd a szaporodás után öregedéssel mennek keresztül és sokan közülük elpusztulnak néhány hónappal az ivaros szaporodásuk megkezdése után (Yoshida és mtsai, 2006). Az ivaros szaporodásra való hajlandóság ennél a fajnál feltehetően genetikailag meghatározott lehet, mivel a *H. oligactis* törzsek standard laboratóriumi körülmények között tartva az ivaros szaporodás megkezdésének valószínűségében és az ivaros szaporodás utáni túlélési arányban jelentős különbségeket mutatnak (Tökölyi és mtsai, 2017b; Tomczyk

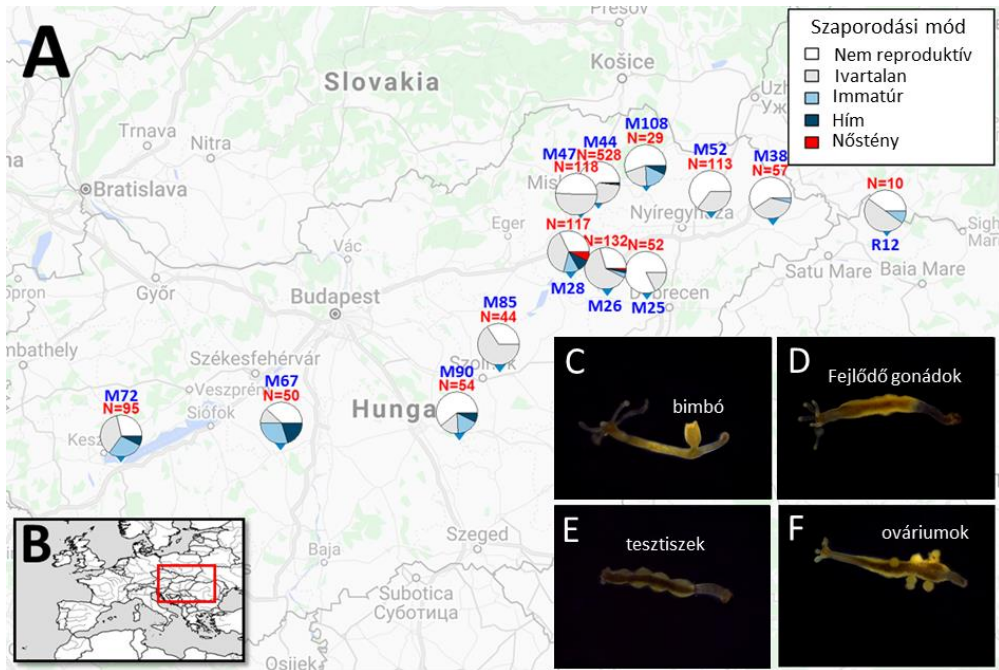
és mtsai, 2015). E faj esetében nem állnak rendelkezésre (ahogy más hidrafajok esetében sem) adatok a populációk genetikai szerkezetére vonatkozóan és így ezek hiánya kizár mindenféle következtetést a különböző szaporodási módok közötti kapcsolatokra. Míg az elmúlt két évtizedben számos filogenetikai vizsgálatot végeztek *Hydra* fajokkal, ezekben a vizsgálatokban olyan markereket alkalmaztak, amelyek nem biztosítanak kellő felbontást a *Hydra* populációkon belüli genetikai mintázatok feltárásához (Kawaida és mtsai, 2010; Martínez és mtsai, 2010; Schwentner és Bosch, 2015). Figyelemre méltó azonban, hogy az egyik ilyen tanulmány eredményei (Schwentner és Bosch, 2015) arra utalnak, hogy a *Hydra* nemzetségen belül több kriptikus faj is létezhet, ami felveti annak lehetőségét, hogy a *H. oligactis* ivartalan és ivaros formái, amelyek ugyanabban a populációban élnek együtt, különböző kriptikus fajok egyedei lehetnek.

A *H. oligactis* populáció genetikai szerkezetének leírására ebben a vizsgálatban restriktív helyhez kötődő DNS-szekvenálást alkalmaztunk (RAD-Seq, Andrews és mtsai, 2016; Baird és mtsai, 2008; Davey és Blaxter, 2010). A RAD-Seq használata a populációgenomikában egyre népszerűbb és már sikeresen alkalmazták csalánozóknak, tengeri rózsák filogeográfiai mintázatainak leírására (Reitzel és mtsai, 2013), a telepes Hydrozoák közötti kimérizmus azonosítására (Chang és mtsai, 2018), más jelenségek, mint például az introgresszív hibridizáció azonosítására (Combosch és Vollmer, 2015) vagy korallok esetében az ivar-determinációs mechanizmus meghatározására (Pratlong és mtsai, 2017) Ebben a tanulmányban arra törekedtünk, hogy részletes genetikai adatokat írjunk le e modellrendszer populációszerkezetéről és ezáltal nagyobb betekintést nyerjünk a különböző szaporodási stratégiák megjelenésébe. Megvizsgáltuk, hogy az azonos populációban élő *H. oligactis* polipok szaporodási módjában mutatkozó különbségeket genetikai differenciálódás vagy fenotipikus plaszticitás okozza-e. Ez a következő lehetséges módokon működhet. (I) Ha jelentős genetikai különbségek mutatkoznak a szaporodási mód kategóriái között (ivartalan vs. ivaros), akkor arra számítunk, hogy az ivaros szaporodó egyedek az ivartalanoktól eltérő halmazokba csoportosulnak. (II) Ha a fenotipikus plaszticitás nagy szerepet játszik a szaporodási mód kialakításában, az azonos genotípusú egyedek különböző szaporodási módokat követhetnek. (III) Alternatív megoldásként mind a genetikai differenciálódás, mind a fenotipikus plaszticitás érintett lehet; ebben az esetben az ivaros/ivartalan egyedek változó arányú megjelenését várjuk az eltérő genotípusokon belül.

### **2.1.2. Anyagok és Módszerek**

#### **A vizsgált populációk és a polipok gyűjtésének módja**

A mintavétel a Tiszadorogma melletti hosszú távú vizsgálati helyünkre irányult (M28 populáció; **1. ábra**), ahol minden ősze ivartalan és ivaros egyedek egyaránt előfordulnak. Ezen túlmenően, hogy részletesebb képet kapjunk a környező *H. oligactis* populációkról, 12 további populációt vontunk be vizsgálatunkba (**1. ábra**).



**1. ábra** A térképen a mintavételi helyek, a teljes mintanagyság (egyedek száma (N) és a különböző szaporodási módokkal rendelkező állatok aránya (A) látható. A mintavételi terület földrajzi elhelyezkedése Európában (B) A *Hydra oligactis* polipok fényképe: ivartalan (C); immatúr (D); hím (E); nőstény (F)

A terepi gyűjtések ősze két időszakban történtek, melyekből az egyik 2017. október 30. és 2017. november 3. között hét kelet-magyarországi populációból történt, a másik pedig 2019. november 7. és 2019. november 15. között öt magyarországi és egy romániai populációból (**1. táblázat**). Minden populáció esetében több helyről próbáltunk meg polipokat gyűjteni ugyanazon a mintavételi helyen (legalább 2 méteres távolságot hagyva köztük), hogy növeljük a genetikailag eltérő egyedek megtalálásának esélyét a populációkon belül (mivel a hidrák ivartalanul szaporodhatnak, így az egymáshoz közeli polipok nagyobb valószínűséggel ugyanahhoz a genetikai vonalhoz tartoznak).

**1. táblázat** A mintavételi helyek hidrológiai jellemzői és a RAD-Seq elemzésben kiválasztott és használt polipok száma.

Populáció azonosító	Hely megnevezése és koordinátái	Víz típus	Trofikus állapot	Terület (ha)	Átlag mélység (m)	A szekvenált polipok száma/populáció	A szekvenált ivaros polipok száma
M25	Látókép; N47.56112 E21.45288	alföldi víz tározó	eutróf	60	4	4	0
M26	Hortobágy; N47.58746 E21.14895	alföldi folyó	eutróf / mezotróf	15-20 m (széles )	1-2	9	4
M28	Tiszadorogma ; N47.67119 E20.86334	holtág	eutróf	15	1	46	18
M38	Győrtelek; N47.94833 E22.42990	holtág	eutróf	185	1,9	6	1
M44	Tiszalúc; N48.03405 E21.07803	holtág	eutróf	120	3,5	12	5
M47	Muhi; N47.98436 E20.93867	bányató	eutróf	5,3	2	3	0
M52	Levelek; N47.97667 E21.95146	alföldi víz tározó	eutróf	200	2,5	4	0
M67	Cece; N46.76848 E18.61604	alföldi folyó	mezotróf	15-20 m (széles )	2-3	5	3
M72	Balatonmáriaf ürdő; N46.70316 E17.38126	alföldi csatorna	eutróf	30-35 m (széles )	2	8	3
M85	Szajol; N47.17998 E20.31362	holtág	eutróf	78	1,2	5	0
M90	Tiszaalpár; N48.12438 E21.44716	holtág	eutróf	147	1,6	8	4

M108	Rakamaz; N48.12438 E21.44716	holtág	eutróf	30	1,5	6	3
R12	Calinesti-Oas; N47.88977 E23.31119	alföldi folyó	mezotróf	10-15 m (széles )	1,5-2,5	4	1

A hidrapolipokat szabadon lebegő és víz alá merült makrofita állományról (leggyakrabban *Ceratophyllum demersum*, *Ceratophyllum submersum*, *Myriophyllum spicatum*, *Stratiotes aloides*) gyűjtöttük és egyenként Eppendorf-csővekbe helyeztük őket ügyelve a DNS kontamináció elkerülése. Minden helyről legalább öt ivartalan és öt ivaros egyedeket külön-külön Eppendorf-csővekbe gyűjtöttünk, míg a többi talált polipot Falcon-csővekbe raktuk (50 ml-es), hogy pontosabban megbecsülhessük az ivaros egyedek arányát a vizsgált populációkban. A begyűjtés napján az állatokat hűtőládában a laboratóriumba szállítottuk, ahol sztereomikroszkóppal meghatároztuk őket a morfológiájuk – tapogató hossz/testhossz, talp jelenléte, tapogatók fejlődése a bimbókon – alapján (Schuchert, 2010). Ezután feljegyeztük az állatok ivaros állapotát – nőtények (polip differenciált petékkal), hímek (polip differenciált herékkel) vagy immatúrok (polipok, amelyeknek jól látható ivarmirigyei vannak, de ezek a gonádok a fejlődés korai stádiumában vannak, ezért a nemet nem lehet róluk meghatározni; **1. ábra**). Az összes begyűjtött állat közül 120 egyedeket választottunk ki úgy, hogy egyidejűleg lefedjük az ivartalan, hím, nőtény és immatúr egyedeket is minden populációban (kiválasztunk egy-egy ilyen típust minden mintavételi helyről, ahol azok jelen voltak). Azokban a populációkban, ahol csak ivartalan egyedeket találtunk, véletlenszerűen választottunk ki 3-5 ivartalan egyedeket a genetikai vizsgálatra. Az egyedek több mint egyharmada (38%) a fókuszpopulációból (M28) került kiválasztásra.

### Szárítás és DNS-kinyerés

A *H. oligactis* polipokat szilikagél mellé helyezve szárítottuk és szobahőmérsékleten tároltuk a DNS minőségének megőrzése érdekében. Ezt a módszert korábban sikeresen alkalmazták növényi (Chase és Hills, 1991), rovar (Hackett és mtsai, 2000; Post és mtsai, 1993) és emlősmintákra is (Cserkész és mtsai, 2016, 2017). A gyakorlatban a szárítás úgy történt, hogy a hidrapolipokat egyenként steril pipettahegyekbe helyeztük, majd a polipokat tartalmazó hegyeket egyenként körülbelül 6 g száraz szilikagél tartalmazó műanyag zacskókba helyeztük. Az összegyűjtött *H. oligactis* egyedekből származó genomi DNS-t standard emlős DNS extrakciós protokoll segítségével izoláltuk (Cserkész és mtsai, 2016), mely protokoll részletes leírása a Miklós és mtsai, 2021; 1. kiegészítő módszerekben található.

## **RAD-Seq könyvtár elkészítése és szekvenálása**

Mintáinkból három külön RAD-seq könyvtárat készítettünk. A könyvtár-készítési protokoll részletei a Miklós és mtsai, 2021; 1. kiegészítő módszerekben olvashatók. A könyvtár minőségét és mennyiségét Bioanalyzer (High-Sensitivity DNA Kit) segítségével ellenőriztük. A könyvtárakat Illumina NovaSeq platformon (paired-end, 150 nt) szekvenáltattuk a NovoGene-el. A 2017-ben gyűjtött mintáinkat egy RAD-könyvtárban (84 egyed) szekvenáltattuk és ezekből 10 véletlenszerűen kiválasztott mintát külön könyvtárban is újraszekvenáltattuk. A 2019-ben gyűjtött mintákat egy harmadik könyvtárban szekvenáltattuk (36 új egyed és hat ismétlés). Minden könyvtár készítése során ugyanazt a módszertant alkalmaztuk, de a harmadik könyvtárban az amplifikáció során mindössze 15 ciklust alkalmaztunk, hogy csökkentsük a PCR duplikátumok jelenlétét.

## **A szekvenciák feldolgozása**

A nyers Illumina leolvasásokat a *STACKS process\_radtags pipeline* segítségével dolgoztuk fel (Catchen és mtsai, 2013). Először az adatokat demultiplexáltuk és eltávolítottuk az adapterszennyeződéseket tartalmazó olvasásokat (adapter mismatch=2). A *process\_radtags* segítségével eltávolítottuk a nem megfelelő bázisokat (-c) és az alacsony minőségű pontszámokkal rendelkező olvasásokat (-q). Azokat a szekvenciákat, amelyeknek a barcode-jában csak egyetlen eltérés volt elmentettük (-r). A leolvasásokat egységesen 140 nt hosszúságra vágtuk. A forward olvasásokról eltávolítottunk hat nukleotidot (a beépített barcode-ot) az olvasás elejéről és négy rossz minőségű nukleotidot az olvasás végéről. A reverse olvasásokról eltávolítottuk az első nukleotidot a leolvasások elejéről (ez a nukleotid a könyvtár készítése során került hozzáadásra) és kilenc gyenge minőségű nukleotidot a végéről a TRIMMOMATIC program (0.36-os verzió; Bolger és mtsai, 2014) *process\_radtags* beépített kivágási funkciójával. *In silico* faj azonosítást végeztünk, mely során mintáink demultiplexált, tisztított leolvasásait a *H. vulgaris* teljes genomszekvenciájára térképeztük (Hydra 2.0 Genome Assembly; <https://research.nhgri.nih.gov/hydra/>). Ezentúl szekvenciáink dekontaminálást (tisztítását) is elvégeztük. A térképezésünk során, a kapott RAD lókuszeit lefuttattuk az NCBI nucleotide—nt—collection adatbázisán az NCBI Basic alignment Search Tool segítségével és csak olyan RAD-lókuszt tartottunk meg, amelyeknek a legnagyobb egyezése csalánozókkal volt vagy nem talált szekvencia volt az nt-adatbázisban. Ennek a folyamatnak részletes leírása a Miklós és mtsai, 2021; 2. kiegészítő módszerekben olvasható.

## Stacks paraméterválasztás és a hibaarányok becslése

A RAD lókuszek összeállításához használt paraméterek megválasztása nagymértékben befolyásolhatja az elemzés kimenetelét azáltal, hogy befolyásolja a lókuszek és az egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) azonosítását a mintákon belül és a minták között. Ezenkívül a beállítási lehetőségek befolyásolhatják a genotipizálási hibák arányát. Az ilyen genotipizálási hibák az egyenlőtlen lefedettségből, a PCR-hibákból és az allélkiesésből adódnak (Mastretta-Yanes és mtsai, 2015). Tekintettel ezekre a hibaforrásokra, egy jó stratégia az, hogy ugyanabból a mintából technikai replikációkat szekvenálunk és ezek segítségével ellenőrizzük az összeállítási paramétereket, hogy megtaláljuk azokat a paraméterkombinációkat, amelyek maximalizálják a polimorf lókuszek számát, miközben minimalizálják a technikailag hibásan azonosított SNP-k arányát. Ehhez véletlenszerűen  $N = 16$  egyedet választottunk ki újraszekvenálásra (minden populációból egyet, kivéve az M28 populációt, ahol négy mintát szekvenáltunk újra). Ezzel az adatkészlettel futtattuk a *stacks* de novo összeállítási folyamatát, beállítva az adott stack létrehozásához szükséges minimális lefedettségi mélység értékeit (-m; 3-tól 5-ig), az egyedeken belüli stack-ek közötti megengedett eltérések számát (-M; 1-től 9-ig), valamint az egyedek közötti stack-ek között megengedett eltérések számát (-n; 1-től 9-ig ugyanazon az értéken, mint -M; Paris és mtsai, 2017).

Miután ezekkel az értékekkel lefuttattuk a folyamatot, megvizsgáltuk a polimorf lókuszek számát, amelyeken a mintakészlet legalább 80%-a osztozik és a *TIGER* program segítségével megbecsültük a homozigóta és heterozigóta allélok hibaarányát (Bresadola és mtsai, 2020). A végső, de novo paramétereket a *STACKS*-ben úgy választottuk ki, hogy maximalizáljuk a széles körben megosztott lókuszek számát, miközben minimalizáljuk a genotipizálási hibaarányt is. Az R *APE* (5.0-s verzió) csomaggal (Paradis és mtsai, 2004; R Core Team, 2021) létrehoztuk a replikátumok neighbour-joining fáját, hogy ellenőrizzük azt, hogy a replikátumok megfelelően klasztereződnek-e egymáshoz képest. A neighbour-joining fa előállításához a *dist.gene* függvény segítségével kiszámított genetikai távolságmátrixot használtuk az *APE*-ben, a hiányzó adatokat tartalmazó lókuszek páronkénti törlésével. Végül kiszámítottuk a replikátumok genetikai távolságát is és ábráztuk azokat egy hisztogramon, amely az egyedek közötti genetikai távolságok eloszlását mutatta. Ez lehetővé tette számunkra, hogy lássuk a szekvenálási/genotipizálási hibák általános nagyságát: ha a hibaarány alacsony, a párok genetikai távolságának minimálisnak kell lennie a különböző genotípusokéhoz képest. Miután azonosítottuk azokat az összeállítási paramétereket, amelyek maximalizálják a polimorf lókuszek számát és minimalizálják a hibaarányt, lefuttattuk a de novo pipeline-t a teljes adatkészlet

végző paramétereivel. A létrejövő lókuszok katalógusát VCFTOOLS segítségével szűrtük (Danecek és mtsai, 2011) a következőképpen: a szükséges minor allélszámot 3-ra (--*mac*), a minimális genotípus minőséget 20-ra (--*minGQ*) a minimális olvasási hosszt 3-ra (--*minDP*) és a minor allélgyakoriság értékét 0,05 (--*maf*) állítottuk be. Kizártuk a 97,5 százalékosnál nagyobb átlagos hosszúságú lókuszokat is, hogy megpróbáljuk eltávolítani a potenciálisan paralóg lókuszokat is. A kapott lókuszkészletet tovább korlátoztuk a mintákon belüli jelenlét alapján (--*max-missing*), kiválasztva azt a lókuszkészletet, amely a minták legalább 80%-ában jelen volt. A szorosan elhelyezkedő SNP-k elemzésekor fellépő kapcsolódási egyensúlyhiány (LD) okozta torzítás csökkentése érdekében minden RAD-lókuszból csak az első SNP-t választottuk ki az elemzésre (a STACKS-ben a *-write-single-snp* opciót használva).

### **Klónok azonosítása és családfa rekonstrukció**

Két módszert alkalmaztunk a klónok azonosítására és az MLG-k (multilókusz genotípusok) létrehozására. Az első módszer az egyedek közötti genetikai hasonlóságon alapul és a páronkénti genetikai távolságok gyakorisági eloszlását (a genetikai sokféleség spektruma; Rozenfeld és mtsai, 2007) használja a klónok azonosítására. Elméletileg az azonos MLG-khez tartozó egyedeknek nulla genetikai távolsággal kell rendelkezniük egymáshoz képest, mivel egyetlen egyedtől származnak ivartalan szaporodás útján (klónok). A gyakorlatban azonban a genotipizálási hibák és a szomatikus mutációk olyan eltéréseket okoznak az MLG-ken belül is, amelyek a genetikai távolságok nullánál nagyobb eloszlását generálják (Kamvar és mtsai, 2015). Ábrázoltuk a genetikai diverzitás spektrumát és megállapítottuk, hogy a kis genetikai távolságok első csúcsa az azonos MLG-ekhez tartozó egyedpárokat, míg a nagyobb genetikai távolságok második csúcsa az MLG-k közötti eltéréseket jelenti. Az R POPPR csomag *cutoff\_predictor* (Kamvar és mtsai, 2014) függvényének segítségével azonosítottuk a két csúcs közötti határértéket. A genetikai távolságmátrixot az R APE (5.0-s verzió) csomag (Paradis és mtsai, 2004; R Core Team, 2021) *dist.gene* függvényével hoztuk létre, a hiányzó adatokat tartalmazó lókuszok páronkénti törlésével. A klónok azonosítása a genetikai diverzitás spektrumának vizsgálatával pontosan hozzárendelheti a legtöbb egyedeket az MLG-ekhez, de ez egy önkényesen kiválasztott küszöbön támaszkodik, amelynek optimális értéke számos tényezőtől függhet, például a használt markerek számától vagy a genotipizálási hibák gyakoriságától (Wang, 2016). A klónok kikövetkeztetésének objektívebb módjaként ez a küszöbérték optimalizálható az adott adatkészlet jellemzőinek figyelembevételével. A COLONY (2.0.6.6-os verzió; Jones és Wang, 2010) szoftvert használtuk a klónok azonosításra egy olyan optimalizált küszöb segítségével, amely figyelembe veszi a genotipizálási hibák gyakoriságát, a hiányzó adatokat,

valamint a markerek számát és az allélgyakoriságát (Wang, 2016). A COLONY-ban alkalmazott egy valószínűségi keretrendszert használ az egyedek hozzárendelésére a klón kapcsolatokhoz és az egyéb kapcsolatok azonosításához (teljes testvéri, féltestvéri stb. kapcsolatokhoz) és már bizonyították róla, hogy szimulációk segítségével pontosan tudja azonosítani az adott MLG-hez tartozó egyedeket (Wang, 2016). A COLONY 2.0.6.6-os verziójában megvalósított valószínűség-alapú megközelítés (Jones és Wang, 2010) a teljes testvérkapcsolatokat, a féltestvérkapcsolatokat vagy a nem rokon párokat is azonosítja azáltal, hogy következtetéseket hajt végre a származásra és a testvériségre (beleértve a klónokat is) a többlókuszos genotípusokból, figyelembe véve a szekvenálási hibákat és az SNP-k bizonytalanságait is. Valamennyi általunk vizsgált egyed potenciálisan utódként szerepelt az elemzésünkben, mivel a klonalitás jelenléte miatt a hidrák esetében a generációk átfedhetnek egymással és nincs megfelelően pontos módszerünk a szülők azonosítására. Ezeket a potenciális utódokat ezután klonális vonalakba és családi klaszterekbe (testvéri kapcsolatokon keresztül kapcsolódó egyedek csoportjai) rendeztük. A COLONY elemzésben FPLS módszert alkalmaztunk, valamint mindkét szülő esetében poligám párzási rendszert feltételeztünk és az összes többi paramétert az alapértelmezett értékekre állítottunk.

### **Genetikai szerkezet**

Annak érdekében, hogy a populációink genetikai szerkezetéről pontosabb képet kapjunk két módszert alkalmaztunk. Először is a minták páronkénti rokonsági együtthatóit számoltuk ki a Loiselle és munkatársai által leírt módszerrel (1995). A rokonsági együtthatók a rokonsági fok mérőszámai, véletlenszerű párosítást feltételezve 0,25 a teljes testvéreknél, 0,125 a féltestvéreknél, 0,0625 a harmadik szintű kapcsolatoknál és így tovább. Bár a genotipizálási hibák jelenléte miatt az alacsonyabb szintű rokoni kapcsolatokat nem lehet pontosan megkülönböztetni pusztán a rokonsági együttható alapján, az együttható a rokonság mértékét adja meg a távoli rokonságban lévő egyedek között, amely így összevethető a mintán belüli testvéri struktúrával. Az általunk alkalmazott rokonsági együttható (Loiselle és mtsai,  $K$ ) a homológ allélok gyakoriságának korrelációját méri az egyedpárok között és viszonylag torzítatlan eredményt ad ritka allélok és a Hardy–Weinberg egyensúlytól való eltérések esetében is (Vekemans és Hardy, 2004). A rokonsági együtthatókat az ECOGENETICS R csomag (1.2.1-6 verzió; Roser és mtsai, 2017) segítségével számítottuk ki. A populációk közötti kapcsolatokat (a populáción belüli struktúra mellett) az összes minta páronkénti rokonsági mátrixának ábrázolásával vizualizáltuk, a COMPLEXHEATMAP R csomag segítségével (Gu és mtsai, 2016).

Másodszor, elvégeztük egy főkomponens diszkriminancia analízist (DAPC; Jombart és mtsai, 2010), hogy leírjuk az MLG-k közötti kapcsolatokat. A

hagyományos főkomponens analízist alkalmazó módszereket nem használhattuk ebben az esetben, mivel ezen módszerek mindegyike Hardy–Weinberg egyensúlyt feltételez, ami szinte biztosan nem áll fenn a klonális szervezetekben. A DAPC elemzést R-ben az ADEGENET (2.1.1-es verzió) csomag segítségével végeztük el (Jombart, 2008; R Core Team, 2021). A DAPC elemzésben használt fő komponensek számát az alfa-pontszám optimalizálást követően hatra állítottuk be és minden populációnál a pontfelhő ~67%-át felölelő tehetetlenségi ellipsziseket generáltunk. A DAPC elemzéshez minden MLG-ből csak egy egyedét használtunk, a módszer kritériuma miatt. Ezen túlmenően, hogy kiegyensúlyozzuk a minták számát a populációk között, 10 kivétellel az összes egyedét eltávolítottuk az M28 populációból, amely fókuszpopulációnk révén felülreprezentált volt a mintakészletünkben. Az alapvető populációgenetikai statisztikákat (várható heterozigótaság, megfigyelt heterozigótaság, fixációs index és a privát allélok száma) is kiszámítottuk erre a redukált adatkészletre (a STACKS-ből kinyerve).

Harmadszor, az MLG-k közötti kapcsolatok bemutatására minimum spanning hálózatot (MSN) rajzoltunk fel R-ben, a *poppr.msn* függvény segítségével (Kamvar és mtsai, 2014). A hálózatot az APE csomag *dist.gene* függvényével számított genetikai távolságmátrix alapján hoztuk létre, a hiányzó lókuszek páros törlésével. Ezeket a kapcsolatokat az IGRAPH és POPPR R csomagok felhasználásával generált MSN segítségével vizualizáltuk, mivel a klonális szervezetek esetében jobb ábrázolási eszköz lehet, mint a farajzoláson alapuló módszerek (Csardi és Nepusz, 2005; Kamvar és mtsai, 2014).

### **Genetikai szerkezet a szaporodási stratégiák függvényében**

A genetikai struktúra és az ivaros szaporodásra való hajlam közötti összefüggés tesztelésére megszámoltuk az ivaros (immatúr, kifejlett nőstény és kifejlett hím) és nem ivaros (ivartalan és nem szaporodó) egyedek számát a COLONY analízis során kikövetkeztetett családcsoportokban és megvizsgáltuk, hogy ezek eltérnek-e a különböző klaszterekben. A tesztelést Fisher-féle egzakt teszttel végeztük. Továbbá elvégeztük egy molekuláris variancia (AMOVA) elemzést az ivaros és az ivartalan egyedek között. Az AMOVA-t függvényt a PEGAS (0.10-es verzió) R csomag (Paradis, 2010) segítségével hajtottuk végre 1000 permutációt alkalmazva.

### **2.1.3. Eredmények**

#### **Fenotípus eloszlás**

13 populációból összesen 1449 egyedét gyűjtöttünk be. Kilenc populációban találtunk ivaros polipokat. Az ivartalan/ivaros egyedek aránya ezekben a populációkban: 119/48 (M28); 122/10 (M26); 55/2 (M38); 517/11 (M44);

25/25 (M67); 62/33 (M72); 41/13 (M90); 22/7 (M108); és 9/1 (R12). Az ivaros egyedek aránya ebben a kilenc populációban szignifikánsan különbözött Fisher-féle egzakt teszt alapján ( $p < 0,001$ ). Ugyanezt az eredményt kaptuk, ha mind a 13 vizsgált populációt bevontuk (Fisher-féle egzakt teszt,  $p < 0,001$ ).

### **A fajok azonosítása és a dekontamináció**

Összesen 625,7 millió nyers paired-end olvasásunk volt (replikátumokkal együtt). Ezeknek a nyers leolvasásoknak a 94,2%-a megmaradt az alacsony minőségű leolvasások, az adapterszennyeződések, a kétértelmű barcode-ok és a kétértelmű RAD-címkék szűrése után. Átlagosan 4,3 millió leolvasásunk volt mintánként (0,8–11,5 millió között). Az egyes mintákból a *Hydra* 2.0 genomra leolvasott térképezések eltérő eloszlást mutattak, ahol  $N = 12$  minta (az összes 10%-a) több mint 60%-os leképezési arányt mutatott, a többi pedig 40%-nál kisebb leképezési arányt mutatott. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a >60%-os térképezési arányú minták *Hydra vulgaris* egyedek, amelyeket tévesen *H. oligactis*-ként azonosítottunk, ezért kizártuk őket minden további elemzésből. A STACKS de novo pipeline alapértelmezett beállításokkal történő futtatásával 1,37 millió RAD-lókuszt azonosítottunk. Összességében ezeknek a lókusznak az 57%-a nem mutatott találatot az nt adatbázisban, további 19%-uk pedig csalánozó szekvenciákra volt leképezve. A maradékot más taxonómiai csoportokhoz rendelte hozzá a blast, így ezeket kiszűrtük a kontaminációs adatbázissal való összevetésben. A legfőbb szennyeződések a Pseudomonadales és a Burkholderiales voltak), két baktériumrend, amelyek általában megtalálhatók a *Hydra* mikrobiomjában is (Fraune és mtsai, 2015). A feltételezett szennyező lókusztok eltávolítása után a másodlagos GC csúcs is jelentősen csökkent. A szennyeződések eltávolítása után PCR-másolatként azonosított leolvasási párok aránya 29,4% volt. Az átlagos lefedettség a szennyeződések és a PCR ismétlődések eltávolítása után mintánként  $13,0\times$  volt (tartomány:  $4,0\text{--}25,4\times$ ).

### **STACKS paraméterek kiválasztása**

Az elemzésbe bevont technikai replikátumok legalább 80%-a által megosztott polimorf lókusztok száma csökkent, ahogy nőtt a stack létrehozásához szükséges minimális leolvasások száma ( $-m$ ). Míg  $m = 3$ -nál  $\sim 46\ 000$  széles körben megosztott polimorf lókuszt azonosítottunk, ez a szám  $\sim 34\ 000$ -re csökkent  $m = 5$ -nél, ami arra utal, hogy az  $m$  túl magas beállítása növeli annak esélyét, hogy a magas lefedettségi követelmények miatt nem találunk valódi lókusztokat. A széles körben megosztott polimorf lókusztok száma púp alakú kapcsolatot mutatott a stack-en belüli és a stack-ek között megengedett eltérések számával ( $M/n$ ):  $M/n = 1$ -nél volt a legalacsonyabb,  $M/n = 3$ -nál elérte a platót és  $M/n = 5$  elkezdődött a csökkenés. Ez azt a tényt tükrözi, hogy ha kevés eltérés megengedett, a közös lókusztok tévesen

megkülönböztethetőek, míg sok eltérés megengedése növeli a fordított helyzet kockázatát (azaz az eltérő lókuszek közösnek azonosítását; Paris és mtsai, 2017). Az allélhibaarány  $\sim 0,01$  volt a homozigóta lókuszeknél és  $\sim 0,04$  a heterozigótáknál. A magasabb heterozigóta allélhibaarány valószínűleg azt a tényt tükrözi, hogy az allélkiesés nagymértékben hozzájárul az általános genotipizálási hibákhoz ebben az adathalmazban (Bresadola és mtsai, 2020; Wang, 2004). A homozigóta allélok hibaaránya a lefedettség minimális mélységével (-m) csökkent, míg a heterozigóta allélok hibaaránya m-el nőtt, ami azt a tényt tükrözi, hogy ha magasak a lefedettségi követelmények, nagyobb valószínűséggel hiányoznak a kisebb allélok (azaz az allélkiesés gyakoribb). A hibaarányok enyhén csökkentek M/n mellett és stabil szintet értek el M/n = 3 körül, kivéve a heterozigóta allél hibaarányt m = 3-nál, ahol az allélhibaarányok ismét növekedtek M/n > 2 értékeknél. Ezen megfontolások figyelembevételével a stack létrehozásához szükséges minimális olvasási számnak m = 3-at választottunk, mivel magasabb m értékeknél alacsonyabb volt a széles körben megosztott polimorf lókuszek száma és magasabb volt a heterozigóta allélhibaarány. Továbbá az M/n = 3-at választottuk, mivel a széles körben megosztott polimorf lókuszek száma nem nőtt, míg a hibaarányok nem csökkentek számottevően ezen paraméterek magasabb értékre állításával. A STACKS de novo futtatása során, melyben ezekkel a végső beállításokkal szűrtünk 9844 RAD-lókuszt kaptunk. Az egyedi lókuszt hiányosságok aránya 13,7% volt (tartomány: 2,4%–88,7%). Két egyednél több mint 60% volt az egyedi hiányosság (egy az M44-es és egy az M38-as populációból), míg a többinél 50% alatti volt a hiányosság. Ez a két egyed lehet *Hydra circumcincta* is (téves fajazonosításból adódóan), vagy elképzelhető az is, hogy alacsony volt a DNS-kivonási hatékonyság ezek esetében. Ez utóbbi hipotézist alátámasztja az, hogy ez a két minta rendelkezett a legalacsonyabb lefedettséggel mintakészletünkben (4,0 és 4,5). Ezt a két egyedet eltávolítottuk és megismételtük a lókuszek kiválasztását ezek nélkül is. Ez összesen 11 319 RAD lókuszt eredményezett, átlagosan 13,5%-os egyedi hiányossággal (tartomány: 2,7–43,3%).

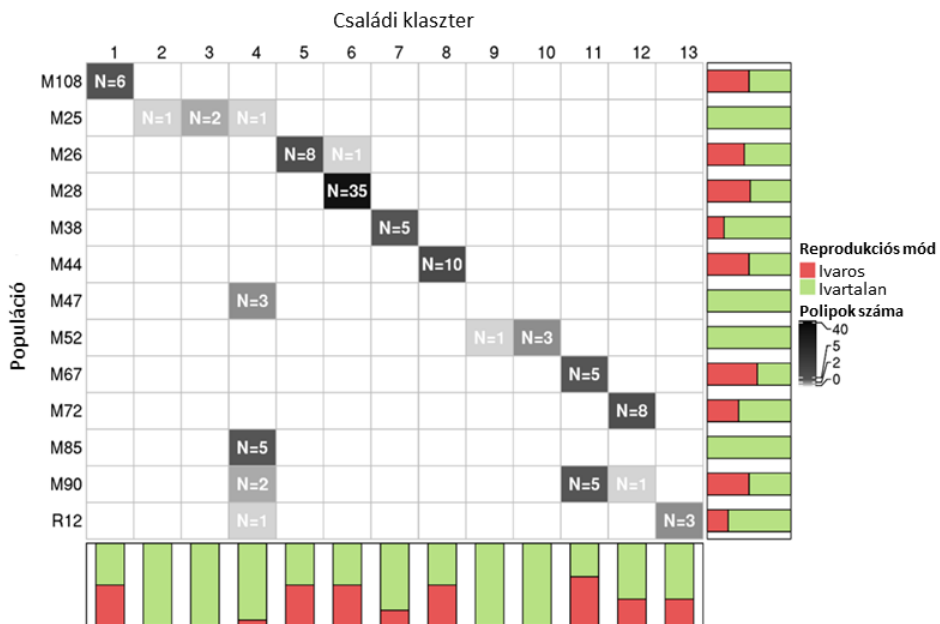
### **Klónazonosítás**

A genetikai diverzitás spektruma a genetikai távolságok nem folytonos eloszlását mutatta és a *cutoff\_predictor* 0,13-ra becsülte a genetikai távolságot, amely alatt az egyedek azonos multilókuszt genotípusokhoz tartozónak tekinthetők. Ennek alapján N = 61 multilókuszt genotípust (MLG-t) azonosítottunk az elemzésbe bevont N = 106 polipból álló halmazban. Ugyanezt az MLG-készletet azonosítottuk a COLONY-ban is. Az MLG-ken belüli polipok száma egytől nyolcig terjedt és egy kivétellel (M67 populáció) minden populáció egynél több klónt tartalmazott. A klóntársak mindig ugyanabban a populációban helyezkedtek el (azaz egyetlen MLG-t sem

figyeltünk meg egynél több populációban). A technikai replikátum párok átlagos genetikai távolsága 0,07 volt és egy kivétellel (16-ból egy, 6,25%) a genetikai távolság kisebb volt, mint a *cutoff\_predictor* által azonosított MLG 0,13-as küszöbérték. Az egyetlen kivétel az R12\_1\_2 minta volt, ahol a két ismétlés közötti genetikai távolság 0,25 volt. Ez a kiugró érték valószínűleg azzal magyarázható, hogy az R12\_1\_2 volt a legalacsonyabb lefedettségű minta (6,2) az N = 106 egyedből álló végső mintahalmazban. Ez arra utal, hogy az alacsony lefedettséggel rendelkező egyedek esetében a klónok hozzárendelése kevésbé lehet pontos és így az MLG-k számára vonatkozó becsléseink kissé túlbecsülhetnek.

### Rokonsági struktúra

A COLONY analízis a 61 MLG-t 13 családi klaszterbe csoportosította (2. ábra). E klaszterek közül kilenc volt populáció-specifikus (az 1. klaszter az M108-ban, a 2. és a 3. klaszter az M25-ben, az 5. klaszter az M26-ban, a 7. klaszter az M38-ban, a 8. klaszter az M44-ben, a 9. és a 10. klaszter az M52-ben és a 13. klaszter az R12-ben). Két klaszterben két populáció egyedeit (M26, M28, M67, M90), míg egy családi klaszter négy populáció egyedeit (M47, M85, M90, R12) is tartalmazta.



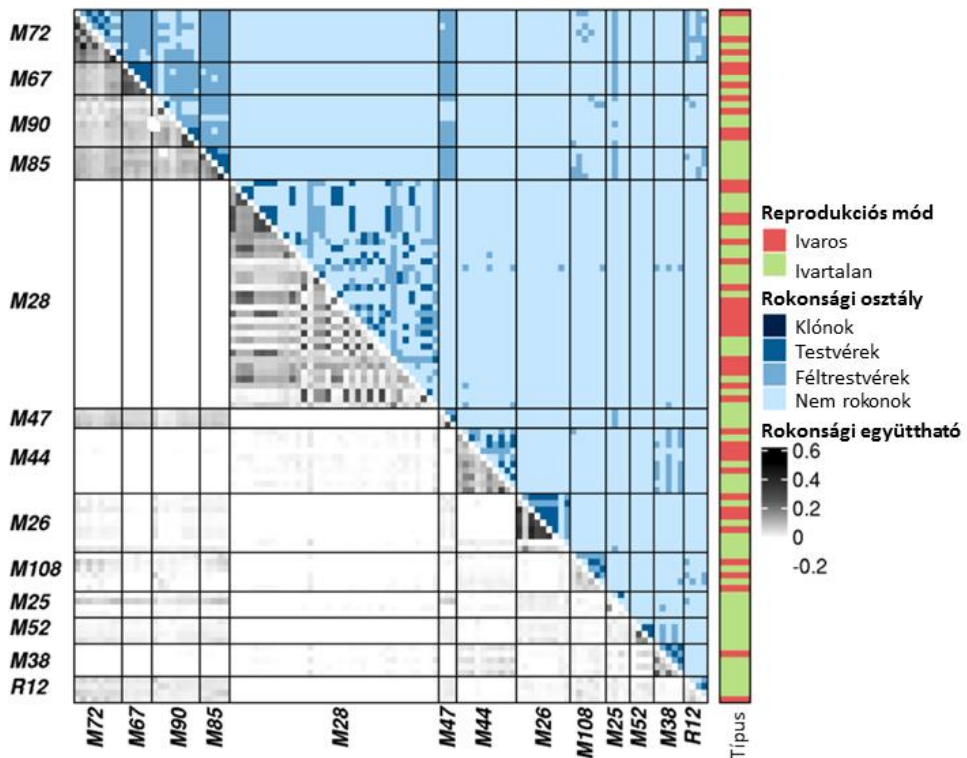
2. ábra A 13 családi klaszter tagjainak megoszlása 13 populáció függvényében, jelezve az egyedek számát és az ivaros szaporodó egyedek arányát az adott klaszterben vagy populációban.

Az M28 populációban volt a legmagasabb a privát allélok száma (147), annak ellenére, hogy csak négy MLG-t volt jelen itt (**2. táblázat**). A legtöbb MLG-t (kilenc) az M44-es populációban találtuk, de a privát allélok száma itt csak 14 volt. A megfigyelt heterozigótaság (0,22–0,31) minden populációban magasabb volt, mint a várt heterozigótaság (0,13–0,20; **2. táblázat**).

**2. táblázat** Alapvető populációgenetikai statisztikák a 13 *H. oligactis* populációra (Populáció azonosító, a populáció azonosítója;  $A_P$ , privát allélszám;  $H_{Obs}$ , megfigyelt heterozigótaság;  $H_{Exp}$ , várható heterozigótaság;  $F_{IS}$ , fixációs index;  $N$ , egyedszám; MLG-k, multilókuszos genotípusok száma). MLG-nként csak egy egyedet vettünk figyelembe ezekben a számításokban és az M28 populációból  $N = 25$  egyedet véletlenszerűen eltávolítottunk a minta méretének kiegyenlítése érdekében.

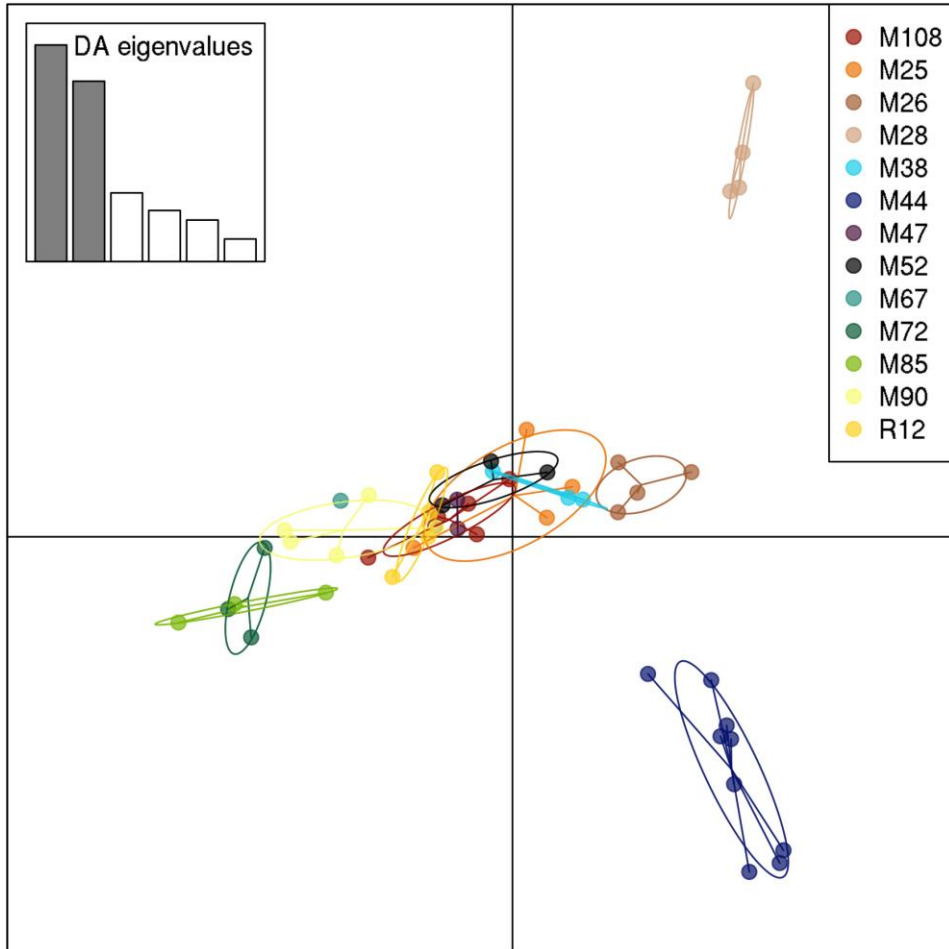
Populáció azonosító	$A_P$	$H_{Obs}$	$H_{Exp}$	$F_{IS}$	$N$	MLG-k
M108	5	0.27114	0.18505	-0.11753	6	6
M25	3	0.27150	0.19855	-0.06151	4	4
M26	11	0.29436	0.20573	-0.08709	9	4
M28	147	0.20819	0.14655	-0.06735	10	4
M38	4	0.24575	0.16527	-0.05732	5	3
M44	14	0.22522	0.16695	-0.09840	10	9
M47	1	0.30387	0.18235	-0.03683	3	2
M52	6	0.29412	0.19184	-0.07770	4	3
M67	0	0.26635	0.13318	0.00000	5	1
M72	3	0.26757	0.18733	-0.04960	8	3
M85	3	0.30118	0.19504	-0.08313	5	3
M90	0	0.27091	0.20693	-0.06509	8	5
R12	2	0.31216	0.20827	-0.09045	4	4

Nem észleltünk olyan egyedpárt, amely elsőrendű kapcsolatot (testvérek) alkotott volna a különböző populációk között. 59 olyan másodrendű kapcsolatot (féltestvérek) mutattunk ki 0,9-nél nagyobb valószínűséggel, amelyek különböző populációkhoz tartozó egyedek között voltak jelen (**3. ábra**). A legtöbb populáció (13-ból 10) más populációk tagjaihoz kapcsolódott legalább egy egyedpár közötti másodrendű kapcsolaton keresztül. A rokonsági együtthatók vizsgálata a COLONY analízissel egyező eredményt mutatott. A legtöbb magas rokonsági együtthatóval rendelkező egyedpár mindig ugyanabban a populációban volt jelen. Azonban több, különböző populációból származó egyedpár rokonsági együtthatója  $>0$  (**3. ábra**).



3. ábra Rokonsági mátrix, amely páronkénti rokonsági együtthatókat (Loiselle és mtsai, 1995; alapján az EcoDist R csomaggal becsült) az ábra bal alsó felében és a rokonsági osztályt (Colony v. 2.0.6.6, segítségével becsült) az ábra jobb felső felében mutatja a *Hydra oligactis* polipok között a vizsgált 13 magyar populációból. Az oldalsáv az egyedek szaporodási állapotát mutatja.

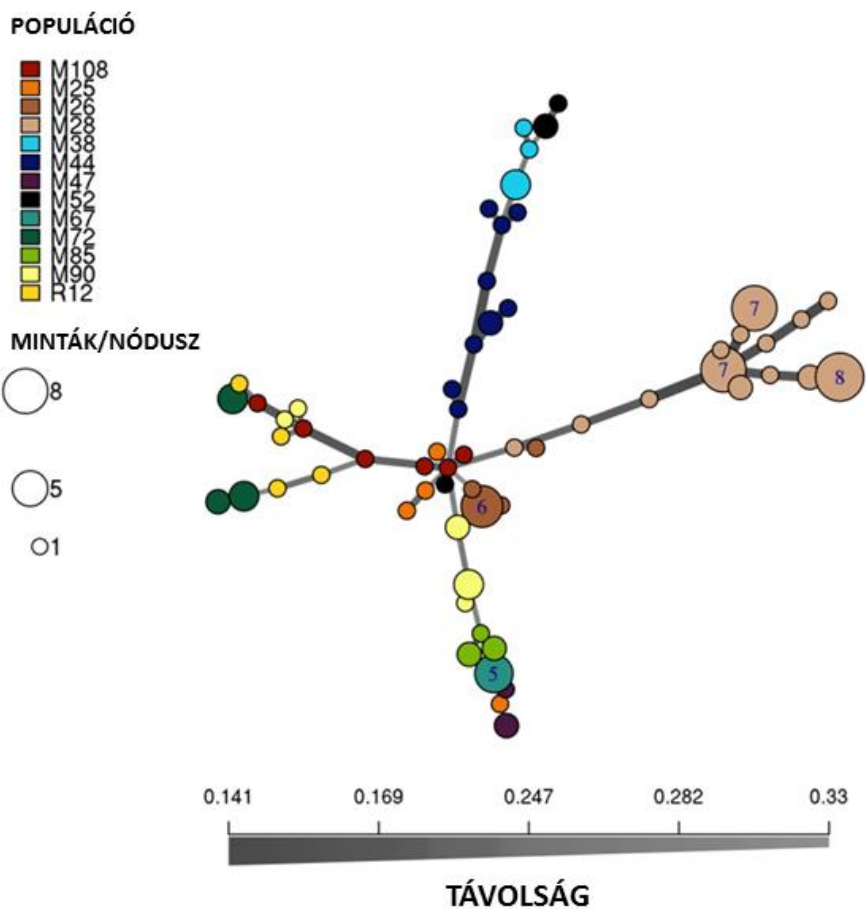
A DAPC elemzés szintén jelentős átfedést mutatott a populációk között (4. ábra). A legkülönbözőbb egyedeket az M28 és M44 populációkban találtuk (4. ábra).



4. ábra 13 vizsgált populációból származó *Hydra oligactis* polipok főkomponens diszkriminancia analízise (DAPC) 11319 SNP lókusz alapján, amely szemlélteti az M28 és M44 populációk elválását más mintavételi helyektől. A DAPC 6 főkomponensből (PC) és 2 magyarázó tényezővel készült.

### Genetikai szerkezet és szaporodási mód

Az Minimum Spanning Hálózat (MSN) kimutatta, hogy a populációk egy kisebb központi és négy jól elkülönülő terminális csoportba rendeződtek (5. ábra), de a populációk nem különböztek szignifikánsan egymástól a klasztereken belül. A populációk tagjai nagyrészt ugyanazokban a csoportban jelentek meg, néhány kivételtől eltekintve, ahol egyes egyedek különböző ágakban voltak megtalálhatóak (M25, M26, M52, M90; 5. ábra).



5. ábra Minimum Spanning Hálózat a Poppr-ben kiszámított eltérési mátrixon. 13 magyar populációból származó *H. oligactis* polipok összes MLG-je megjelenik. A csomópontok színei populációkat jelölnek, a csomópontok mérete pedig a benne lévő klónok számát. Az él (vonal) vastagsága és az árnyékolás az MLG-k közötti rokonságot jelenti. Az él hossza tetszőleges.

A COLONY elemzéssel azonosított négy családcsoportban a szaporodási mód megoszlása nem volt egységes. Négy klaszter csak ivartalan egyedeket tartalmazott. A többi klaszterben ivaros és ivartalan egyedeket egyaránt megfigyeltünk és ezekben az ivaros egyedek aránya 8% és 60% között változott. Az AMOVA alapján azonban az ivaros és ivartalan egyedek genetikailag nem különböztek szignifikánsan egymástól ( $p = 0,189$ ). 18 olyan MLG-t azonosítottunk, amelyekbe egynél több egyed tartozott és ezek közül nyolc csak ivartalan polipokat tartalmazott, míg a többiben ivartalan és ivaros egyedek is megfigyelhetők voltak. Ezek közül két esetben hímeket és

nőstényeket is megtaláltunk ugyanabban a klonális vonalban (az egyik az M26, a másik az M28 populációban fordult elő).

#### 2.1.4. Diskusszió

Vizsgálatunk elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk a különböző párhuzamosan létező szaporodási stratégiák (ivartalan és ivaros) genetikai hátterét és differenciálódását a *H. oligactis* populációkban. Megállapítottuk, hogy: (I) egyértelmű bizonyítékok vannak a szaporodási mód fenotipikus plaszticitására: a klónokként azonosított polipok szaporodási módjai eltérőek voltak; és (II) nem volt észlelhető genetikai struktúra a szaporodási mód tekintetében: az ivaros polipok nem mutattak genetikai különbséget az ivartalan polipoktól. Emellett magas genetikai rokonságot találtunk a populációk között (másodrendű rokonságot észleltünk a távoli populációkhoz tartozó egyedek között is) és két látszólagos nemváltást is megfigyeltünk (azonos klonális származású vonalban egyszerre voltak jelen hímek és nőstények). Ezenkívül nem találtunk bizonyítékot a kriptikus fajok létezésére a Kárpát-medencei *H. oligactis* populációkban. Az alábbiakban ezeknek a megállapításoknak a következményeit tárgyalom részletesen.

A fakultatív klonális szervezetekben ivaros és ivartalan szaporodás is előfordulhat ugyanazon a fajon belül. A szaporodási módok (ivartalan vs. ivaros) megoszlása azonban az egyedek között nagyon változó lehet. Például a *Schmidtea polychroa* (egy édesvízi planária) európai populációiban egyértelmű genetikai különbségek mutatkoznak a különböző szaporodási módot folytató egyedek között, amelyek allopatrikusan fordulnak elő élőhelyük nagy részén, bár megfigyelhető hibridizáció az ivaros és parthenogenetikus haplotípusok között (Pongratz és mtsai, 2003). Más fakultatívan klonális organizmusokban az ivartalan és ivaros fázisok váltakozása előre láthatóan megjelenik az egyed élete során adott környezeti feltételek hatására (pl. alacsony hőmérsékleten és stresszel járó körülmények között ősszel ciklikus parthenogenetikusság figyelhető meg levéltetvek és Cladocerák esetében; Decaestecker és mtsai, 2009; Nespolo és mtsai, 2009). A *H. oligactis* a ciklikusan parthenogenetikus Cladocerákra hasonlít, mivel ivaros szaporodási módra vált át a nyugalmi állapotnak kedvező (stresszes) körülmények között (Tessier és Caceres, 2004). Bár korábbi tanulmányok azt feltételezték, hogy ebben a fajban előfordulhatnak bizonyos genetikai különbségek a különböző genotípusok között (Tökölyi és mtsai, 2017a; Tomczyk és mtsai, 2015), ebben a vizsgálatban ilyen különbséget nem találtunk. Az egyes szaporodási stratégiákban részt vevő hidra egyedek fenotípusosan hiába különböztek jelentősen egymástól, ennek ellenére sem

találtunk szignifikáns genetikai különbséget az ivaros és az ivartalan polipok között.

Azonban, ugyanazon populációkban a hidrapolipok szaporodási módjukban eltértek egymástól. Egyértelmű bizonyítékot találtunk a fenotipikus plaszticitásra ebben, mivel több esetben a genetikailag azonos klónok szaporodási módjukban egyértelműen különböztek egymástól (egyesek ivarosak, mások ivartalanok voltak). Ez arra utal, hogy a hőmérsékleten kívül vannak olyan belső tényezők vagy környezeti jelzések, amelyek indukálhatják az ivaros szaporodást ennél a fajnál. Először is, a táplálék hozzáférhetőség és előreláthatóság, a populációsűrűség, az életkor, a méret vagy a korábbi stresszoroknak és parazitáknak való kitettség miatt bekövetkező különbségek az egyed állapotában olyan tényezők, amelyek ismerten befolyásolják e faj életmenetének jellemzőit (Tökölyi és mtsai, 2016). Másodsor, a vizsgált víztestekben sajátos mikroélőhelyek (habitat-ok) fordulhatnak elő, amelyek kedvező feltételeket biztosíthatnak az ivaros vagy ivartalan szaporodási módot folytató hidra polipok számára. Harmadszor, lehetséges, hogy a klonális vonalon belüli szaporodási mód plaszticitása egyszerűen a faj életmenetének része és minden genotípusban előfordulhat, bármilyen környezeti hatástól függetlenül, mivel ebben az esetben az ivaros vagy ivartalan szaporodás egyedi döntése véletlenszerű (azaz a bet-hedging egy formája a kiszámíthatatlan környezettel szemben; Simons, 2009; Slatkin, 1974).

Az ivartalan egyedek őszi jelenléte arra utal, hogy a klonalitás adaptív előnyökkel járhat, ami e faj szaporodási stratégiájának része lehet. Az előny abból fakadhat, hogy az irodalomban fellelhető hipotézisekkel ellentétben a hidrapolipok túlélhetik a telet. Ezt erősíti a tény, hogy négy olyan populációt is találtunk, amelyben csak ivartalanul szaporodó egyedek voltak jelen, bár ez adódhat a mintavételünk véletlenszerű hatásából is. A hasonló szaporodási rendszerrel rendelkező Cladocera-áknál már megfigyelték, hogy az ivartalan szaporodásba nagyobb befektetést jelentő stratégia adaptív lehet egy viszonylagosan enyhe téli klímán, ahol alacsony a téli fagyveszély és így a nyugalmi időszakra vonatkozó szelekció enyhe (Tessier és Caceres, 2004). Sajnos kevés adat áll rendelkezésre a vizsgált fajunk szaporodási módjáról más természetes populációkban, de két észak-amerikai populáció terepi megfigyelései alátámasztják ezt a hipotézist. Az egyik ilyen populációban, Bryden (1952) kiterjedt megfigyeléseket végzett 3 éven keresztül a Tennessee állambeli Kirkpatrick Lake-ben (36,3° É), de sosem talált ivaros egyedeket. Ezzel szemben ivaros egyedeket gyakran megfigyeltek ősszel egy északibb populációban (Douglas Lake, Michigan; 45,6° É; Welch és Loomis, 1924). Érdemes azonban megemlíteni azt a lehetőséget is, hogy más tényezők is szerepet játszhatnak abban, hogy ezekben a populációkban hiányoznak az

ivarosan szaporodó egyedek, mint például az eltérő táplálékelérhetőség, a paraziták jelenléte és mennyisége, a *Hydra* populációk mikrobiomjának eltérő összetétele vagy a versengés a forrásokért más *Hydra* fajokkal.

Magas szintű rokonságot találtunk a több tíz kilométerre található populációkból gyűjtött egyedek között is (pl. több esetben féltestvéreket; **3. ábra**). Ez arra utal, hogy a földrajzi korlátok (azaz a *H. oligactis* populációkat elválasztó közvetlen víz általi kapcsolatok hiánya) nem akadályozzák jelentősen a hidrák terjedését ilyen földrajzi távolságokon belül. Általában az ilyen távolságok leküzdhetetlenek egy hidrapolip méretű (10–30 mm) lény számára, ha nincs más külső, diszperziót elősegítő mechanizmus (például zoochoria, anemochoria vagy hidrochoria). Mindazonáltal valamennyi populációnk (kettő kivételével) a Tisza vízgyűjtő medencéjében található és rendszeres árvizek alkalmával ideiglenesen kapcsolódhat a Tisza folyóhoz. Emiatt az is lehetséges, hogy a *H. oligactis* polipok vagy a felvízi régióból származó tartós peték a Tiszán keresztül állandó génáramlást biztosítanak az általunk vizsgált populációkba. Ennek a terjedési módnak a lehetőségét adataink nem igazolják hihetően, mivel a populációk genetikai differenciálódási mintázata nem egyezik ezen populációk földrajzi elhelyezkedésének mintázatával. Ezért azt tartjuk a legvalószínűbb elterjedési módnak, hogy a hidrák (akár élő polipok, akár tartós peték formájában) a vízimadarakhoz tapadva (zoochoria) terjednek át egyik víztestről a másikra, különösen annak fényében, hogy a vízimadarak biológiai terjesztő szerepe egyre több és több faj, különösen a növények és a kis vízi gerinctelen állatok esetében nyer igazolást (van Leeuwen és mtsai, 2012, 2017). Ezen túlmenően a populációk genetikai szerkezete is arra utal, hogy a populációk közötti génáramlás független a földrajzi elhelyezkedésüktől, ami szintén alátámasztja a madarak általi terjedés lehetőségét, bár empirikus bizonyítékok erre a fajta terjedésre a hidrák esetében még nem állnak rendelkezésre. Másrészt az a tény, hogy a klonális vonalak mindig egyetlen populációra korlátozódtak arra utal, hogy a szétterjedés fő módja a tartós peték formájában valósul meg, bár a vizsgált mintánk mérete túl kicsi volt ahhoz, hogy egyértelműen megcáfolja ugyanazon klonális vonalak jelenlétét egyidejűleg több populációban.

A populációk közötti rokonság magas foka még akkor is meglepő, ha a fentiekben leírt kiterjedt terjedési képesség létezik, mivel a feltételezetten hasonló terjedési potenciállal rendelkező édesvízi kisméretű zooplankton szervezetekben meglehetősen gyakori a nagyfokú genetikai differenciálódás (De Meester és mtsai, 2002). A „monopolizációs hipotézis” (De Meester és mtsai, 2002) szerint a nagy populációnövekedési kapacitással és nagymennyiségű nyugvó propagulumbankkal rendelkező, részben parthenogenetikus szervezetek gyakran képesek új környezetekben

megtelepedni és monopolizálni azt, ezáltal minimalizálni a génáramlás hatásait az ilyen élőhelyfoltok között. Egyes édesvízi gerinctelenek azonban nem követik ezt a mintázatot (pl. a mohaállatok esetében *Cristatella mucedo*; De Meester és mtsai, 2002; Freeland és mtsai, 2001; Freeland és mtsai, 2000), valószínűleg a viszonylag alacsony ivaros szaporodási arányuk és kis propagulum bankuk miatt. Ez lehet a helyzet a *Hydra*-k esetében is, mert az eddig leírt esetekben a populáción belül az egyedeknek csak egy része tűnik képesnek az ivaros szaporodásra és az általuk termelt peték száma is viszonylag alacsony (maximum néhány tíz pete nőstényenként; Schuchert, 2010). Az ivaros szaporodáshoz viszonyított klonalitás erős jelenlétére a populációgenetikai statisztikákból (konkrétan a nagy heterozigocitásból) is következtethetünk. Korábbi elméleti és gyakorlati tanulmányok (Balloux és mtsai, 2003; Halkett és mtsai, 2005; Meloni és mtsai, 2013) azt találták, hogy a nagyarányú klonális szaporodás növeli az allélok effektív számát és a heterozigocitást is egy populációban, miközben ellentétes hatást gyakorol a populációk közötti genetikai differenciálódásra és a genotípusok diverzitására. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy ez a hidrafaj olyan szaporodási stratégiát követhet, amelyben magas a klonális szaporodás mértéke. Az ivartalanul szaporodó egyedek – különösen az enyhe téllal jellemezhető években – nagy egyedszámot érhetnek el, így tavasszal lényegesen nagyobb egyedszámról indulhatnak el az adott populációban (verseny előnyt jelent) és ezáltal nagyobb eséllyel juthatnak akár új élőhelyekre is. Emellett egyes tanulmányok már feltárták, hogy a klonális terjedés sikeresebb szaporodási stratégiának tűnik a kis, elszigetelt populációkban, amelyek környezeti stressznek vannak kitéve (Meloni és mtsai, 2013). A klonális növekedés előnye azonban csak rövid életű, mivel hosszú távon monoklonális populációk kialakulásához vezethet. Ezzel szemben, ha egy fakultatív klonális faj képes a bizonyos fokú ivaros szaporodásra az kulcsfontosságú lehet a faj hosszú távú életképességének biztosításában. Ennélfogva az ivartalan szaporodásba való nagyobb befektetést tartalmazó stratégia nagyszámú olyan polip kialakulását eredményezheti, amelyek rövid távon képesek csak terjedni, míg az ivaros utódok kevesebb, de nagyobb mértékű terjedési képességgel rendelkeznek. Ezen hipotézis teszteléséhez még több adatra van szükség.

Vizsgálatunk egyik váratlan megfigyelése az volt, hogy két esetben az egymás klónjaiként azonosított egyedek eltérő nembe tartoztak. A *H. oligactis* egy gonochorisztikus faj (váltivarú faj; azaz hímek vagy nőstények) és az ivartalan bimbóik öröklik a szülőjük nemét a csíravonal összejtek (GSC) átvitele által (Nishimiya-Fujisawa és Kobayashi, 2018). A hidrákban a nemet a GSC-k szintjén határozzák meg, így a hím GSC-ket tartalmazó polipokon herék, míg a női GSC-ket tartalmazó polipoknál peték alakulnak ki. Gonochorisztikus fajokban a hím GSC-k maszkulinizációs jelet fejeznek ki, amelyek gátolják a

peték képzését, ami így stabil hím fenotípust eredményez (Bosch és David, 1986; Nishimiya-Fujisawa és Kobayashi, 2018; Siebert és Juliano, 2017). A *H. oligactis* esetében az ivarváltást megfigyelték már a laboratóriumban (Littlefield, 1986), de úgy gondolták, hogy ez egy igen ritka jelenség (Bosch és David, 1986). A vizsgálatba bevont mintáink öt olyan MLG-t tartalmaztak (polipcsoportok, amelyekből arra következtethetünk, hogy klonális szaporodás útján egy közös szülőtől származnak), amelyek egynél több ismert nemű polipot tartalmaztak és ezek közül kettő az ivarváltás lehetőségére mutatott rá (vagyis egyaránt tartalmazott hím és nőtény polipokat). Bár a szekvenálási hibák és a szomatikus mutációk jelenléte miatt nem lehetünk teljesen biztosak abban, hogy ezek az egyedek egyetlen ivartalan szülőtől származnak-e, két különböző módszerrel is klónként azonosítottuk őket: (I) a genetikai diverzitás spektrumának módszere, amely hozzárendeli MLG-ék közötti genetikai távolságok megoszlását a mintakészletben lévő egyedpárokhoz (Rozenfeld és mtsai, 2007) és (II) COLONY, amely valószínűségi keretrendszert használ a klónok és az azonosított kapcsolatok elkülönítésére (elsőrendű rokonság; Jones és Wang, 2010). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az ivarváltás természetes körülmények között sokkal gyakoribb lehet: a 61 azonosított klónvonalon belül két esetben (3,3%) tudtuk azonosítani az ivarváltást, de a MLG-k közül csak ötben volt egynél több ivaros polip, így az ivarváltoztatott MLG-k gyakorisága 40% is lehet (ötből kettő), vagy akár még magasabb is lehet, ha azt feltételezzük, hogy nem minden ivarváltoztatási eset volt kimutatható. Littlefield (1986) megfigyelései szerint a hímiből nősténnyé való átalakulás alacsony gyakorisággal megy végbe, ha a hím törzseket 22 °C-on tartjuk, de nem figyelhető meg, ha 18 °C-on tartjuk őket. Ezért az ivarváltást a megnövekedett hőmérséklet idézheti elő. Nyáron 25°C feletti vízhőmérsékletet regisztráltunk Tiszadorogma melletti vizsgálati helyszínünkön (M28 populáció), ahol az egyik ivarváltási esetet is észleltük. A nemek megváltoztatásának képessége ennél a fajnál adaptív tulajdonság lehet, ha lehetővé teszi a nemek arányának a környezeti vagy szociális feltételekhez való igazítását. Jelenleg viszont túl keveset tudunk erről a jelenségről a hidrák esetében ahhoz, hogy pontosan lehessen következtetni annak adaptív értékére. A természetes hidrapopulációk szaporodási rendszereinek vizsgálatokor és a laboratóriumi kísérletek tervezése során azonban figyelembe kell venni az ivarváltozás lehetőségét is.

Az eddigieket összefoglalva elvégeztük az első populációgenomikai vizsgálatot a *Hydra* nemzetségben, amely betekintést enged a természetes *Hydra* populációk genetikai sokféleségének mintázataiba. Egyértelmű bizonyítékot fedeztünk fel a fenotipikus plaszticitásra a szaporodási módban ennél a fajnál és betekintést nyertünk a hidrák terjedési mechanizmusainak lehetőségébe. Ezentúl bizonyítékot találtunk a nemváltásra is a természetes *H.*

*oligactis* populációkban. Tanulmányunk eredményei rámutatnak az életmenet stratégiák figyelemreméltó rugalmasságára egy ilyen fakultatívan klonális fajban, amelynek szaporodási módtól függő öregedése van. Ennek a rugalmasságnak az adaptív értéke izgalmas útnak ígérkezik a további kutatásokhoz.

## **2.2. Egy magyarországi *Hydra oligactis* populáció szezonális szaporodási stratégiájának vizsgálata (2. tanulmány)**

### **2.2.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések**

A fakultatívan ivartalan organizmusok az ivartalan szaporodási formát alkalmi ivaros szaporodással kombinálják és megdöbbenően változatos életmeneteket mutatnak (Arnaud-Haond és mtsai, 2012, Stelzer és Lehtonen 2016, Kokko 2020). Az ivartalan szaporodásról ivaros szaporodásra való áttérés ezeknél az organizmusoknál nagyon változó lehet a fajokon belül és a fajok között is (Tessier és Cáceres 2004, Navarro és mtsai, 2013, Franch-Gras és mtsai 2017, Ryan és Miller 2019). Például vízibolhák, kerekesférgek vagy édesvízi hidrák klonális vonalai gyakran különböznek ivaros szaporodásra való hajlandóságukat tekintve oly módon, hogy egyes genotípusok egyáltalán nem mutatnak ivaros szaporodásba történő befektetést, míg más esetekben a klón vonalon belül minden egyed az ivaros szaporodásba fektet be válaszként a környezeti változásokra (Tessier és Cáceres 2004, Tökölyi és mtsai, 2017b). A fakultatívan ivartalan organizmusokkal kapcsolatos kutatások központi eleme az, hogy azonosítsák azokat a tényezőket, amelyek ezt a változást kiváltják.

A fakultatívan ivartalan állatok ökológiájának közös jellemzője, hogy legtöbbjük átmeneti vagy erősen szezonális környezetben él, ahol a kedvező időszakok rendszeresen vagy rendszertelenül váltakoznak a kedvezőtlen időszakokkal. A kedvező időszakok gyakran társulnak a klonális (ivartalan) szaporodáshoz, amely lehetővé teszi a rendelkezésre álló élőhelyek és az azokban előforduló erőforrások maximális kiaknázását (Hadany és Otto 2009, Stelzer 2012, Stelzer és Lehtonen 2016). A kedvezőtlen időszakok ezzel szemben hajlamosak kiváltani az ivaros szaporodást és nyugalmi stádiumot (diapauza) eredményeznek, mint például a levéltetvek, kerekesférgek, vízibolhák és hidrák tartós petéi (Simon és mtsai 2002, Tessier és Cáceres 2004, Schröder 2005, Steele és mtsai, 2019). A fakultatívan ivartalan fajoknál az ivaros szaporodásba való befektetések arányát erősen befolyásolhatják a környezeti körülmények változásai és a diapauzára ható szelekció is, az ivaros szaporodás és a diapauza közötti erős kapcsolat miatt (Tessier és Cáceres 2004, Stelzer és Lehtonen 2016).

A mérsékelt égöv szezonális környezetében a környezeti viszonyok évről évre kiszámíthatóan változnak, ami a kedvező és a kedvezőtlen időszakok váltakozását eredményezi. Kedvezőtlen időszakok előfordulhatnak nyáron amikor a szárazság a fő mortalitási forrás vagy télen amikor a fagyás a fő mortalitást okozó faktor. Az évszakos élőhelyekre jellemző környezet rendszeres változásai mindkét esetben jelzést adnak a környezet romlásának

észleléséhez és a nyugalmi stádiumba való átállás elindításához. A vízibolhák esetében a táplálék, a fényperiódus és a populációsűrűség változásai indukálják a hímek parthenogenetikus termelését. A hímek jelenléte viszont ivaros szaporodást és tartós petetermelést vált ki a nőstényekben (Tessier és Cáceres 2004, Camp és mtsai, 2019). A nappalok hosszának és hőmérsékletének csökkenése az ivartalanról az ivaros szaporodásra való átállást indukálja a levéltetvek esetében (Simon és mtsai, 2002), míg a hidrák esetében a hőmérséklet emelkedése és csökkenése egyaránt (fajtól függően) gametogenezist kiváltó jel lehet. Például az ún. „warm-crisis” hidrafajok (*Hydra vulgaris*, *H. circumcincta*, *H. viridissima*) nyáron, amikor a hőmérséklet emelkedése révén fennáll annak a veszélye, hogy a fajok élőhelyeül szolgáló víztestek kiszáradnak, megindítják az ivaros szaporodást, (Reisa 1973, Schuchert 2010, Kaliszewicz és Lipińska 2013), míg az ún. „cold-crisis” hidra fajok (*H. oligactis*, *H. oxycnida*) a tél beálltát és a víztestek esetleges befagyását jelző tartós hőmérséklet csökkenésre válaszul váltanak ivaros szaporodásra (Reisa 1973, Schuchert 2010).

Hiába szolgáltatnak megbízható információkat a környezeti változásokról a szezonálisan változó környezeti jelzések, egyetlen környezet sem lehet teljesen kiszámítható. Ezen túl a környezeti jelek és a környezeti változások közötti összefüggések sem tökéletesek. Ilyen helyzetben az élőlényeknek kompromisszumot kell találniuk a korai reagálás (így az ivartalan szaporodás lehetőségének elvesztése között, ha a környezet nem várt módon változik) és a késői reagálás között (megnövekedett mortalitást kockáztatva, ha a környezet megváltozik). E kockázatok mérséklése érdekében az évszakok előrehaladtával megnövekvő érzékenység az ivaros szaporodást elindító környezeti ingerekkel szemben optimális stratégia lehet, egy ilyen szezonális, de kiszámíthatatlan környezetben. A kerekférgeknél kimutatták, hogy egyes környezeti jelzésekre (pl. zsúfoltság) válaszul közvetlenül a kikelés után alacsony a hajlamuk az ivaros nőstények képzésére, de ez a hajlam fokozatosan növekszik az ivartalan szaporodás több generációját követően (Schröder és Gilbert 2004). A *Daphnia* fajok esetében a parthenogenetikus anyák által tapasztalt környezeti állapotokról (táplálék mennyisége, napszakok hossza) kapcsolatos információk továbbadónak az utódaik számára, ami biztosítja az utóbbiak tartós pete képzésének pontos időzítését (Alekseev és Lampert 2001). Hasonlóképpen, a laboratóriumban, standard körülmények között tartott hidratörzsekben (amelyeket egy tartóspetéből kikelt polipból hoztak létre), az ivaros szaporodásra való hajlandóság alacsony, de több éves ivartalan szaporítás során mégis megnövekszik (Noda, 1982). Ezek a példák arra utalnak, hogy az ivaros szaporodás indukciója a környezeti jelzésekre válaszul, ezekben a fakultatívan ivartalan fajokban sokkal összetettebb lehet, mint egy egyszerű ingerre adott konkrét reakció. Viszonylag keveset tudunk azonban

arról, hogy a fakultatívan ivartalan fajok életciklusa során hogyan változik a környezeti jelzésekre való érzékenység, valamint a jelenség mögött meghúzódó mechanizmusokat sem ismerjük még.

Az édesvízi *H. oligactis* a mérsékelt égöv erősen szezonális környezetében él. A *H. oligactis* polipok az év nagy részében ivartalanul szaporodnak, de a lehülés hatására ivaros szaporodásra váltanak (Reisa 1973). Az elterjedési területükön lévő természetes populációkban az ivaros szaporodás a nyár végétől decemberig tart (Welch és Loomis 1924, Ribí és mtsai 1985, Sebestyén és mtsai, 2018) és tartós peték termelődését eredményezi, amelyek jól tűrik a hideget (Steele és mtsai, 2019). Ennél a fajnál úgy tűnik, hogy az ivaros szaporodás nagyon költséges a felnőtt egyedek számára, így az ivaros szaporodó polipokban kevesebb az intersticiális őssejtek és a csalánsejtek (nematociták) száma, amelyek a táplálék elfogásához szükségesek. E hátrányos következmények miatt, az ilyen egyedeknek jelentősen gyengébb a regenerációs képessége, valamint elveszítik táplálkozási képességüket és végső soron nagymértékű mortalitást szenvednek el (Yoshida és mtsai 2006, Sebestyén és mtsai 2018, Tomczyk és mtsai, 2020). Tekintettel a *H. oligactis* ivaros szaporodási költségeire, talán nem meglepő, hogy nem minden polip szaporodik ivarosán még akkor sem, ha ugyanazon környezeti ingernek van kitéve. A természetben a populációnak csak egy része szaporodik ivarosán az ősz folyamán (Welch és Loomis 1924, Ribí és mtsai, 1985, Sebestyén és mtsai, 2018). Az azonos populációból származó és standard körülmények között laboratóriumban tartott törzsek ivaros szaporodásra való hajlandóságukban is különböznek (Tökölyi és mtsai, 2017b). Még az egyetlen polip ivartalan szaporodásából származó törzsekben is eltérések mutatkoznak az ivaros szaporodásra való hajlandóságban ugyanazon környezeti jelzés hatására (hűtés; Sebestyén és mtsai, 2020).

Vizsgálatunkhoz egyetlen populációból két éven keresztül tavasszal és ősszel gyűjtöttünk hidra polipokat (összesen négy gyűjtési esemény) és ezekből laboratóriumi törzseket hoztunk létre. Ezeket a törzseket standard körülmények között tartottuk a laboratóriumban (állandó 18°C hőmérséklet és 12/12 órás sötét/világos ciklus; hetente kétszer etettük; minden polipot egyenként tartottunk 6 lyukú szövettenyésztő edényekben mesterséges Hydra-médiumban), majd indukáltuk ivarsejt termelésüket a tél beálltának szimulálásával, a laboratóriumi hőmérséklet csökkentésével (állandó 8°C hőmérséklet és 16/8 órás sötét/világos ciklus). Rögzítettük az ivaros szaporodás jelenlétét, valamint a gonadogenezisig eltelt időt, hogy megbecsüljük a polipok ivaros készülségi állapotát és összehasonlítottuk ezeket a változókat az évszakok között. Továbbá annak megállapítására, hogy az évszakok közötti különbségek a hidrák ivaros készülségi állapotában a

fenotipikus plaszticitás következményei-e, ahogy azt a hipotézisünk alapján vártuk, egy meleg expozíciós kísérleteket végeztünk el két laboratóriumi törzsben (egy hím és egy nőstény vonalon). Ebben a kísérletben megvizsgáltuk az egyedek ivaros készütségében bekövetkezett változásokat válaszul a magas hőmérsékletnek való kitettségre.

## **2.2.2. Anyagok és Módszerek**

### **A mintavételek kivitelezése**

A labortörzseink létrehozásához használt polipokat egy közép-magyarországi hullámtéri holtágból (Tiszadorogma, 47,67 É, 20,87 K) gyűjtöttük négy időpontban: 2018. május 31-én (a továbbiakban 2018 tavasz), 2018. október 1-jén (2018. ősz), 2019. május 16-án (2019. tavasz) és 2019. szeptember 24-én (2019. ősz). Ez a víztest egy kis méretű, sekély holtág, amely egy kis csatornával közvetlenül kapcsolódik a Tiszához. Az e tóban élő *H. oligactis* populációt korábbi tanulmányaink során már többször vizsgáltuk, amely vizsgálatok a hidrák életmenetében megfigyelt eltérések okainak magyarázatát célozták meg (Tökölyi és mtsai, 2017a, 2017b, Sebestyén és mtsai, 2018, Miklós és mtsai, 2021). A mintavételi módszerünk részletes leírása és a faj és ivarmeghatározásra vonatkozó információk megtalálhatóak az előző tanulmányunkban (**1. tanulmány**, Miklós és mtsai, 2021).

### **A törzsek laboratóriumi tartása és az ivaros szaporodás indukálása**

A laboratóriumba hozott hidrapolipokat azonnal hidra médiumba helyeztük (M-médium összetétele: 1 mmol/L Tris, 1 mmol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mmol/L KCl, 0,1 mmol/L MgSO<sub>4</sub> pH 7,6-on; Lenhoff 1983). Legfeljebb öt polipot választottunk ki minden gyűjtési helyről, hogy ivartalan szaporodás útján törzseket hozzunk létre belőlük. Mindegyik egy-egy törzs alapító polipjaként szolgált, mivel az azonos helyen gyűjtött egyedek gyakran különböző genotípusokhoz tartoznak (Tökölyi J. és M. Miklós, nem publikált adatok; Miklós és mtsai, 2021). Mind a természetből gyűjtött polipokat, mind az ivartalan utódaikat külön-külön 6-lyukú edényekben tartottuk, lyukanként 5 ml M-médiumban. Hetente kétszer etettük őket 20 µl frissen kikelt *Artemia* (sórák) szuszpenzióval (az etetési mód leírását lásd Tökölyi és mtsai, 2016) és minden etetés után kb. 1 órával friss hidra médiumba helyeztük őket. Az ivartalan szaporodási szakasz 10 hétig tartott. Ez idő alatt a polipokat klímakamrában tartottuk 18 °C-on és 12/12 órás világos-sötét ciklusban. Az ebben az időszakban keletkezett ivartalan polipokat megtartottuk és az edényekben friss médiumot tartalmazó üres lyukakba helyeztük át őket. Mind a természetből gyűjtött, mind a laboratóriumi eredetű polipok ivartalan utódait felhasználtuk erre a célra. A minták kezelhető mennyiségének megőrzése érdekében hetente csak két bimbót tartottunk meg a magas bimbózási aránnyal

rendelkező törzsek esetében is és a polipok/törzs maximális számát  $N = 18$  (azaz három 6-lyukú edényben) maximalizáltuk. 10 hét elteltével a természetből gyűjtött polipokat és laboratóriumi eredetű ivartalan utódaikat egy  $8^{\circ}\text{C}$ -os klímakamrába helyeztük át 8/16 órás világos-sötét ciklussal, hogy ezzel szimuláljuk a tél beálltát és indukáljuk a gametogenezist („hideg fázis”). A lehűlés napján minden egyedet lefényképeztünk egy szabványos 1 mm-es rácslapra helyezve (sztereomikroszkóp alatt) és így testméretük későbbi meghatározásához megmértük a polipok felületét. Mérésekkel ellenőriztük a testméretek közötti különbségeket a tavasszal és ősszel gyűjtött polipokból származó törzsek között. A lehűtés után levált ivartalan utódokat már nem tartottuk meg a további fenotípus adatok gyűjtésére. A kísérleti állatokat öt hónapig tartottuk  $8^{\circ}\text{C}$ -on, 8/16 órás világos-sötét ciklusban és hetente kétszer ellenőriztük a polipokat sztereomikroszkóp alatt, hogy azonosítsuk a gonadogenezisük kezdetét.

### **Meleg expozíciós kísérlet**

Két laboratóriumi *H. oligactis* törzset használtunk a meleg expozíció ivaros szaporodásra való hajlandóságra gyakorolt hatásának vizsgálatára: egy hím (C2/7) és egy nőstény (X11/14) törzset. Mindkettő ugyanabból a tiszadorogmai populációból származik, de korábban (2016 őszén) gyűjtöttük őket és azóta  $18^{\circ}\text{C}$ -on, 12/12 órás világos/sötét ciklusban tartottuk őket a laboratóriumban (ezek leírását lásd Sebestyén és mtsai, 2020). A hőmérséklet és a meleg expozíció szezonális változásainak az ivaros készülségi állapotra gyakorolt hatásának tesztelésére, először létrehoztunk a „hideg törzseket” a C2/7 és X11/14 törzsekből. A hideg törzsek  $8^{\circ}\text{C}$ -on ivartalanul szaporodó hidrapolipok. A hőmérséklet  $18^{\circ}\text{C}$ -ról  $8^{\circ}\text{C}$ -ra való csökkentése a legtöbb felnőtt egyednél ivaros szaporodáshoz vezet és gyakran már csak néhány bimbó válik le még róluk, mielőtt a gonadogenezis meggátolja a további bimbózást. Ezeknek az ivartalan utódoknak alacsonyabb az ivaros szaporodásra való hajlandósága és magasabb a bimbózási rátája  $8^{\circ}\text{C}$ -on tartva őket (Sebestyén és mtsai, 2020). E bimbók ivartalan szaporításával  $8^{\circ}\text{C}$ -on nagyszámú ivartalan utód generálható (hideg törzsek). A hideg törzseket úgy alapítottuk meg, hogy  $18^{\circ}\text{C}$ -on tartott C2/7 és X11/14 felnőtt polipokat szelektáltuk (mindkettőből  $N = 19$ ) és áthelyeztük őket  $8^{\circ}\text{C}$ -ra, majd  $8^{\circ}\text{C}$ -on ivaros szüleikről leváló bimbókat ivartalanul szaporítottuk. Ez a szakasz 3 hónapig tartott. Miután ily módon nagyszámú ivartalan utódunk született, a hideg törzseket három csoportra osztottuk: (I.) kontrollcsoport, amelyet  $8^{\circ}\text{C}$ -on, (II.) csoport, melyet melegen 1 hétig és (III.) csoport, melyet melegen 4 hétig tartottunk. A melegnek kitett csoportokat  $18^{\circ}\text{C}$ -ra helyeztük 1 vagy 4 hétre, majd visszahelyeztük őket  $8^{\circ}\text{C}$ -ra az ivaros szaporodás indukciója miatt. A kísérlet során a polipokat hetente négyszer etettük, majd tisztítottuk meg edényeiket.

## **Statisztikai analízis**

A tavaszi és őszi gyűjtésből származó egyedek méretét Gauss-eloszlásra alkalmazható kevert lineáris modellekkel hasonlítottuk össze (a törzs azonosítója véletlenszerű hatásként szerepelt az összehasonlításban). Általánosított kevert lineáris modelleket használtunk binomiális eloszlással az évszak szaporodási módra (ivartalan vs. ivaros) gyakorolt hatásának elemzésére, illetve kevert lineáris modelleket Gauss-eloszlással, hogy elemezzük az évszak hatását a gonadogenezisig eltelt időre a lehülés után. A gonadogenezisig eltelt időt az analízis előtt log-transzformáltuk. Mindkét modellben véletlenszerű hatásként alkalmaztuk a törzsazonosítót, hogy figyelembe vegyük a törzsenkénti polipok számának változását. Az évszak, az év, a polipok kora a lehütéskor (napok száma az ivartalan szülőről való bimbó leválása és a lehítés között) és típus (természetből gyűjtött vs. természetből gyűjtött polip ivartalan leszármazottja) szerepelt prediktorként a modellben. A hímeket és a nőstényeket kombináltuk a modellben, elemezve az gonadogenezisig eltelt időt és a nemet is bevontuk az összes többi prediktoral való interakcióba. A teljes modellből lépésenként, a legnagyobb P-értékek alapján kizártuk a nem szignifikáns prediktorokat. A binomiális kevert lineáris modellünket (GLMM) az LME4 csomaggal (v. 4\_1.1-21; Bates és mtsai, 2015; v. 3.6.3; R Core Team 2021), míg a Gauss-féle LMM-ek az NLME R csomaggal (v. 3.1-144; Pinheiro és mtsai, 2020) hoztuk létre R-ben. A binomiális GLMM-nél az effektusméreteket esélyhányadosként (a modellparaméter becslések hatványozásával), míg a Gauss-féle LMM-ek esetében Cohen's d-vel számoltuk az EMATOOLS R csomag (v. 0.1.3; Kleiman 2017) segítségével. Végül mindkét modell szerinti elemzést megismételtük a laboratóriumi eredetű egyedekre is, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a természetes populációkból gyűjtött egyedek ismeretlen életkora nem torzítja eredményeinket. A meleg expozíciós kísérletekben Fisher's exact tesztet használtunk R-ben, hogy összevessük az ivaros és ivartalan egyedek arányának különbségeit. Ezzel szemben az ivaros szaporodás kezdeti időpontját nem tudtuk bevonni az elemzéseinkbe, mivel egyes csoportokban nagyon alacsony volt az ivaros egyedek száma.

### **2.2.3. Eredmények**

#### **A használt törzsek leírása**

A tó 19, 11, 20 és 13 különböző pontjáról gyűjtöttünk polipokat a négy gyűjtési időpontban (2018 tavaszán, 2018 őszén, 2019 tavaszán és 2019 őszén). Az alábbi zárójelben lévő mintaméretetek erre a négy mintavételi dátumra vonatkoznak. A vizsgált törzsek összesen N = 211 polipból lettek létrehozva (54, 40, 59, 58). A lehüléskori törzsek száma a mortalitás miatt alacsonyabb

volt: N = 183 (50, 33, 53, 47) volt a lehülés időpontjában. A hőmérséklet csökkentése előtt elpusztult N = 198 (40, 35, 53, 70) egyed, valamint még N = 123 (18, 31, 63, 11) polip is elpusztult a lehülés után bimbó vagy gonád képzése nélkül (valószínűleg a hirtelen lehüléssel járó stressz miatt). Mivel ezeket az egyedeket nem tudtuk ivaros vagy ivartalan kategóriába sorolni, kizártuk őket a további elemzésből. A végső mintaméret, így N = 1254 polip (403, 204, 452, 195) volt, amely törzsenként átlagosan 6,9 (8,1, 6,2, 8,5, 4,2) polipot jelentett. Nem találtunk szignifikáns méretbeli különbséget a tavasszal és ősszel gyűjtött egyedekről származó polipok között (Gauss lineáris vegyes hatású modell, ős vs. tavasz,  $\beta = -0,106$ , standard hiba [SE] = 0,065,  $t = -1,642$ ,  $P = 0,102$ ).

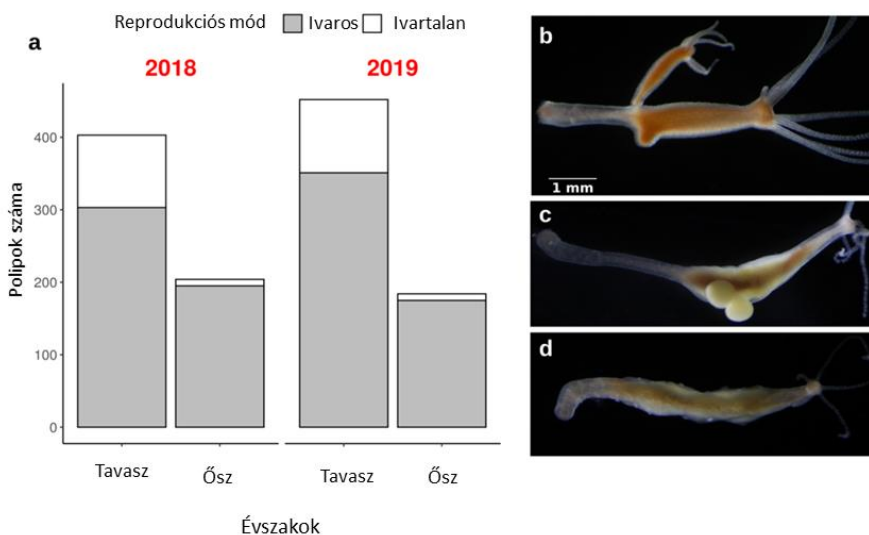
### Az ivaros készülségi állapot szezonális változása

Az évszak szignifikáns hatással volt a szaporodási módra és a gonadogenezisig eltelt időre mind a hímek, mind a nőstények esetében. Az ősszel gyűjtött polipokból származó törzsek nagyobb valószínűséggel szaporodtak ivarosan (3. táblázat, 6. ábra).

**3. táblázat** Az évszak, a polipok életkora, a gyűjtési év és a származásuk (hogyan a természetből lettek-e gyűjtve vagy laboratóriumban keletkeztek-e), hatása az összes polip szaporodási módjára (ivartalan vs. ivaros) (N = 1254) és az ivarmirigyek megjelenésének idejére a lehülés után az ivaros egyedek esetében (N = 1030). Csökkentett modelleket is létrehoztunk a legnagyobb P értékű paraméterek visszafelé történő lépésenkénti eliminálásával. Minden modell random faktorként tartalmazza a törzsazonosítót. A hatás mértéket a binomiális GLMM-ek esélyhányadosaként, a Gauss-féle LMM-ek Cohen-féle d-jeként számítottuk ki.

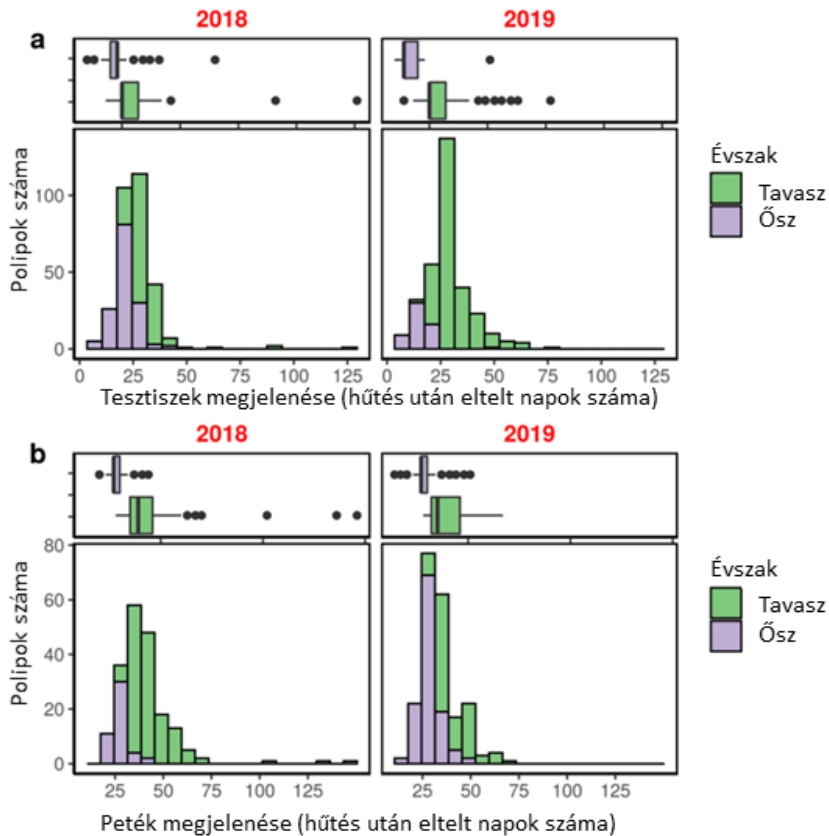
Prediktor	Teljes Modell			Redukált modell		
	Hatás mértéke	Becsült (SE)	t (P)	Hatás mértéke	Becsült (SE)	t (P)
<b>Reprodukciós mód (binomiális GLMM)</b>						
Évszak (ős vs. tavasz)	7.550	2.022 (0.469)	4.311 (<0.001)	7.484	2.013 (0.468)	4.298 (<0.001)
Polip kora	1.021	0.020 (0.006)	3.272 (0.001)	1.020	0.019 (0.005)	3.708 (<0.001)
Év (2019 vs. 2018)	0.702	-0.354 (0.420)	-0.844 (0.398)			
Természetből gyűjtött (igen vs. nem)	0.926	-0.076 (0.429)	-0.178 (0.859)			
<b>Az ivarmirigyek megjelenésének ideje (kevert lineáris modell)</b>						

Évszak (ősz vs. tavasz)	-1.080	-0.415 (0.060)	-6.939 (<0.001)	-1.858	-0.400 (0.033)	-11.970 (<0.001)
Polip kora	-0.368	-0.030 (0.001)	-5.376 (<0.001)	-0.637	-0.003 (<0.001)	-9.336 (<0.001)
Év (2019 vs. 2018)	-0.102	-0.040 (0.061)	-0.653 (0.514)			
Természetből gyűjtött (igen vs. nem)	0.043	0.022 (0.035)	0.629 (0.527)			
Ivar (hím vs. nőstény)	-0.408	-0.362 (0.061)	-5.959 (<0.001)	-0.705	-0.330 (0.032)	-10.341 (<0.001)
Ivar (hím vs. nőstény) × Évszak (ősz vs. tavasz)	0.025	0.026 (0.071)	0.373 (0.709)			
Ivar (hím vs. nőstény) × Polip kora	0.082	0.001 (0.001)	1.203 (0.229)			
Ivar (hím vs. nőstény) × Év (2019 vs. 2018)	-0.012	-0.013 (0.072)	-0.178 (0.859)			
Ivar (hím vs. nőstény) × Természetből gyűjtött (igen vs. nem)	-0.107	-0.071 (0.045)	-1.572 (0.116)			



**6. ábra** a) Az ivaros és ivartalan egyedek aránya a természetes eredetű törzsekben (tavasszal és ősszel gyűjtött *Hydra oligactis* polipokból alapított törzsek, amelyeket standard laboratóriumi körülmények között tartottunk, valamint ivartalan és ivaros egyedek fényképei: b) ivartalan, c) ivaros nőstény, d) ivaros hím.

Az ősszel gyűjtött polipokból létrehozott törzsek is lényegesen hamarabb képeztek gonádokat (átlag  $\pm$  SD idő az ivarmirigyek megjelenéséig lehűlés után: hímek, tavaszi:  $29,2 \pm 10,2$  nap; hímek, őszi:  $20,7 \pm 6,9$  d; nőstények, tavaszi:  $40,8 \pm 13,3$  nap; nőstények, őszi:  $28,4 \pm 5,4$  d; **3. táblázat, 7. ábra**).



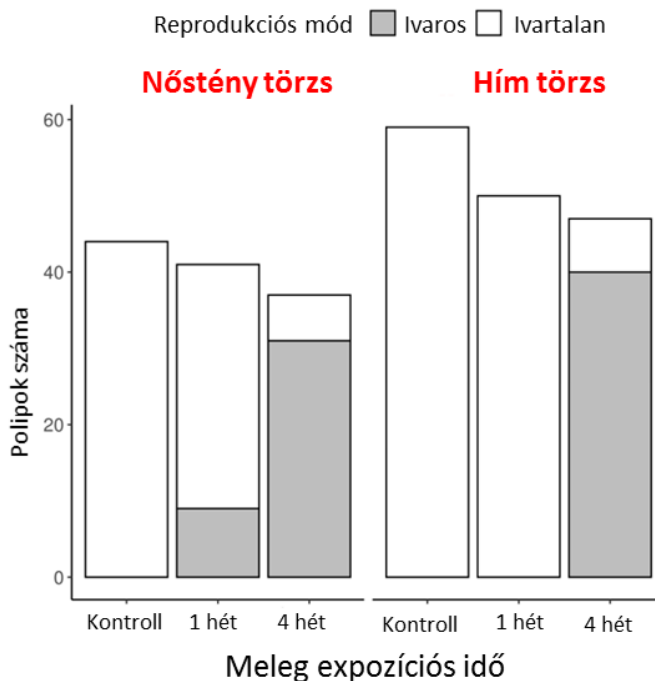
**7. ábra** A gonadogenezis megindításának ideje a tavasszal és ősszel gyűjtött *H. oligactis* hímekből (a) és nőstényekből (b) származó törzsekben, amelyeket azonos körülmények között tartottunk laboratóriumban. A két év (2018 és 2019) adatait külön jelenítettük meg.

Az évszakon kívül a polipok életkora volt az egyetlen olyan további tényező, amely befolyásolta a szaporodási módjukat: az idősebb polipok kicsivel nagyobb valószínűséggel szaporodtak ivaroson (**3. táblázat**). Az ivar és a polip életkora befolyásolta a gonádok kialakulásáig eltelt időt: a hímeknél és az idősebb polipoknál korábban fejlődtek ki az ivarmirigyek, bár ezek a tényezők kisebb hatást fejtettek ki, mint az évszak (**3. táblázat**). Nem találtunk szignifikáns kölcsönhatást az ivar és a többi változó között a gonadogenezisig eltelt idő meghatározásában (**3. táblázat**). Végül ugyanazokat az

eredményeket kaptuk akkor is, amikor megismételtük az elemzéseket a csak laboratóriumi eredetű egyedeket tartalmazó adatállományon is.

### Meleg expozíciós kísérlet

A 3 hónapos ivartalan szaporodási időszak után 8°C-on a kísérletben, N = 125 polipot használtunk fel a nőstény törzsből és N = 162 polipot a hím törzsből. A kísérlet során e polipok közül N = 9 egyed pusztult el (N = 3 a nőstény törzsben és N = 6 a hím törzsben, mindegyik a 4 hetes expozíciós csoportból). Az ivaros és ivartalan egyedek aránya mind a hímek, mind a nőstények esetében jelentősen eltért a csoportok között (Fisher-féle egzakt teszt,  $P < 0,001$  mindkét nemnél; **8. ábra**). A folyamatosan 8°C-on tartott csoportban nem figyeltünk meg ivaros szaporodást. Az 1 hétig 18°C-os hőmérsékletnek kitett polipok közül egyik sem ment át ivaros szaporodásra a hím törzsben, de a nőstény csoportban 41 polipból N = 9 (22%) elkezdte a gonadogenezis-t. A medián kezdőnap ebben a csoportban 63 nap volt a lehűlés után. A 4 hétig 18°C-on tartott csoportokban a nőstény törzsben 37-ből 31 (84%), a hím törzsben pedig 47-ből 40 (85%) kezdett ivaros szaporodásba. A kezdőnapok mediánjai 31, illetve 40 nappal a hőmérséklet csökkentés után voltak meghatározhatók.



**8. ábra** 1 és 4 hetes meleg expozíció hatása az ivaros egyedek arányára a hím és nőstény laboratóriumi törzs hideghez akklimatizált egyedei között. A polipok nagyobb valószínűséggel szaporodtak ivaroson a hosszabb meleg expozíciós időszak után.

#### 2.2.4. Diszkusszió

Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk a tavasszal és ősszel gyűjtött polipokból alapított, standard laboratóriumi körülmények között tartott *H. oligactis* törzsek ivaros szaporodásra vonatkozó készültségi állapotát. Megállapítottuk, hogy ugyanaz a környezeti jelzés, amely a tél beálltát jelzi, eltérő reakciókat váltott ki a tavasszal és ősszel gyűjtött törzsekben. Az ősszel gyűjtött polipokból származó törzsek ivaros szaporodásra való készenléte magasabb volt: nagyobb arányban mentek át ivaros szaporodáson és több mint egy héttel kevesebb időbe telt, a gonadogenezisük megindulása.

A természetes populációkban a *H. oligactis* ivaros szaporodása kizárólag nyár végétől a tél elejéig fordul elő (Welch és Loomis 1924, Reisa 1973, Ribi és mtsai, 1985, Sebestyén és mtsai, 2018). Az ivaros szaporodás eredményeképpen tartós peték képződnek, amelyek túlélnek a telet, ellenben a felnőtt egyedekkel, amelyek vélhetően a víztestek fagyása és/vagy a csökkent táplálék-elérhetőség miatt nagy arányban elpusztulnak (Reisa 1973). Azok a polipok, amelyek a hőmérséklet csökkenésére az ivaros szaporodásra való váltással reagálnak, megnövekedett fitnessszel rendelkeznek, mivel génjeiket továbbadhatják a következő generációnak, mielőtt elpusztulnának. Ezzel szemben, a környezeti jelzésekre adott gyors reagálás nem lehet optimális, ha a hőmérséklet csökkenés csak átmeneti és az ivartalan szaporodást elősegítő feltételek hamar visszaállnak az adott környezetben. Az az egyed, amely ilyen körülmények között fektet be az ivaros szaporodásba, alacsonyabb fitnessszel rendelkezhet, mint egy olyan egyed, amely késlelteti az ivaros szaporodást és addig is az ivartalan szaporodásba fektet be (Harvell és Grosberg 1988, Walsh 2013, Stelzer és Lehtonen 2016, Franch-Gras és mtsai, 2017, Gerber és mtsai, 2018).

Tekintettel a környezeti feltételek kiszámíthatatlanságára és a kitartó képletekbe való befektetéssel kapcsolatos kompromisszumokra, az élőlények várhatóan erős szelekció alatt állnak arra, hogy életmenet döntéseiket pontosan időzítsék. Ennek az egyik lehetséges következménye, hogy a környezeti jelzésekre való általános érzékenység a környezet kiszámíthatóságától függően változhat. Például, ha a környezet rövid távú romlása gyakori, a környezeti jelzésekre való érzékenység csökkenhet, hogy elkerülhető legyen az ivaros szaporodásra való váltás, amikor a klonalitást elősegítő körülmények még gyorsan visszatérhetnek. A nyugalmi időszakot kiváltó környezeti jelekre való érzékenység nagymértékben különbözik a rokon fajok és a fakultatívan ivartalan állatok különböző populációi között (Schröder és Gilbert 2004, Tessier és Cáceres 2004, Walsh 2013, Franch-Gras és mtsai, 2017). Egyelőre nem világos, hogy ez a változás a környezet rövid távú romlásának

gyakoriságában (és ezáltal a környezeti jelzések megbízhatóságában) tapasztalható különbségekből adódik-e.

A kiszámíthatatlan szezonális környezetben a pontos időzítés optimalizációs stratégiájának része lehet, a környezeti jelzések iránti érzékenység növelése az évszakok előrehaladtával, amely esetben a kedvezőtlen évszak közeledtével megnövekszik a diapauzáló formákba való befektetés aránya. Például korábban már leírtak az évszakokkal járó diapauzát kiváltó jelzésekre való fokozott érzékenységet vízibolhák és kerekcsigák esetében is, amelyek transzgenerációs jelzések segítségével biztosítják a tartós peték termelésének optimális időzítését (Alekszejev és Lampert 2001, Schröder és Gilbert 2004). A transzgenerációs anyai hatásokat a rovarok esetében általános stratégiának vélik diapauza indukciójának elkerülésére tavasszal, amikor is a hőmérséklet és a fényperiódus hasonló az őszi viszonyokhoz (Reznik és Samartsev 2015, Tougeron és mtsai, 2020). Az idő múlásával növekvő érzékenység hasonló mintáját leírták már laboratóriumban tartott hidratörzsek esetében is, amelyben a polipok csökkent hajlandóságot mutattak az ivaros szaporodás megindítására a tartós petékből való kikelés után, de a laboratóriumban tartás három éve alatt ez a hajlandóságuk megnövekedett (Noda 1982). Megfigyeléseink kiegészítik Noda (1982) megfigyeléseit, mivel kimutattuk, hogy az évszakok előrehaladtával megnövekedett ivaros szaporodásra való hajlandóság, a természetben élő egyedeknél is megfigyelhető volt. Az idővel növekvő ivaros készülségi állapotra vonatkozó megfigyelések arra utalnak, hogy a hidrapolipok alacsony készülséget tartanak fenn kora tavasszal, de növelik a készülségi állapotukat a tél közeledtével.

Laboratóriumi kísérleteink a tavasszal és ősszel gyűjtött hidrák ivaros készülségi állapotát jellemző mintázatok leírása mellett támpontokat adtak ezen eltérések hátterében álló mechanizmusokhoz is. A *H. oligactis* polipok általában az ivaros szaporodás megindításával reagálnak a hőmérséklet csökkenésére. Ebben a válaszban azonban eltérések mutatkoznak: a fiatalabb polipok csökkent ivaros szaporodási hajlandóságot mutatnak, alacsonyabb a fekunditásuk és magasabb a szaporodás utáni túlélési arányuk (Sebestyén és mtsai, 2020). Korábban megfigyeltük, hogy az ivaros szaporodás után túlélő polipok esetében valószínűtlen, hogy ismét ivaros szaporodáson menjenek keresztül, ha folyamatosan 8°C-on tartjuk őket (Tökölyi J. személyes megfigyelés). Ebben a tanulmányban bemutattuk, hogy 8°C-on (akár több hónapig) ivartalanul szaporított állatokban nem fordul elő ivaros szaporodás. Ez az ivartalan szaporodási szakasz valószínűleg a faj természetes életciklusának része akár a télen is, mivel az ivartalan polipok az ivaros szaporodás után is megmaradhatnak a populációban és így létrehozhatják a nagy denzitást a populációban (Welch és Loomis 1924; Tökölyi J., személyes

megfigyelés). Ezek a megfigyelések együttesen azt támasztják alá, hogy a hideg expozíció önmagában nem elegendő az ivaros szaporodás előidézéséhez ebben a rendszerben.

Mivel a hőmérséklet csökkenése, de nem a folyamatos hideg expozíció, a kulcsfontosságú az ivaros szaporodás indukálásában, egy egyszerű laboratóriumi kísérletet végeztünk, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolja a hideg és meleg időszakok váltakozása az ivaros készülségi állapotot két laboratóriumi *H. oligactis* törzsből. Ezek ugyanabból a populációból származtak, mint a fentiekben vizsgált egyedek, de a kísérlet előtt három évig standard körülmények laboratóriumi körülmények között tartottuk őket. Ebben a laboratóriumi kísérletben a szezonális hőmérsékletváltozásokat szimuláltuk: először csökkentettük a hőmérsékletet, majd 18°C-ra emeltük a kezelt csoportokban 1-4 hétre, míg a kontrol csoport végig hideg körülmények között volt tartva. Végül a melegnek kitett hidrákat visszahelyeztük 8 °C-ra, hogy megpróbáljuk indukálni az ivaros szaporodásukat. Ennek a kísérletnek az eredményei azt mutatják, hogy az ivaros szaporodás nagyon alacsony az 1 hétig melegnek kitett csoportban, de sokkal magasabb volt abban a csoportban, amely 4 hétig volt meleg körülmények között. Összességében ez a kísérlet azt mutatja, hogy a meleg expozíció növeli az ivaros készülségi állapotot és a hideg/meleg időszakok kölcsönös váltakozására van szükség az ivaros szaporodás előidézéséhez ebben a fajban. Az ilyen reciprok hőmérséklet-változásokra való támaszkodás biztosíthatja az ivaros szaporodás időpontjának megfelelő időzítését, mivel ez mindig akkor következik be, amikor egy hosszabb meleg időszakot (vagyis a nyarat és az őszt, amint az e faj természetes élőhelyein általában megfigyelhető) követ egy hideg időszak. Míg kísérletünkben a meleg időszakok nem voltak olyan hosszúak, mint általában e törzsek természetes élőhelyein, ezek mégis kellően mutatták az általunk általában tapasztalt szezonális ingadozásokat. Sőt, a meleg expozíciós kísérlet egyértelműen megmutatta, hogy a szaporodási készülség szezonális különbségei pusztán az azonos genetikai vonalon belüli plaszticitással is magyarázhatók (bár jelenleg nem zárható ki, hogy genetikai különbségek is szerepet játszhatnak a tavaszi és őszi különbség kialakulásában az ebben a vizsgálatban gyűjtött törzsek között).

Közelebről nézve több mechanizmus magyarázhatja a megfigyelt mintázatokat. Először is, számos fakultatívan ivartalan szervezetben az ivaros szaporodásba való befektetés a testmérettől függ, azaz a nagyobb egyedek nagyobb valószínűséggel kezdik meg az ivaros szaporodást (pl. tengeri rózsák: Carlisle és mtsai 2017, Ryan és Miller 2019; hidra: Ngo és mtsai, 2021). A méret is szerepet játszott vizsgálatunkban, mivel azt találtuk, hogy az idősebb polipok (amelyek nagyobbak is) nagyobb valószínűséggel kezdtek az

ivaros szaporodásba és kevesebb időbe telt számukra a gonádok kialakítása is. Ezzel szemben nem tapasztaltunk egyértelmű méretbeli különbséget a tavasszal és ősszel gyűjtött polipok és az azokból származó törzsek között. Ezért valószínűtlennek tartjuk, hogy az ősszel gyűjtött polipokból származó törzsek nagyobb méretük miatt lennének hajlamosabbak az ivaros szaporodásra. Másodszor, a meleg expozíció lehetővé teheti a polipok számára, hogy több erőforrást halmozzanak fel a kedvező időszak folyamán, lehetővé téve számukra, hogy többet fektessenek be később az ivaros szaporodásba. Bár ezt a lehetőséget nem zárhatjuk ki, a *H. oligactis* biológiája alapján ez valószínűtlen magyarázat, mivel ez a faj hideghez alkalmazkodott és csak gyenge hősokk-reakcióval rendelkezik (Bosch és mtsai, 1988). Nyáron viszont a tiszadorogmai holtág vízhőmérséklete elérheti a 25°C feletti hőmérsékletet is (Tökölyi J., Gergely R. és Miklós M. személyes megfigyelések), ami e faj számára stresszesnek tekinthető (Bosch és mtsai, 1988). Figyelembe véve ezeket a megfontolásokat, a meleg expozíció nem valószínű, hogy olyan időszak, amely során a *H. oligactis* polipok forrásokat halmozhatnak fel az ivaros befektetésekhez. Harmadszor, a meleg expozíció hatására megnövekedett ivaros szaporodás mértéke miatt csökkenhet az ivaros fenotípusért felelős sejtpopulációk fejlődésének megváltozása miatt. Az ivarmeghatározás és az ivarsejtek termelése a hidrában a csíravonal őssejtek populációjától függ (Nishimiya-Fujisawa és Kobayashi 2018). Ezek a csíravonali őssejtek lehetnek hímek vagy nőtények és olyan közös multipotens intersticiális őssejtekből származnak, amelyek a szomatikus sejttípusokat is létrehozzák (például nematociták, idegsejtek; Nishimiya-Fujisawa és Kobayashi 2018). A *H. oligactis* esetében jól ismert, hogy a csíravonal őssejtek ivarsejtekké történő differenciálódása 12 °C alatti hőmérsékleten megy végbe (Littlefield 1991, Littlefield és mtsai, 1991). Sokkal kevesebbet tudunk azonban azokról a tényezőkről, amelyek befolyásolják a csíravonali őssejtek proliferációját vagy differenciálódását a multipotens intersticiális őssejtekből. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a csíravonali őssejtek hiányozhatnak vagy nagyon alacsony számban fordulhatnak elő a hideg ivartalan törzsekben. Először is, a folyamatosan 8°C-on tartott polipok nem mennek keresztül ivaros szaporodáson, hanem folyamatosan ivartalanul szaporodtak. Másodszor, a 18°C-os rövid ideig tartó expozíció nem volt elegendő az ivaros szaporodás kiváltásához, hiszen a nőtény törzsnek csak kis százaléka indította el a gonadogenezist. Ezzel szemben ugyanazon mértékű hőmérséklet csökkenés a hosszabb meleg expozíció után elegendő volt ahhoz, hogy nagy valószínűséggel ivaros szaporodást váltson ki. Az általunk megfigyelt mintázat elfogadható magyarázata az lehet, hogy ebben a fajban a csíravonali őssejtek magas hőmérsékletet igényelnek a fejlődéshez és/vagy szaporodáshoz, valamint, hogy 1 hét a 18°C-os hőmérsékleten nem elegendő a csíravonali őssejtek kellő

felhalmozódásához. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez szükség lesz a csírvonal összejtek számszerűsítésére a különböző hőmérsékleti viszonyok között.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy a *H. oligactis* az ivaros szaporodását előidéző környezeti jelzésekre való érzékenysége évszakonként változik. Úgy tűnik, hogy a polipok alacsony ivaros készülségi állapotot tartanak fenn tavasszal, de ez növekszik a kedvezőtlen időszakok beköszöntével. Ezek a megfigyelések kiegészítik Noda (1982) korábbi tanulmányát, amely hasonló hatásokat mutatott ki laboratóriumi körülmények között, valamint más fakultatívan ivartalan fajokon (kerekcsigák és vízibolhák; Alekseev és Lampert 2001, Schröder és Gilbert 2004) végzett vizsgálatokat, amelyek dokumentálják a diapauzát kiváltó érzékenység szezonális változásait a környezeti jelzések hatására. A természetből gyűjtött törzsekkel kapcsolatos megfigyeléseinket kiegészítettük laboratóriumi törzsekkel végzett kísérletekkel, amelyek arra utalnak, hogy a hidrák környezeti ingerekre való érzékenységének növekedése a polipok hosszú távú magas hőmérsékletnek való kitettségével magyarázható. Viszont a jelenség hátterében álló pontos fejlődési mechanizmusok magyarázata még várat magára.

## **2.3. Egy magyarországi *Hydra oligactis* populáció szezonális genetikai változásának leírása egy kétéves periódus alatt (3. tanulmány)**

### **2.3.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések**

A fakultatívan ivartalan organizmusok, mint például a csalánozók vagy a Cladoceraék nagyon fontos elemei a vízi ökoszisztémáknak és nagy számuk miatt nélkülözhetetlenek a táplálékhálózatok felépítéséhez. A fakultatívan ivartalan organizmusok gyakran átmeneti vagy erősen szezonális környezetben élnek, ahol a kedvező időszakok előre láthatóan vagy előre nem látható módon váltakoznak a kedvezőtlenekkel. Kedvező időszakokban gyakori a klonális szaporodás, ami lehetővé teszi a rendelkezésre álló erőforrások maximális kihasználását (Hadany és Otto, 2007; Stelzer, 2012; Stelzer és Lehtonen, 2016). Másrészt a kedvezőtlen időszakok megjelenése gyakran beindítja az ivaros szaporodást, ami végső soron tartós peték kialakulásához vezet, például a levéltetvek (Simon és mtsai, 2002) a kerekférgek (Schröder, 2005; Stelzer és Lehtonen, 2016)), vízibolhák (Tessier és Caceres, 2004) és hidrák (Steele és mtsai, 2019) esetében is. Az ilyen szaporodási rendszerek vizsgálata napjainkban egyre fontosabbá vált, mivel a közelmúlt gyorsuló klímaváltozása miatt jelentősen megnőtt az élőhelyeket érintő extrém környezeti körülmények gyakorisága. E vizsgálatok jelentőségét tovább erősíti a fakultatív klonális fajok által létrehozott ökoszisztémák (pl. korallzátonyok, mangroveerdők) nagyarányú eltűnése és kihalása (Carpenter és mtsai, 2008; Polidoro és mtsai, 2010; Waycott és mtsai, 2009). A fakultatívan ivartalan fajok populációgenetikai szerkezete azonban segítheti őket a rendkívül változó környezetben való túlélésben, mivel a különböző, ivaros úton előállított, de utána klonálisan szaporodó vonalak eltérően reagálnak a környezeti változásokra, amelyekkel szembesülnek, míg az ivartalan szaporodás miatt a populációk gyors növekedés elérésére is képesek maradnak. Ezek lehetővé teszik az ilyen fajok számára, hogy jobban alkalmazkodjanak az éghajlatváltozás okozta kihívásokhoz és még változó körülmények között is fenntartsák a nagy populációméretüket (Pistevos és mtsai, 2011).

A fakultatívan ivartalan organizmusok populációgenetikai jellemzői eltérnek a kizárólagosan ivaros szervezetekétől részben azért, mert a populációik egyedszámának növekedése nem feltétlenül jár együtt új genotípusok megjelenésével, részben pedig azért, mert a szelekció eltérő módon hat rájuk. A fakultatívan ivartalan organizmusok esetében a Nunney-féle „vonal-szelekciós” modell szerint csak az ivartalan vonalak élvezik a rövid távú előnyöket (az erőforrások gyors kiaknázása és magas szaporodási ráta

következtében), de hosszú távon hátrányokat szenvednek a kizárólag ivaros szaporodókhoz képest a magasabb kihálási arányuk miatt (Nunney, 1989). Ez a leszármazási modell valószínűleg még nagyobb jelentőséggel bír a változó környezetben (pl. szezonális élőhelyek), mivel a kitartó képletek létrehozása az ivaros szaporodáshoz kapcsolódik (pl. Daphniák, Decaestecker és mtsai, 2009; kerekesférgek, Stelzer, 2012; vagy hidrák Steele és mtsai, 2019 esetében) és az ivartalanul szaporodó vonalak természetes szelekcióval könnyen kipusztulhatnak a populációból, ha a körülmények leromlanak (Stelzer és Lehtonen, 2016). A csak ivaros szaporodó genotípusok azonban jelentős hátrányba is kerülhetnek ilyen környezetben (Kokko, 2020), mivel az optimális növekedési időszakban nem tudnak kellően nagy egyedszámot elérni. Ennek eredményeként ezekben a populációkban várhatóan azok a genotípusok érvényesülnek, amelyek olyan stratégiát követnek, amelyekben mindkét szaporodási mód megjelenik. Ebben az esetben az ivaros szaporodásuk gyakoriságában és időzítésében mutatkozó különbségek (a szaporodás fenotipikus plaszticitása, Stelzer és Lehtonen, 2016), amint azt a kerekesférgeknél már megfigyelték (Tarazona és mtsai, 2017), nagymértékben befolyásolhatják az ivaros szaporodásuk során létrejött genotípusok túlélését. Így kialakulhat egy speciális, szezonálisan változó genetikai struktúra, amelyben a fő hajtóerő a klonális szelekció és az ivaros szaporodás miatti szakaszos, de nagy léptékű genetikai rekombináció.

A fakultatívan ivartalan organizmusok, például a Daphnia fajok (ciklikusan parthenogenetikus) populációinak genetikai szerkezetét az ivaros és ivartalan szaporodás egyazon életciklusban történő kombinálásának genetikai következményei határozzák meg (Carvalho, 1994; De Meester és mtsai, 2006; Decaestecker és mtsai, 2009), amelyek mintázatát nagymértékben befolyásolhatja a szezonális környezet. A növekedési periódus kezdetén (általában tavasszal) az ivaros úton előállított tartós peték kiképzése megnöveli a populáció genetikai varianciáját, az utódok és az így a létrejövő egyedi klónok között (De Meester, 1996; De Meester és mtsai, 2006). Ezzel szemben az ivartalan szaporodás a kedvező évszakban a klónok sokféleségének erózióját eredményezi a természetes szelekció és általa a klónok egy részének kipusztulása révén, ami végső soron alacsonyabb genetikai varianciához és a populációk Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltéréshez vezet a kedvező időszak végére ("klonális erózió", De Meester, 1996; De Meester és mtsai, 2006; Ortells és mtsai, 2006; Tessier és mtsai, 1992). Ezen túlmenően jelentős mennyiségű rejtett genetikai variáció lehet jelen ezekben a populációkban, amelyek genetikailag nem expresszálódnak, miközben az egyedek klonálisan szaporodnak, de kifejeződnek az ivaros szaporodás során a rekombináció következtében (Deng és Lynch, 1996; Pfrender és Lynch, 2000). A természetes szelekció eltérően működik a két szaporodási fázisban (King és Schonfeld,

2001; Pfrender és Lynch, 2000), mivel az ivartalan fázisban minden gén tulajdonképpen egy kapcsolt csoporthoz tartozik, így a szelekció az egész genomot érinti. Emiatt a klonális szelekció a genetikai variációk kölcsönhatását is alakítja, ellentétben az ivaros szaporodással, amely megszakítja ezen kapcsolt allélok összefonódását (Deaestecker és mtsai, 2009). De Meester és munkatársai (2006) három kulcsfontosságú tényezőt (populáció mérete, a kedvező időszak hossza és a klonális szelekció erőssége) azonosítanak, amelyek befolyásolják a ciklikusan parthenogén populációk genetikai szerkezetét. Azt, hogy a „klonális erózió” milyen mértékben befolyásolja a ciklikusan parthenogén populációk genetikai szerkezetét, elsősorban a fent említett három tényező határozza meg (De Meester és mtsai, 2006). A klonális erózió figyelemreméltó hatását a populációk genetikai összetételének szezonális változásaira már kimutatták (Yin és mtsai, 2010) Daphniák esetében, ahol a klonális genotípusok túlélése populációnként eltért egymástól, jelentősen megváltoztatva a genotípus összetételét, a következő évi populációban. A képet tovább bonyolítja, hogy az egyedek életmenet stratégiái és fiziológiai állapota (pl. életkor, testméret, tápláltsági állapot, stressz-állapot) is jelentősen befolyásolhatják a populációk genetikai összetételét (genotípus diverzitás), mivel ezek olyan tényezők, amelyek egyértelműen szerepet játszanak az ivaros szaporodás megindításában és ezáltal megváltoztatják a populáció dinamikáját (Hadany és Otto, 2007). A genotípus-specifikus életmenet stratégiák pontos szerepét azonban a korábbi vizsgálatok nem vizsgálták kellőképpen.

A mérsékelt égöv szezonális élőhelyein élő *Hydra oligactis* kiváló mintaállatként szolgálhat a fakultatívan ivartalan szervezetek szaporodási rendszerének ökológiai vizsgálatához. A *H. oligactis* polipok ivartalanul szaporodnak (bimbózás) az év nagy részében, de a lehűlés hatására átválnak ivaros szaporodásra (Reisa, 1973). Természetes élőhelyeken a *H. oligactis* elterjedési tartományán belül az ivaros szaporodás nyár végétől decemberig tart (Ribi és mtsai, 1985; Sebestyén és mtsai, 2018; Welch és Loomis, 1924). Az ivaros szaporodás során perzisztens/diapauzáló embriók (tartós peték) keletkeznek, amelyek elviselik a víz lehűlését és a táplálékhiányt (Steele és mtsai, 2019). Megfigyeléseink alapján azonban a természetes populációk egy részében az ivartalanul és ivaros szaporodó egyedek egyidejűleg fordulnak elő a kedvezőtlen időszakok előtt és alatt, valamint a felnőtt egyedek nagy számban túl is élhetnek a kedvezőtlen időszakokat (Miklós és mtsai, 2021; MM és JT, személyes megfigyelések). Ezért nem tisztázott, hogy a diapauzáló petékkel ivaros egyedek hogyan járulnak hozzá e faj genetikai szerkezetéhez és szezonális populációdinamikájához, mivel ezt eddig még nem vizsgálták.

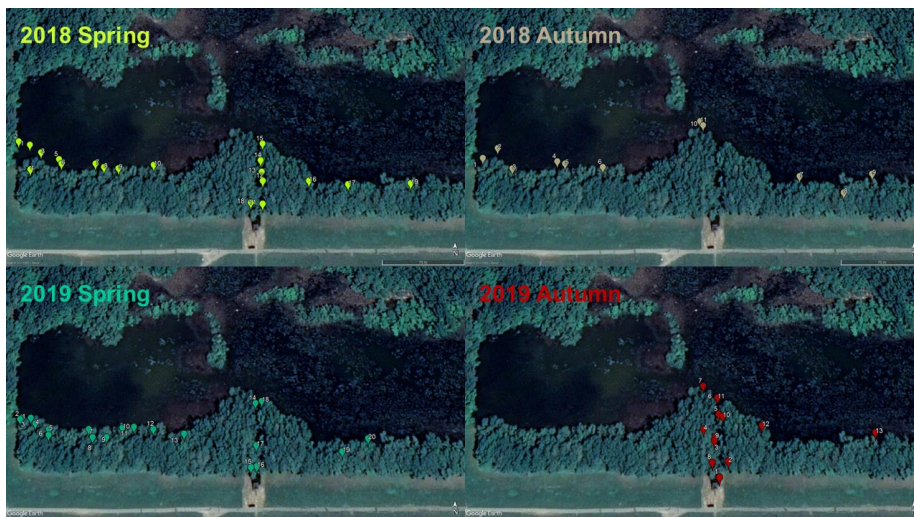
Az első tanulmányunkban (**1. tanulmány**; Miklós és mtsai, 2021) a *H. oligactis* ivaros és ivartalan populációnak térbeli összehasonlítását végeztük el és írtuk le a szaporodási stratégiák háttérében álló genetikai struktúrát. Ez a vizsgálat jelentős fenotipikus plaszticitást mutatott ki a szaporodási módban, az azonos genotípushoz tartozó, egymás mellett élő hidrapolipok szaporodási módjában. Azonban még mindig nem világos, hogy létezik-e finomabb genotípusos eltérés az ivaros szaporodási hajlandóságban és ez a változás hogyan befolyásolja a populációk dinamikáját. Ennek az az oka, hogy a terepi vizsgálatok kevésbé valószínű, hogy kis különbségeket képesek kimutatni a klonális vonalak életmenetében a következők miatt: I) a megfelelő mintavételi stratégia kialakításának nehézségei és a klónvonalonkénti kisszámú egyed, amelyet gyakran természetes populációkból csak véletlenszerű mintavétellel tudunk csak vizsgálni ( Halkett és mtsai, 2005) és II) az a tény, hogy az egyedek természetes környezetükben sokféle környezeti hatásnak lehetnek kitéve, ami így a klonális vonalakon belül is variációkat generál, amelyek elfedhetik a potenciális genotípusos variációkat (Deng és Lynch, 1996; Thorson és mtsai, 2017). E problémák megoldásához nagyszámú, több genotípusból származó, standard laboratóriumi körülmények között tartott, klonális leszármazott egyed vizsgálatára lenne szükség. Jelen tanulmányban ezt a hiányt igyekeztünk pótolni egy *H. oligactis* populáció időbeli genetikai variációinak és az érintett genotípusok fiziológiai és viselkedési jellemzőinek egyidejű azonosításával. Ebből a célból olyan laboratóriumi törzsekből származó reprodukciós stratégiára vonatkozó adatokat használtunk fel, amelyeket egyetlen populációból gyűjtöttünk be tavasszal és ősszel két év alatt (összesen négy gyűjtés) és ezeket a törzseket Restriction-site Associated DNA Sequencing (RAD-Seq) segítségével genotipizáltuk. Ezen adatok alapján először is megvizsgáltuk, hogy a klónvonalak túlélnek-e a kedvezőtlen időszakot és ha igen, ez hogyan befolyásolja a populáció genetikai összetételét egy ilyen mérsékelt égvői szezonális környezetben. Másodsorban a különböző genotípusok szerepét kívántuk feltárni az ivaros szaporodásra való hajlandóságban és annak időzítésében, valamint az ezekhez kapcsolódó populációs dinamikában.

### 2.3.2. Anyagok és Módszerek

#### A *Hydra* polipok gyűjtése

A vizsgálatainkra laboratóriumi hidra törzseket hoztunk létre, természetből begyűjtött egyedekből. Ezeket az előző tanulmányban (**2. tanulmány**) is bemutatott egyetlen kelet-magyarországi holtágból (Tiszadorogma, 47.6712 É, 20.8641 K) gyűjtöttük be. A gyűjtéseket négy időpontban: 2018. május 31. (a továbbiakban 2018 tavasz), 2018. október 1. (2018 ősz) 2019. május 20. (2019 tavasz) és 2019. szeptember 24 (2019 ősz) végeztük. A gyűjtési helyeink a 4

mintavétel során ugyanazon a partszakaszon helyezkedtek el (**9. ábra**). A mintavételi módszerünk részletes leírása és a faj és ivarmeghatározásra vonatkozó információk megtalálhatóak az első tanulmányunkban (**1. tanulmány**; Miklós és mtsai, 2021).



**9. ábra** A térképen a *H. oligactis* polipok gyűjtési partszakasza látható két különböző évszakban (tavasz és ősz) két egymást követő évben (2018 és 2019, ami összesen négy mintavételt jelent) egyetlen közép-magyarországi populációból (Tiszadorogmai holtág). A térképen a pontok jelentik a polipok konkrét gyűjtési pontjait.

### **A laboratóriumi hidra törzsek alapítása és az ivaros szaporodás indukciója**

A hidrapolipok standard részletes tartási körülményei és az ivaros szaporodás indukciójának leírása az előző tanulmányunkban megtalálható (**2. tanulmány**; Tökölyi és mtsai 2021).

### **A szárítás és DNS-kivonás**

A kísérleti állatok szárításra és az azokból történő DNS izolálási módszer részletes leírását lásd (**1. tanulmányunk**; illetve Miklós és mtsai, 2021; 1. kiegészítő módszerek)). A mintákat fagyasztóban (-20 °C) tároltuk a könyvtárak elkészítéséig.

### **A RAD-Seq könyvtárak elkészítése**

A könyvtár készítési protokollunk részletei és a szekvenálásra vonatkozó egyéb részletek megtalálhatóak az **1. tanulmányunkban** (illetve Miklós és mtsai 2021; 1. kiegészítő módszerek). Mintáinkat három különálló RAD könyvtárban szekvenáltuk (56 törzs volt az elsőben, 53 törzs a másodikban és 30 törzs a harmadikban). Valamennyi könyvtár esetében ugyanazt a módszertant alkalmaztuk, de a harmadik könyvtárban mindössze 15 ciklust

alkalmaztunk a PCR amplifikáció során, hogy csökkentsük a PCR duplikátumok mennyiségét.

### **A szekvenciák feldolgozása és tisztítása**

A szekvenciák tisztításának és feldolgozásának módszerét részletesen bemutatjuk az **1. tanulmányban** (illetve Miklós és mtsai 2021; Miklós és mtsai, 2022).

### **Klónok azonosítása és rokonsági kapcsolatok feltárása**

A klónok azonosításának részletes leírása az **1. tanulmányunkban** található (illetve Miklós és mtsai 2021).

### **Szezonális genetikai szerkezet azonosítása**

A genotípusok szezonális eloszlásának vizualizálására az MSN-t használtuk, aminek részletes leírása az **1. tanulmányban** található (illetve Miklós és mtsai 2021). Az alapvető populációgenetikai statisztikákat (várható heterozigocitás, megfigyelt heterozigocitás, fixációs index, allélgazdagság, privát allélok száma és klonális gazdagság, egyenletesség és diverzitás) mind a két adatkészletünkre kiszámítottuk. Az első elemzésbe minden mintát bevontunk. Mivel azonban a *H. oligactis* egy klonális faj, a klónok jelenléte torzíthatja a populációgenetikai statisztikák eredményeit, ezért elkészítettünk egy redukált adatkészletet is, amely mintavételenként minden MLG-ből csak egy törzset tartalmazott (a COLONY-ból kapott eredmények alapján) és megismételtük a számításokat ezen a redukált adatkészleten is. A várt heterozigocitás, a megfigyelt heterozigocitás és a fixációs indexet a HIERFSTAT R csomagban (v. 0,5-7; Goudet és mtsai, 2020), az allélgazdagságot a POPGENREPORT R csomaggal (v. 3.0.4; Adamack és Gruber, 2014), míg a privát allélok számát a POPPR R csomaggal számítottuk ki (v. 2.9.0; Kamvar és mtsai, 2014). A klóngazdagságot a következőképpen számítottuk ki:  $R = (G-1) / (N-1)$ , ahol G az MLG-k száma, N pedig a törzsek száma (Dorken és Eckert, 2001). Az egyenletességet és a Shannon-Wiener diverzitást *poppr*-ben számítottuk ki. A mintavételi időpontok alapján a genetikai szerkezet azonosítása érdekében a főkomponens diszkriminancia analízist (DAPC; Jombart és mtsai, 2010) végeztük el a redukált adatkészletünkön. A DAPC elemzést az ADEGENET (v. 2.1.1) csomag használatával végeztük el az R-ben (Jombart, 2008; R Core Team, 2021). A DAPC analízisben használt fő komponensek számát 13-ra állítottuk be az alfa-pontszám optimalizálás után és minden populációnál a pontfelhő ~67%-át lefedő tehetetlenségi ellipsziseket generáltunk. A DAPC elemzéshez minden MLG-ből csak egy egyedet használtunk fel. Végül elvégeztük az évszakok közötti molekuláris variancia elemzést (AMOVA) is. Az AMOVA-t R-ben a PEGAS (v. 0.10) csomag (Paradis, 2010) alkalmazásával végeztük 1000 permutáció segítségével.

### 2.3.3. Eredmények

#### A gyűjtött törzsek laboratóriumi felépítése

N = 211 polipból hoztuk létre a törzseket (N = 54, 40, 59, 58 a négy gyűjtési időpontban). E törzsek egy része azonban a mortalitás miatt elveszett, mielőtt felhasználható adatokat és DNS-mintákat nyerhettünk volna belőlük. Összesen 138 törzs genotipizálását tudtuk elvégezni (N=40, 30, 38, 30 a négy mintavételi alkalommal).

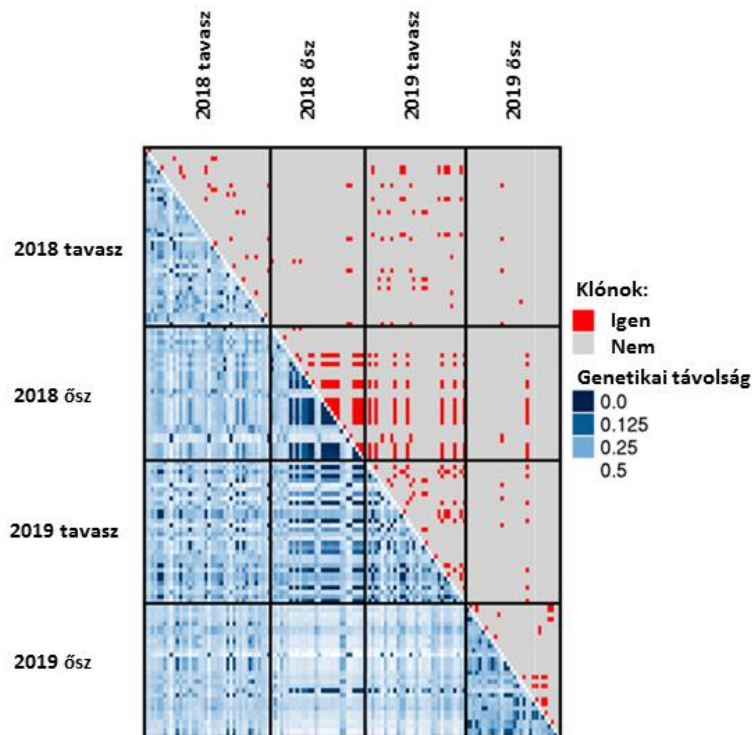
#### A szekvenciák statisztikai kiértékelése és dekontaminációja

Összesen 699,8 millió nyers paired-end olvasásunk volt. A nyers leolvasások 93,6%-a megmaradt, az alacsony minőségű leolvasások, az adapterszennyeződések, a kétértelmű barcode-ok és a kétértelmű RAD-címkék leszűrése után is. Ez átlagosan 4,7 millió leolvasást jelentett mintánként (tartomány: 2,3-20,9 millió). A STACKS de novo pipeline alapértelmezett beállításokkal történő lefuttatása 1 602 803 millió RAD-lókuszt azonosított. E lókusztok 46,9%-a nem mutatott találatot az nt adatbázisban, további 13,6%-uk pedig csalánozó szekvenciákra volt leképezve. A maradékot más taxonómiai csoportokhoz rendeltük hozzá és kiszűrtük azokat. A legfontosabb szennyeződések két baktériumcsoport tagjai adták, a Pseudomonadales és a Burkholderiales, amelyek gyakran megtalálhatók a hidrák mikrobiomjában (Fraune és mtsai, 2015). A feltételezett szennyező lókusztok eltávolítása után a másodlagos GC csúcs is jelentősen csökkent. A szennyeződések eltávolítása után PCR duplikátumként azonosított leolvasási párok aránya 27,2% volt. Az átlagos lefedettség a szennyeződések és a PCR duplikátumok eltávolítása után 13,7-szeres volt mintánként (tartomány: 4,1-25,7). A STACKS de novo futtatásakor ezekkel a végső beállításokkal 1417 RAD-lókuszt kaptunk szűrés után. Hat minta (mindegyik a 2019-es tavaszi kollekciónak) 50%-nál nagyobb egyedi hiányt mutatott, ezért eltávolították azokat. A lókusztok szűrésének megismétlése e minták nélkül 2257 RAD-lókuszt eredményezett. Az egyedek átlagos hiányossága 15,2% volt (tartomány: 2,3-54,1%).

#### Klónazonosítás

A genetikai diverzitás spektrumának vizsgálata nem mutatott ki egyértelmű küszöböt az MLG-k körülhatárolására. Míg az alacsony genetikai távolságnak volt egy egyértelmű csúcsa (kevesebb mint ~0,06), egy kisebb, másodlagos csúcsot is észleltünk ~0,11 genetikai távolságnál. Ez a másodlagos csúcs abból a tényből fakadhat, hogy egyes mintákban magasabb volt a genotipizálási hibaarány (amint azt korábbi, alacsony lefedettségű mintákra vonatkozó vizsgálatunkban is láthattuk; Miklós és mtsai, 2021), vagy abból, hogy a szomatikus mutációk gyakrabban fordulnak elő bizonyos mintákban.

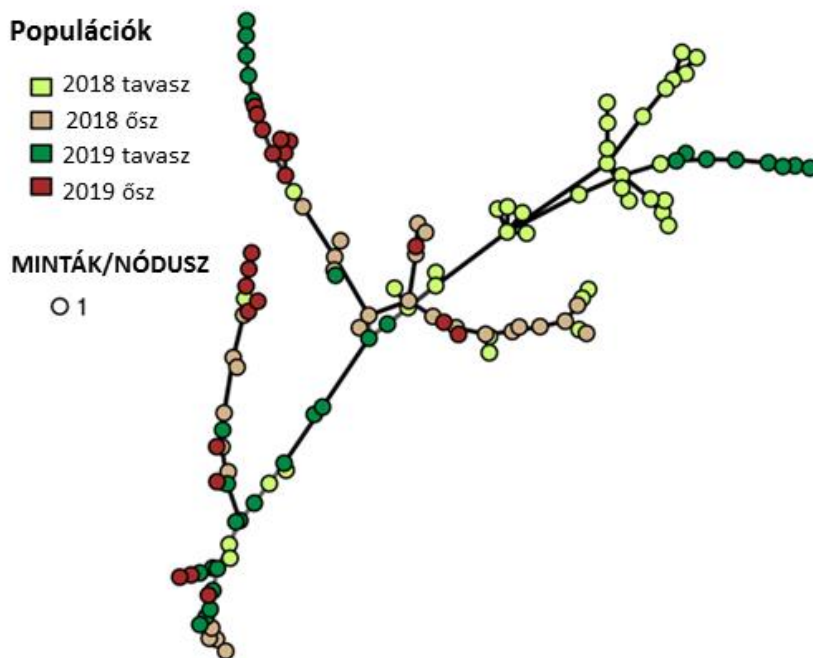
Tekintettel arra, hogy az SNP-ékre nagyon szigorú szűrését alkalmaztuk (minimális genotípus minősége=30 és minimális olvasási hossza/10), a genotipizálási hibaarányának általában alacsonynak kell lennie. Mindazonáltal ennek a másodlagos csúcsnak a jelenléte a genetikai diverzitás spektrumában megnehezíti a klónok azonosítását. A COLONY elemzés is feltárta ezeket a nehézségeket. N=53 MLG-t azonosítottunk az elemzésbe bevont N=132 törzsből álló halmazban (**10. ábra**). Azonban ebből az 53 MLG-ből 11-et (mindegyik egyetlen törzsből állt) 0,9-nél kisebb valószínűséggel azonosítottuk (míg az összes többi MLG-re 1,0 valószínűséggel), ezért úgy döntöttünk, hogy ezeket az egyedeket eltávolítjuk a későbbi elemzésekből, mivel nem tudjuk egyértelműen hozzárendelni őket az adott MLG-khez. Következésképpen a következő elemzéseket a 42 MLG-hez tartozó N=121 törzsen hajtottuk végre. A legtöbb ilyen MLG-t (N=35, 83,3%) csak egy szezonban észleltük. Öt MLG-t (11,9%) észleltünk két szezonban, egyet (2,4%) három szezonban és még egyet (2,4%) mind a négy szezonban.



**10. ábra** Az ábra a genetikai távolságot mutatja N=121 genotípusú *Hydra oligactis* törzs egyedei között, amelyeket négy különböző időpontban gyűjtöttünk (az ábra átlójától lefelé). A COLONY analízis során klónoknak ítélt törzspárok piros színnel láthatók az ábra átlójától felfelé eső részén.

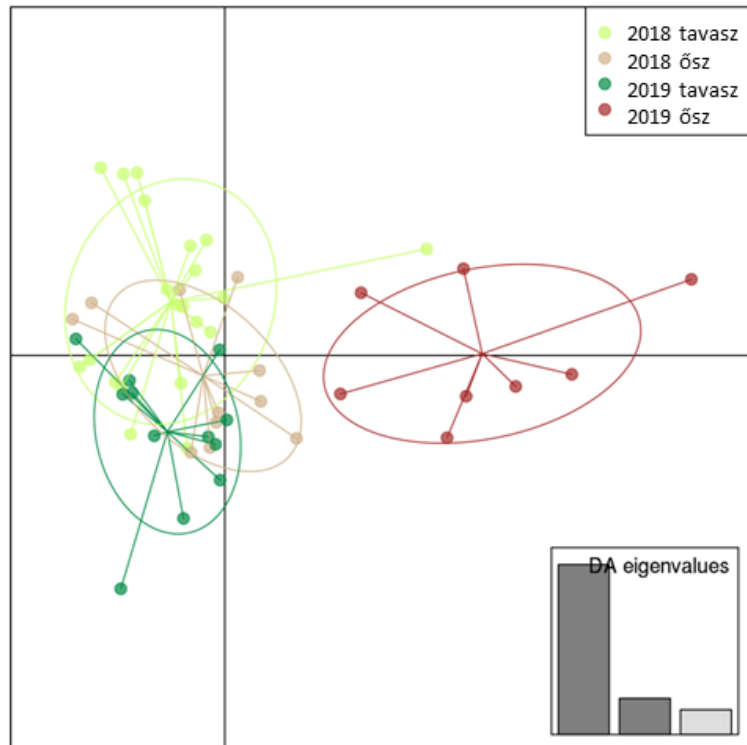
### Szezonális genetikai szerkezet

A klónok gazdagsága és egyenletessége nem mutatott egyértelmű szezonális trendeket, bár a Shannon-Wiener diverzitás valamivel magasabb volt a tavaszi mintákban. A megfigyelt heterozigocitás, a várható heterozigocitás, a Fis, az allélgazdagság és a privát allélok száma sem mutatott markáns szezonális trendeket. A Minimum Spanning Network kimutatta, hogy a különböző évszakokból gyűjtött egyedek nem mutattak szignifikáns elkülönülést egymástól, hanem a gyűjtés időpontjától függetlenül 3 nagyobb ágba csoportosultak (**11. ábra**).



**11. ábra** Két egymást követő évben (2018-ban és 2019-ben) két különböző évszakban (tavasz és ősz) egyetlen kelet-magyarországi populációból gyűjtött polipokból létrehozott N=121 *H. oligactis* törzs genetikai adatai alapján létrehozott Minimum Spanning Network.

A DAPC elemzés szintén jelentős átfedést mutatott az évszakok között, de az utolsó mintavétel lényegesen jobban különbözik a többitől (**12. ábra**). Ezt a tényt tükrözve az is, hogy az AMOVA alapján szignifikánsan eltérő genetikai struktúrát találtunk az évszakok között ( $\sigma^2 = 0,003$ ,  $p=0,01$ ).



**12. ábra** A főkomponens diszkriminancia analízis (DAPC) a négy különböző mintavételből (2018 tavasz, 2018 őszi, 2019 tavasz, 2019 őszi) származó törzsekre, amelyet a redukált adatkészleten végeztünk, amely minden MLG-ből mintavételenként egy törzset tartalmazott.

### Genetikai szerkezet és szaporodási mód

A szaporodási módokra  $N = 921$  polip adatai alapján következtettünk (ezek az előző tanulmányunkban elemzett egyedek egy részét tették ki, amelyek összesen 121 külön genotípusú törzshöz tartoztak (**2. tanulmány**; Tökölyi és mtsai, 2021)). Átlagosan 7,74 polip volt törzsenként a szaporodási mód becsléséhez (tartomány: 1-18). Nem tudtuk meghatározni a reprodukciós módot két olyan törzs esetében, ahol az összes polip elpusztult az adatgyűjtés előtt. A genotipizálás után MLG-nként 21,9 polip állt rendelkezésünkre a reprodukciós mód becsléséhez (tartomány: 2-136). Egy teljesen ivartalan MLG kivételével az összes MLG ivaros és ivartalan egyedek keverékét tartalmazta. Az ivaros egyedek átlagos aránya MLG-nként 74,0% volt és a 42 MLG-ből 11 (26,2%) csak ivaros egyedeket tartalmazott. A binomiális GLMM alapján az MLG ID-vel (MLG azonosító) magyarázott reprodukciós mód variancia aránya 46,7% volt, míg a szezonális hovatartozás és a polipok életkora összesen csak 10,1%-át magyarázták a megfigyelt varianciának. Nem volt különbség a több évszakban észlelt ivaros egyedek arányában az MLG-

kben azokhoz képest, amelyeket csak egyetlen szezonban találtunk meg (Kruskal teszt,  $\chi^2 = 0,014$ ,  $p = 0,905$ ).

#### 2.3.4. Diskusszió

Vizsgálatunk elsődleges célja annak vizsgálata volt, hogy egy közönséges édesvízi fakultatívan ivartalan organizmus, a *Hydra oligactis* populációjának genetikai összetétele hogyan változik mérsékelt övi szezonális környezetben. Kimutattunk (I.) korlátozott mértékű változásokat a populáció szezonális genetikai összetételében és megállapítottuk, hogy: II.) egyes hidrklónvonalak évek és évszakok között is fennmaradhatnak (túlélhetnek). Továbbá azt is megállapítottuk, hogy III.) a különböző genotípusok ivaros szaporodási gyakoriságukban különböznek egymástól. Végül (IV.) a fenti különbségek nem befolyásolták, hogy ezek a genotípusok újra megjelentek-e a mintavételek (szezonom) között.

Nem találtunk egyértelmű bizonyítékot a tavaszi genotípus bőségére a vizsgált hidra populációban, annak ellenére, hogy ez logikus következménye lenne a téli ivaros szaporodásuk magas arányának (új genotípusok generálása) és korábban más fakultatívan ivartalan szervezeteknél is leírták már (*Daphnia*; De Meester, 1996; De Meester és mtsai, 2006). Korábbi vizsgálatok alapján azt vártuk volna, hogy az ivartalan szaporodás a kedvező időszakban a klonális diverzitás csökkenéséhez vezet (természetes szelekció és a klónok véletlenszerű kihalása révén), ami a kedvező időszak végén alacsonyabb genetikai diverzitást és nagyobb eltéréseket eredményezne a Hardy-Weinberg egyensúlytól (klonális erózió; De Meester, 1996; De Meester és mtsai, 2006; Tessier és mtsai, 1992), de a vizsgálati populációnkban ezt a klonális eróziót nem tudtuk egyértelműen kimutatni. Ennek egyik egyszerű oka lehet, hogy nem vontunk be elegendő egyedet a vizsgálatba, így a véletlenszerű mintavételből adódó sztochasztikus hatások torzíthatták eredményeinket. Egy másik ok az lehet, hogy az adatok elemzésekor nem tudtuk megfelelően azonosítani az összes klónt. A klónok azonosítása ebben a vizsgálatban nehéznek bizonyult, mivel viszonylag nagy gyakorisággal fordultak elő olyan egyedpárok, amelyek genetikai távolsága köztes volt a klónok és a különböző genotípusok között. Az SNP-k nagyon szigorú szűrését alkalmaztuk a genotipizálás pontosságának növelése érdekében, ami így tovább csökkentette a mintaméretünk. A COLONY analízis során azonban minden megtartott törzset nagy biztonsággal az adott MLG-ekhez tudtuk hozzárendelni, ezért úgy gondoljuk, hogy a kapott eredményeink egy valódi biológiai mintázatot tükröznek. Általánosságban elmondható, hogy a populációban határozottan létezik egy olyan genotípus-készlet, amely a szezonálisitástól függetlenül viszonylag hosszú ideig fennmarad a természetben. Ráadásul a második őszre

a genotípus összetételében is jelentős változás következett be, bár ennek pontos okát nem ismerjük (elképzelhető, hogy ez a korábbi szokatlanul meleg nyár következménye volt, ami felerősíthette, vagy módosíthatta a megszokott szelekciós hatásokat).

Ez a fakultatívan ivartalan szaporodási rendszer számos hatással van az ilyen populációk genetikai szerkezetére és evolúciójára. Az egyik, hogy a szelekció révén a gyenge kompetitív képességű genotípusok eltűnnek a populációból, így csak a túlélő genotípusok szaporodhatnak ivaroson a jövőben. Egy másik hatás, hogy a különböző rejtett genetikai variációk nem az ivartalan szaporodás során, hanem az ivaros rekombinációt követően fejeződhetnek csak ki (Deng és Lynch, 1996; Pfrender és Lynch, 2000), így lehetővé válik, hogy a populációk új, alkalmazkodóképességüket növelő tulajdonságokat szerezzenek. Emellett meg kell említenünk, hogy a tavaszi genotípusok a más populációkból származó egyedekből és a tartós petékből származó génáramlason keresztül is hozzájárulhatnak a genotípusok abundanciájához, amint azt korábbi tanulmányunk is bizonyította (Miklós és mtsai, 2021). Azonban még nem rendelkezünk elégséges információval az ezen populációk közötti vándorlás mechanizmusáról, gyakoriságáról és időbeli eloszlásáról. A valószínűsíthető terjesztő vektorok a vízimadarak lehetnek, amelyek nagyobb léptékű vonulása elsősorban tavasszal és ősszel történik ezen az éghajlaton, így valószínű, hogy ezekben az időszakokban a génáramlás is jelentősebb lehet. Ezzel szemben, akár ősszel, akár tavasszal vándorolnak az egyedek, elsősorban tavasszal járulhatnak hozzá a genotípusok abundanciájához, mivel a tavasszal belépő egyedekre a növekedési szakaszban történő szelekció egyformán hatással van, míg az ősszel beérkező egyedek sokkal kisebb eséllyel maradhatnak életben és szaporodhatnak ebben az időszakban (a nagyobb versengés következtében). Összességében sikerült kimutatnunk, hogy a természetes szelekció hatása és az egyes genotípusok ivaros szaporodás nélküli túlélése fontos tényező a fakultatívan ivartalan hidrapopulációk genetikai összetételének kialakításában.

Megbízhatóan kimutattuk, hogy egyes klonális vonalak évszakokat, sőt éveket is túlélnek, ellentétben az irodalmi adatokkal, amelyek szerint a hidrapolipok télen elpusztulnak elsősorban a befagyó vizek miatt és csak az ivaros szaporodás során képzett tartós peték maradnak életben (Brien, 1953). A tartós petéken alapuló túlélési stratégia gyakori a mérsékelt vagy hideg éghajlaton fakultatívan ivartalan szaporodást folytató vízi gerinctelen fajoknál, mint például a kerekesférgék (Walsh és mtsai, 2014) vagy a Cladocera-k esetében (Decaestecker és mtsai, 2009). Azokon az éghajlatokon, ahol gyakran előfordulnak enyhe telek, a klónok túlélése esélye is jelentősen megnő, ami így előnyhöz járhat egy adott klón genotípus tekintetében és jobb megtérülését

eredményezheti a téli ivartalan szaporodás fenntartásában. A Cladocera-k esetében már megfigyelték, hogy az ivartalan szaporodásba való nagyobb befektetés adaptív lehet egy viszonylag enyhe téli klímával rendelkező területen, ahol télen kicsi a fagyveszély és emiatt alacsony a nyugalmi időszak fenntartásának adaptív értéke (Tessier és Caceres, 2004). Ez hasonlóan megvalósulhat más mérsékelt égövi fajoknál is, például hidrák esetében is. Populációdinamikai szempontból az ilyen túlélő egyedek jelentősen befolyásolhatják a kora tavaszi populáció összetételét, hiszen már meg is kezdhetik a klonális szaporodásukat és a források kiaknázását, miközben az új genetikai vonalak még nyugalmi állapotban várakoznak. Így az ilyen hidravonalak nagyobb egyedszámmal indulhatnak az újonnan megjelenő genotípusokhoz képest, így jelentős időelőnyre tehetnek szert az erőforrások kiaknázásában. Ennek ellenére két éven át gyűjtött adatkészletünk arra utal, hogy ez a túlélés nem jelent akkora előnyt az ilyen vonalak számára, hogy a legtöbb új genotípust kiszoríthassák, de még így is jelentősen hozzájárulhatnak a genotípusok tartós jelenlétének fenntartásához a populációban.

Azt is megfigyeltük, hogy a különböző genotípusok ivaros szaporodási gyakorisága különbözik. Néhány korábbi tanulmány (Tökölyi és mtsai, 2017a; Tomczyk és mtsai, 2015) alapján azt gondoltuk, hogy a genotípusok különbségei hozzájárulhatnak a hidrák ivaros szaporodási hajlandóságának változásaihoz, mivel normál laboratóriumi körülmények között a *H. oligactis* törzsek különböznek az ivaros szaporodás megkezdésének valószínűségében és a túlélési arányukban (Ngo és mtsai, 2021). Ezzel szemben egy másik korábbi, a természetes körülmények között zajló szaporodási módot elemző vizsgálatban magas arányú fenotipikus plaszticitást észleltünk a szaporodási stratégiákban ennél a fajnál (Miklós és mtsai, 2021). Továbbá ez felveti annak lehetőségét is, hogy egy genotípus eltérően reagál ugyanarra a környezeti ingerre (akár belső állapotától függően; Hadany és Otto, 2007), így az évszaktól függően változatos szaporodási állapotot hozhat létre a populációkban (Tökölyi és mtsai, 2021). Korábbi állításunkat ebben a tanulmányban is megerősítettük, azonban azt is kimutattuk, hogy a különböző genotípusok eltérő hajlandóságot mutatnak az ivaros szaporodás megkezdésére azonos feltételek mellett is. Ennek jelentős szerepe lehet az ilyen populációk genetikai összetételének hosszú távú változásában, hiszen az adott környezeti állapothoz legjobban alkalmazkodó genotípusok lehetnek a legelterjedtebbek az adott élőhelyen. Ezenkívül egy ilyen fakultatívan ivartalan szaporodási rendszer valószínűleg lehetővé teszi a helyi körülményekhez való gyors adaptációt a genotípusok szelekcióján keresztül, a fenotipikus plaszticitási válaszok adaptív kombinációjával (De Meester és mtsai, 2004). Egyes tanulmányok már korábban bizonyítékot szolgáltatottak a környezeti változások idővel történő hatékony nyomon követésére *Daphnia*

populációk esetében (Cousyn és mtsai, 2001; Hairston és mtsai, 2001). Ez azt jelenti, hogy enyhe éghajlaton, ahol a tél kevésbé zord, azok a genotípusok részesültek előnyben, amelyek kisebb hajlamot mutattak az ivaros szaporodás megindítására. Ezenkívül korábbi esetekben jelentős különbségeket írtak le egyes tengeri fajok klónvonalai (genetikai egyedei) között a környezeti ingerekre adott válaszukban, beleértve a szaporodási mód megválasztását is (Langer és mtsai, 2009; Pistevos és mtsai, 2011). Ez a tulajdonság nagy jelentőséggel bír ezeknél a fajoknál a környezethez való alkalmazkodásban, hiszen további mutációk nélkül, csak a szelekció által irányított. Ez azért is fontos, mert az ilyen metazoák könnyebben tudnak alkalmazkodni a gyors globális változásokhoz a meglévő genotípus variációkat befolyásoló természetes szelekció révén (Balanyá és mtsai, 2006; Bradshaw és Holzapfel, 2001), annak ellenére, hogy mutációs változásaik lassan történnek (Hoffmann és mtsai, 2003).

Érdekes módon a genotípus-tulajdonságok különbségei nem befolyásolták a specifikus genotípusok újbóli megjelenését a különböző mintavételeink között. Ennek az lehet a legegyszerűbb magyarázata, hogy egy ilyen mintavételi időintervallum nem elegendő a populációdinamikai hatások ilyen következményeinek pontos leírásához, mert a véletlenszerű hatások könnyen elfedhetik azokat. Alternatív magyarázat lehet az is, hogy az egyes genotípusok annyira plasztikusak, hogy még ha a genetikailag azonos származású egyedek jelentős része ivaros szaporodik is, az ivartalanul szaporodó polipok így is túlélhetik őket és így fenntartják az adott genetikai vonalat (bet-hedging; Simons, 2009; Steele és mtsai, 2019).

Összességében korlátozott eltéréseket tudtunk kimutatni a populáció szezonális genetikai összetételében és azt, hogy egyes hidraklónvonalak évek és évszakok között is túlélhetnek. Azt is megfigyeltük, hogy a különböző genotípusok különböznek az ivaros szaporodás gyakoriságában. Fenti eredmények azt mutatják, hogy a fakultatívan ivartalan organizmusok genetikailag elég plasztikusak ahhoz, hogy párhuzamosan fenntartsák a különböző szaporodási stratégiákat (ivartalan és ivartalan szaporodás), ami jelentős előnyhöz juttathatja őket a kiszámíthatóan változó környezetben, így növelve alkalmazkodóképességüket még az ivartalanság ellenére is, az előre nem látható változásokkal szemben. Emiatt ennek a képességnek a vizsgálata ma még aktuálisabb, mivel az ilyen tulajdonságokkal rendelkező populációkra épülő ökoszisztémák kulcsfontosságúak lehetnek az éghajlatváltozás okozta ökológiai károk mérséklésében.

## **2.4. Kárpát-medencei *Hydra oligactis* populációk mikrobiom összetételének vizsgálata különböző szaporodási módok és élőhelytípusok függvényében (4. tanulmány)**

### **2.4.1. Irodalmi áttekintés és célkitűzések**

Azok a mikrobiális organizmusok, amelyekkel az állatok együtt élnek (együttesen a gazda-asszociált mikrobióta néven (Berg és mtsai, 2020)) jelentős hatást gyakorolnak gazdáikra (McFall-Ngai és mtsai, 2013). A mikrobióta gyakran befolyásolja a gazdaszervezet egészségi állapotát (Shreiner és mtsai 2015, Rathje és mtsai 2020), a viselkedést (Vuong és mtsai 2017, Murillo-Rincon és mtsai 2017) és bizonyos esetekben kimutatták, hogy befolyásolja a gazdaszervezet fittneszét meghatározó tulajdonságokat is, mint például a gazda növekedési üteme, szaporodása, túlélése és öregedése (Shin és mtsai 2011, Sison-Mangus és mtsai, 2015, Gould és mtsai, 2018, Popkes és Valenzano 2020).

A mikrobióta egyik legfontosabb tulajdonsága annak összetétele és sokfélesége. A mikrobióta diverzitása befolyásolja a mikrobiális közösségben előforduló interakciók számát és típusát (Coyte és mtsai, 2015), valamint befolyásolja a gazdaszervezet, a mikrobióta és a kórokozók közötti háromoldalú kölcsönhatásokat is (Fraune és mtsai, 2015, Harrison és mtsai, 2019). Ezenkívül a diverzitás befolyásolhatja a mikrobiális közösségek stabilitását és a zavarásokkal (perturbációkkal) szembeni ellenálló képességét is (Vieira-Silva és mtsai, 2016). A diverzitás csökkenése gyakran diszbiózishoz vezet a környezeti stresszorokra vagy a gazdaszervezet táplálkozási változásaira válaszul (Infante-Villamil és mtsai, 2020). Ezért a természetes populációkban a mikrobiális diverzitást meghatározó tényezők megértése kulcsfontosságú a gazdaszervezetek fiziológiai eltéréseinek magyarázatához.

A természetes populációkban a gazdaszervezethez kapcsolódó baktériumok diverzitását és összetételét számos tényező befolyásolja, például a gazdaszervezet tápláléka (Sullam és mtsai 2015, Youngblut és mtsai 2019, Lutz és mtsai, 2019), a gazdaszervezet genotípusa, a populáció genetikai sokfélesége (Sullam és mtsai 2015, Webster és mtsai 2018, Griffiths és mtsai, 2018), az élőhely jellemzői, mint például a sótartalom (Schmidt és mtsai, 2015, Mortzfeld és mtsai, 2016), a víz hőmérséklete (Vargas és mtsai, 2021), vagy a pH (Sylvain és mtsai, 2016), valamint a földrajzi fekvés (Mortzfeld és mtsai, 2016, Llewellyn és mtsai, 2016) és akár az éghajlat is (Kueneman és mtsai, 2019, Woodhams és mtsai, 2020). Ezeknek a tényezőknek a fontossága azonban csak a közelmúltban kezdett feltárulni előttünk és a mikrobiális

sokféleség változását okozó mechanizmusok még mindig kevésbé ismertek. Döntő fontosságú, hogy a felhalmozódó bizonyítékok azt mutatják, hogy a tényezők relatív jelentősége taxononként eltérő lehet. Például azt találták, hogy a gazdaszervezet evolúciós történetének a mikrobiális sokféleség erős mozgatórugója lehet számos állatcsoport esetében, a szivacsoktól és korallaktól a különféle gerinces csoportokig (Franzenburg és mtsai 2013, Easson és Thacker 2014, Pollock és mtsai, 2018, Youngblut és mtsai, 2019). Ezzel szemben úgy tűnik, hogy a környezeti tényezők lehetnek a domináns szereplői az evolúciós történetnek más taxonokban (például édesvízi zooplankton fajok esetében), filoszimbiózisra utaló bizonyítékok nélkül (Eckert és mtsai, 2021).

A hidrák rendkívül gazdag baktérium közösséggel élnek együtt. Ezek a baktériumok megtelepednek a külső hámfelületükön (Fraune és mtsai 2015, Deines és Bosch 2016), sejtek közötti terekben (Rathje és mtsai, 2020), sőt egyes fajoknál endoszimbiontaként a sejtek belsejében is előfordulhatnak (Fraune és Bosch 2007). A *Hydra* mikrobióta változatos hatással van a gazdaszervezetre. Amikor kísérleti úton eltávolították a mikrobiótát az állatokról, azok mozgási és kontraktilitási képessége csökkent (Murillo-Rincon és mtsai, 2017), valamint károsodott az ivartalan szaporodási képességük is (Rahat és Dimentman 1982). A mikrobiális elemek közötti kölcsönhatások is befolyásolják az állatok fiziológiai állapotát (Taubenheim és mtsai, 2020) és akár tumorgenezist is indukálhatnak (Rathje és mtsai, 2020), ellenben az eredeti mikrobiális elemek jelenléte megvédi a gazdát a gombás fertőzésektől (Fraune és mtsai, 2015).

A hidrapolipok antimikrobiális peptidek termelése révén aktívan alakítják a hozzájuk tartozó baktériumközösség összetételét (Fraune és mtsai 2010, Franzenburg és mtsai, 2013, Augustin és mtsai, 2017). Ennek eredményeként a laboratóriumban tartott *Hydra* fajok különböznek a baktériumközösségeik összetételében (Franzenburg és mtsai, 2013), valamint ezek a közösségek hosszú távú tartós kapcsolatot mutatnak a gazdaszervezettel, részben tükrözve a természetes élőhelyeikben megfigyelt különbségeket (Fraune és Bosch 2007). Ezenkívül a mikrobióta komponenseit legalább részben vertikálisan továbbadják az embrióknak az anyák, egy anyai antimikrobiális peptidek által szabályozott folyamaton keresztül (Fraune és mtsai, 2010, Minten-Lange és Fraune 2020), ami lehetőséget ad a gazdafiziológia és a mikrobiális diverzitás közötti koevolúcióra is. A természetes hidrapopulációk mikrobiális összetételének és sokféleségének változását okozó tényezők azonban mindeddig ismeretlenek maradtak.

Ebben a tanulmányban arra törekedtünk, hogy megértsük azokat a tényezőket, amelyek befolyásolják a baktériumok sokféleségét a természetes hidrapopulációkban. Ebből a célból 21 közép-európai víztestből gyűjtöttünk három különböző, de együtt előforduló fajhoz (*H. oligactis*, *H. vulgaris* és *H. circumcincta*) tartozó polipokat. Megvizsgáltuk, hogy a *Hydra* baktériumdiverzitását befolyásolja-e I.) maga a mintavételi populáció egyedisége, II.) a víztest típusa III.) a mintavételi populáció tápanyagterheltsége, IV.) maga a gazdafaj és V.) a gazdaszervezet szaporodási állapota. A korábbi tanulmányokkal összhangban (pl. Fraune és Bosch 2007) azt vártuk, hogy a három *Hydra* faj különálló mikrobaközösségekkel fog rendelkezni és arra voltunk kíváncsiak, hogy ezek a fajok közötti különbségek mennyire konzisztensek különböző populációkban. Feltételeztük továbbá, hogy az élőhely típusa befolyásolhatja azt a mikrobiális diverzitást, amelyből a gazdaszervezethez kapcsolódó mikrobiális közösségek létrejönnek és ezért minden helyszínen rögzítettük, hogy az állóvízről vagy vízfolyásról van-e szó, valamint tápanyagterhelés szerint is kategorizáltuk őket, mezoeutróf, eutróf vagy hipereutróf kategóriákba. Végül azt feltételeztük, hogy a gazdaszervezet szaporodási állapota befolyásolhatja a gazdaszervezethez kapcsolódó mikrobiális taxonok sokféleségét, mivel az ivaros szaporodáshoz megváltozott fiziológia is kapcsolódik. A három faj közül legalább egynél (*H. oligactis*) az ivaros szaporodás a szomatikus fenntartó funkciók jelentős csökkenésével jár, ideértve a regenerációs képesség elvesztését, az őssejtek elvesztését és a táplálékfelvétel szempontjából fontos nematociták (csalánsejtek) eltűnését (Sebestyén és mtsai, 2018), így ezek a fiziológiai változások befolyásolhatják a gazdaszervezethez kapcsolódó baktériumok szabályozásának képességét is.

## 2.4.2. Anyagok és Módszerek

### Mintavételi módszer

21 víztestről (20 Magyarországon, 1 Romániában található; **4. táblázat**) gyűjtöttünk mintákat 2019. november 7. és november 27. között. Mindegyik gyűjtési populációban több, egymástól legalább 2 méteres távolságra lévő helyről gyűjtöttük be a hidra polipokat. A mintázott víztesteket állóvíz (tavak) vagy vízfolyás (folyók, patakok és csatornák) víztest típusokba soroltuk be. Ezen túlmenően a víztestek trofikus szintjét mezoeutróf, eutróf vagy hipereutróf kategóriába soroltuk, a következő tényezők alapján: a vegetációs időszak alatti algavirágzás gyakoriságának és a makrofita vegetáció jelenlétének nagysága szerint a személyes megfigyeléseink alapján, valamint a mezőgazdasági területek közelsége és az ebből adódó potenciális befolyó terhelés, a kereskedelmi célú halászati és horgászati hasznosítás szerint. A hipereutróf kategóriában általában nagy tápanyagterhelés (leginkább mezőgazdasági területekről és haltenyésztésből származó terheléssel)

jelentkezik, ami gyakori és jelentős algavirágzásokat eredményez. Az eutróf kategóriájú víztestekben gyakori az algavirágzás, de a tápanyagterhelés nem olyan jelentős (főleg haltenyésztésből és horgászatból származik a terhelés. A mezoeutróf kategóriába tartozó vizekben esetenként kisebb tápanyagterhelés mellett ritkán algavirágzás is megfigyelhető volt.

A mintavételi módszerünk részletes leírása és a faj/ivaros állapot meghatározására vonatkozó információk megtalálhatóak az **1. tanulmányban**, (illetve Miklós és mtsai, 2021).

A DNS-t teljes polipokból vontuk ki, amelyeket először szűrt tóvízzel finoman megmostunk, hogy eltávolítsuk a polipokhoz tapadt törmeléket. A DNS teljes polipokból való izolálása azt jelenti, hogy minden egyes hidra egyednél mintát vettünk az úrbélben, a polipok külső felületén és a szövetekben elhelyezkedő baktériumokból is. Ez továbbá azt is jelenti, hogy a gazdaszervezethez csak átmenetileg kapcsolódó baktériumok (például a hidrák által elfogyasztott táplálékból, a környező vízből vagy a makrofitákat borító biofilmből) is kimutathatóak voltak a vizsgálatunkban. Mosás után a polipokat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottuk és a következő 1 héten belül DNS-izolálást végeztünk belőlük, kloroform/izoamil-alkohol extrakciós módszerrel (az extrakciós protokoll részletes leírása Miklós és mtsai, 2021. mellékletében megtalálható). A kivonatokból  $5\text{ }\mu\text{l}$ -t használtunk a 16S szekvenáláshoz.

A gyűjtött hidrák fenotípus alapján történő fajazonosítási eredményeinek további igazolására minden mintán PCR-reakciót is végeztünk a *H. vulgaris* HSP70-re specifikus primerekkel (Steele és mtsai, 1996). A PCR reakciókat két hőmérsékleten hajtottuk végre:  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  és  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ez a primerpár mindkét hőmérsékleten egyértelmű jelet ad a *H. vulgaris* esetében, míg a *H. circumcincta* esetében nem észlelhető jel. A *H. oligactisban* csak  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on mutatható ki tiszta PCR termék. A mintákhoz rendelt végső fajazonosság a fenotípus ellenőrzés és a PCR-eredmények konszenzusa volt.

### **16S rRNS gén amplikon szekvenálása**

A 16S rRNS gént a V1 és V2 hipervariábilis régiót (27F–338R) szegélyező, egyedi barcode-okkal rendelkező primerek segítségével, fuzionált MiSeq adapterekkel és heterogenitási spacerekkel amplifikáltuk  $25\text{ }\mu\text{l}$ -es PCR-ben (Fadrosh és mtsai, 2014). Az alkalmazott PCR protokoll lépéseinek leírása megtalálható a következő cikkben: Taubenheim és mtsai, (2022). A shotgun szekvenáláshoz a könyvtár előkészítését a NexteraXT kit (Illumina) segítségével végeztük a használt DNS fragmentálására és multiplexelésére a gyártó utasításait követve. A szekvenálás részletes leírása szintén megtalálható a Taubenheim és mtsai, (2022) közleményében.

## **Adatelemzés**

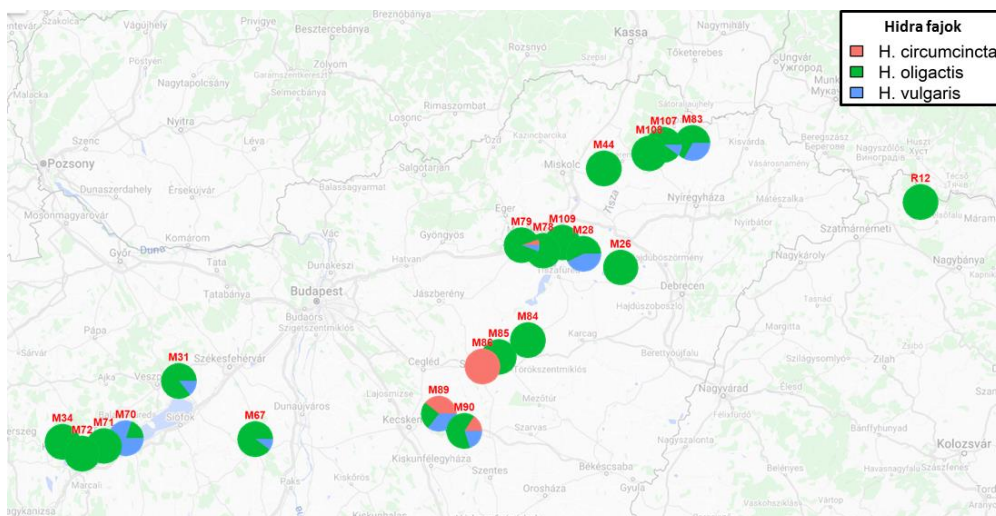
A szekvenálási leolvasások elemzésének, zajtalanításának, taxonómiai és filogenetikai annotációjának leírása a következő cikkben (Taubenheim és mtsai, 2022) részletesen megtalálható. Az így kapott adatok elemzéséhez és ábrázolásához az R statisztikai programozási nyelvet (v4.1.0) használtunk (R Core Team 2021). Ebben végeztük el a kapott szekvenciák ESV szűrését, aminek részletes leírása Taubenheim és mtsai, (2022) közleményében megtalálható. Az általános adatkezeléshez és ábrázoláshoz a DATA.TABLE v1.14.0, GGLOT2 v3.3.5 és COWPLOT R csomagokat használtuk (Wickham 2016, Wilke 2020, Dowle és Srinivasan 2021). A  $\beta$ -diverzitás számításokhoz normalizáltuk és variancia stabilizáló transzformálást végeztünk a nyers olvasási adatokkal a DESEQ2 v.1.32.0 csomag *vst()* függvényével (Love és mtsai, 2014), míg az  $\alpha$ -diverzitást közvetlenül a nyers leolvasási adatmátrixon keresztül számítottuk ki. Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -diverzitás mértékét a PHYLOSEQ és a VEGAN csomagok felhasználásával számítottuk ki (McMurdie és Holmes 2013, Oksanen és mtsai, 2020). Az UMAP ordinációt a  $\beta$ -diverzitás mértékére számítottuk az UMAP v0.2.7.0 csomag (Konopka 2020) *umap()* függvényével, a *dist*-opciót alkalmazva, míg a PCA számítást ugyanezen adatokon a *PRCOMP()* alapsomag segítségével végeztük. Az alapvető statisztikai elemzéseket az R alapsomaggal (lineáris modellek, Kruskal-Wallis tesztek), míg a PERMANOVA-val a  $\beta$ -diverzitás vizsgálatát a VEGAN csomagba foglalt *adonis2()* függvény segítségével végeztük. A PERMANOVA teszteknél a populációt (a populáció azonosítót) véletlenszerű tényezőnek tekintettük a permutációs blokk tervezésében és a tesztelés módszerének a „Terms” opció volt kiválasztva, ami egyenértékű a fő hatások I. típusú ANOVA tesztjeivel. Lineáris vegyes modelleket és statisztikai tesztelést alkalmaztunk az LME4 v1.1.27.1, LMERTEST 3.1.3, CAR v3.0.11 és LSMEANS v2.30.0 csomagokkal is (Bates és mtsai, 2015, Lenth 2016, Kuznetsova és mtsai, 2017, Fox and Weisberg 2019). A különböző indikátor fajokat a DESEQ2 v.1.32.0 csomag használatával számítottuk ki alapbeállításokkal és a következő tervezési képletet követve: „~szaporodási mód + faj + tápanyagterhelés + víztest típusa”. A baktériumokat akkor tekintettük differenciálisan diverznek, ha a korrigált p-érték kisebb, 0,05 volt és az olvasási számok többszörös változása legalább kétszeres volt (abszolút log<sub>2</sub>-szeres változás > 1). Az elemzés teljeskörű részletes leírása megtalálható Taubenheim és mtsai, (2022) közleményében.

### **2.4.3. Eredmények**

#### **Mikrobiológiai diverzitás a három különböző hidrafaj populációiban**

2019-ben 265 (minőségi szűrés után 251) hidrapolipból vettünk mintát, ami 20 különböző magyarországi és egy romániai populációból lett gyűjtve (**13. ábra**,

**4. táblázat).** A mintavétel során 12 holtágból, 1 tóból, 3 folyóból, 3 patakából és 3 csatornából vettünk mintát (**4. táblázat**) körülbelül 460 km-es földrajzi tartományon belül (**13. ábra**). Összességében három különböző együtt előforduló hydra fajból azonosítottunk polipokat: *Hydra oligactis*, *Hydra vulgaris* és *Hydra circumcincta*. Míg a *H. oligactis* 20 víztestben volt kimutatható, a *H. vulgaris* kilenc, a *H. circumcincta* pedig négy helyen volt jelen. A víztest trofikus állapotától függetlenül szinte minden mintavételezett élőhelyen a *H. oligactis* volt a domináns faj. Csak két tóban (M89 és M90) észleltük mindhárom faj egyenletes eloszlását.



**13. ábra** A mintavételi helyeket és a *Hydra* fajok arányát bemutató térkép. A kördiagramok az egyes víztestekben kimutatott fajok arányát mutatják, míg a különböző színek a különböző hydra fajokat jelzik.

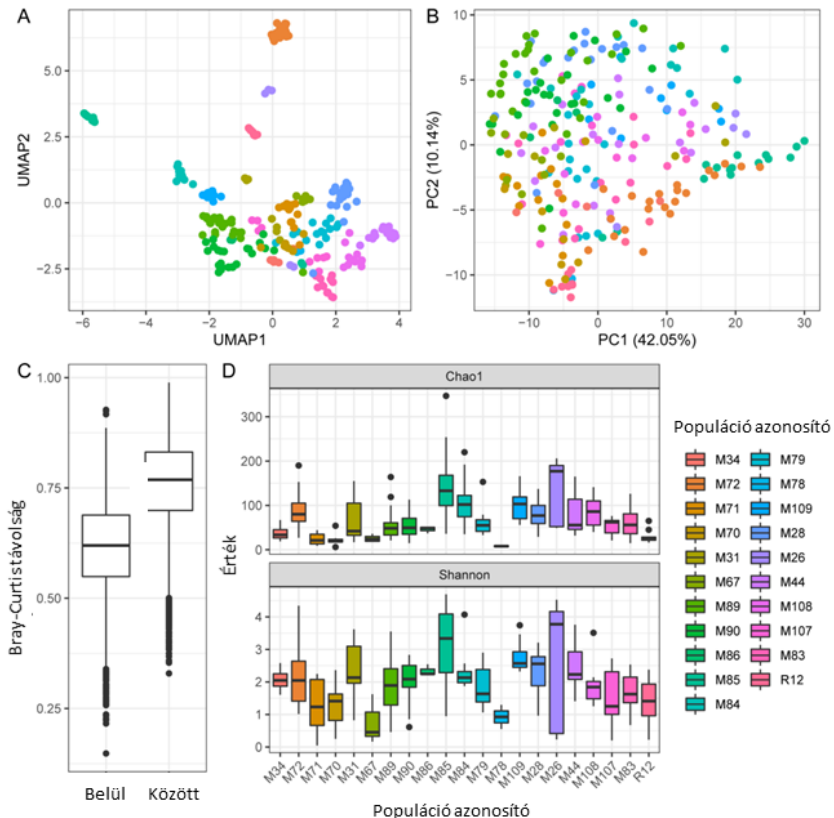
**4. táblázat** Azon víztestek elhelyezkedése, mintanagysága, típusa és trofikus állapota, amelyekből a hidrapolipokat gyűjtöttük.

Populáció azonosító	Mintaméret	Koordináták	Vízértípus	Kategória	Trofikus állapot
M26	9	47.58746 °N; 21.14895 °E	folyó	vízfolyás	hipertróf
M28	21	47.67119 °N; 20.86334 °E	holtág	állóvíz	eutróf
M31	7	47.04021 °N; 18.06975 °E	tó	állóvíz	eutróf
M34	6	46.76484 °N; 17.26994 °E	csatorna	vízfolyás	eutróf
M44	17	48.03405 °N; 21.07803 °E	holtág	állóvíz	hipertróf

M67	10	46.76848 °N; 18.61604 °E	folyó	vízfolyás	hipertróf
M70	8	46.77169 °N; 17.63603 °E	patak	vízfolyás	mezoeutróf
M71	15	46.75138 °N; 17.56861 °E	patak	vízfolyás	eutróf
M72	21	46.70316 °N; 17.38126 °E	csatorna	vízfolyás	hipertróf
M78	2	47.69665 °N; 20.68656 °E	patak	vízfolyás	mezoeutróf
M79	18	47.69032 °N; 20.74361 °E	csatorna	vízfolyás	hipertróf
M83	15	48.17484 °N; 21.61385 °E	holtág	állóvíz	eutróf
M84	15	47.26047 °N; 20.52008 °E	holtág	állóvíz	hipertróf
M85	15	47.17998 °N; 20.31362 °E	holtág	állóvíz	hipertróf
M86	3	47.14387 °N; 20.25956 °E	holtág	állóvíz	hipertróf
M89	28	46.85608 °N; 19.99031 °E	holtág	állóvíz	hipertróf
M90	25	46.82147 °N; 20.00077 °E	holtág	állóvíz	hipertróf
M107	10	48.17199 °N; 21.50517 °E	holtág	állóvíz	eutróf
M108	11	48.12438 °N; 21.44716 °E	holtág	állóvíz	eutróf
M109	10	47.68255 °N; 20.82135 °E	holtág	állóvíz	hipertróf
R12	10	47.88977 °N; 23.31119 °E	folyó	vízfolyás	mezoeutróf

Annak érdekében, hogy értékeljük a baktériumok megtelepedésének változatosságát a *Hydra*-ban, DNS-t vontunk ki az összes mintázás során gyűjtött *Hydra* polipból és összehasonlítottuk a hozzájuk kapcsolódó mikrobiótát 16S rRNS szekvenálással. A PC és UMAP klaszterezési elemzések kimutatták, hogy a mintavételezett *Hydra* polipok mikrobiális diverzitását főként az adott populáció azonosítója befolyásolja (**14A, B ábra, 5. táblázat**). Ez a Bray-Curtis távolságban is megmutatkozott, ahol a különböző víztestekből származó polipok lényegesen nagyobb eltéréseket mutatnak, mint az azonos víztestből származó polipok (**14C. ábra**). A béta-diverzitásbeli különbségek mellett a *Hydra*-polipokhoz kapcsolódó baktériumközösségek alfa-diverzitását a populációazonosság is jelentősen

befolyásolta (**14D ábra**). Érdekes módon a legszembevetőbb UMAP-klasztereződést (M26, M72, M85) mutató víztestekből származó minták mutatták a legnagyobb baktériumdiverzitást a chao 1 és Shannon index alapján (**14D. ábra**).



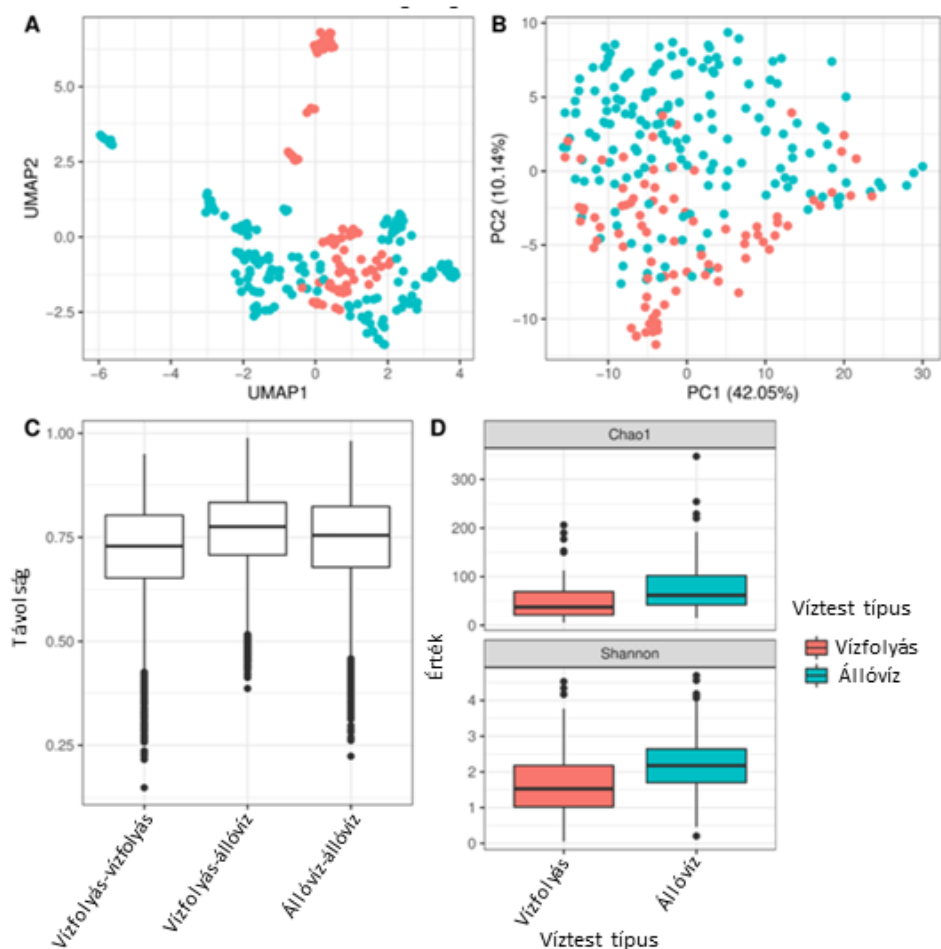
**14. ábra** A populációazonosság hatása a baktériumok kolonizációjára *Hydra*-ban. Az UMAP (A) és a  $\beta$ -diverzitás PC-analízise (B) (Bray-Curtis) a minták populációnkénti, így környezeti feltételek szerinti elválasztását mutatja. A mikrobiális közösségek populációnkénti elkülönítését az Adonis-teszt támasztja alá ( $R^2 = 0,41$ ,  $p \leq 0,001\ 999$  permutációval). A Bray-Curtis (C) távolságok egy populáción belül általában kisebbek, mint a populációk közötti különbségek. Ezenkívül a populáció azonosító az alfa-diverzitás (D) fő meghatározója (lineáris modell a Shannon-indexen,  $p \leq 0,001$ ).

**5. táblázat** A *Hydra* baktériumdiverzitását befolyásoló gazda- és környezeti tényezők statisztikai elemzése PERMANOVA elemzés alapján.

Változók	Többváltozós PERMANOVA			Egyváltozós PERMANOVA		
	R <sup>2</sup>	F	p-érték	R <sup>2</sup>	F	p-érték
Populáció azonosító	0.41	7.99	<0.001	N/A	N/A	N/A
Víztesttípus	0.04	10.64	<0.001	0.03	9,04	0.0001
Trofikus állapot	0.05	7,05	<0.001	0.04	6,16	0.2570
Faj	0.04	5.46	<0.001	0.04	5.84	0.0001
Szaporodás	0.01	1.78	0.0012	0.01	1.72	0.2848

### **Környezeti tényezők hatása a baktériumok diverzitásra a különböző *Hydra* fajok esetében**

Tekintettel arra, hogy a populációazonosság volt a legfontosabb tényező, amely magyarázza a baktériumok diverzitásának különbségeit, a továbbiakban elemeztünk a két környezeti tényezőt (a „víztest típusa” és a „trofikus állapot”) hatásait hidrapolipokhoz kapcsolódó bakteriális diverzitás magyarázatához (**4. táblázat**). A 21 különböző víztestet két különböző kategóriába soroltuk: vízfolyások (folyók, patakok és csatornák) és állóvizek (tavak és holtágak; **4. táblázat**). Ennek a faktornak a hidrákon élő baktériumdiverzitáshoz való hozzájárulásának tesztelése szignifikáns összefüggést mutatott ki (**15. ábra, 5. táblázat**), amely a bakteriális variációk körülbelül 4%-át magyarázta. Érdekes módon a Bray-Curtis távolságok a vízfolyások között voltak a legkisebbek, míg a csak állóvizek, illetve a vízfolyások és az állóvizek között nagyobbak voltak (**15C. ábra**). Ez azt jelzi, hogy a *Hydra*-k mikrobiótájának diverzitása korlátozottabb volt a vízfolyásokban, mint az állóvizekben. Ezt az eredményt alátámasztja, hogy a vízfolyásokban élő polipok, mint például a folyók és a patakok, lényegesen alacsonyabb bakteriális  $\alpha$ -diverzitást mutatnak, mint az álló vízben élő polipok (**15D. ábra**). Az vízfolyásokban élő hidra polipokon gyakrabban előforduló bakteriális taxonok a Sphingobacteriaceae, Myxobacteria és Pseudomonadales családba tartoznak, míg a Betaproteobacteriumok inkább az állóvízben élő hidra polipokon voltak dominánsak.



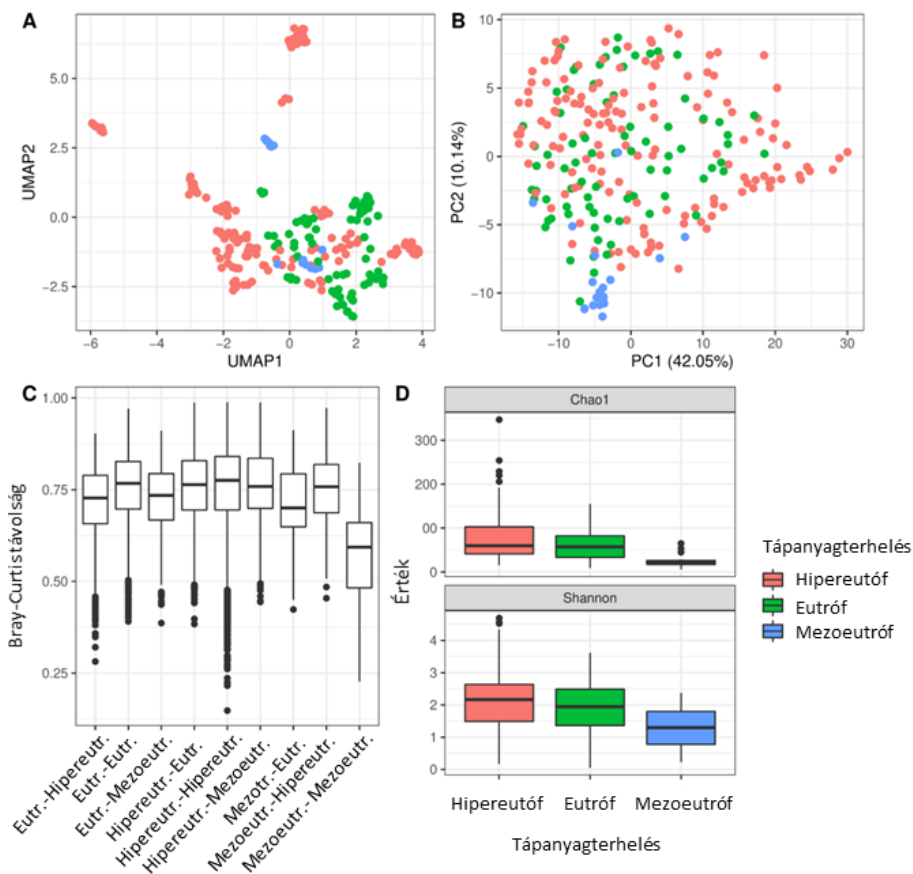
**15. ábra** A víztest típusának hatása a baktériumok kolonizációjára a *Hydra* esetében. Az UMAP (A) és még egyértelműbben a  $\beta$ -diverzitás PC-analízise (B) (Bray-Curtis) a minták víztesttípus szerinti elkülönítését mutatja. A mikrobiális közösségek szétválasztását a PERMANOVA teszt támogatja ( $R^2 = 0,04$ ,  $p \leq 0,001$  és  $R^2 = 0,03$ ,  $p \leq 0,001$ , 999 permutációval egy- és többváltozós PERMANOVA esetén). A Bray-Curtis (C) eltérések az áramló víztestek között a legkisebbek, míg a csak álló, illetve a folyó és az álló víztestek között nagyobbak az eltérések. Ezt az eredményt alátámasztja, hogy az  $\alpha$ -diverzitás lényegesen kisebb a vízfolyásokban, mint az állóvizekben a chao 1 (D) és Shannon (E)  $\alpha$ -diverzitási mérőszámok esetében (egyváltozós lineáris modell:  $p \leq 0,001$ , többváltozós lineáris vegyes modell Shannon-indexen populációazonosítóval, mint véletlenszerű hatással  $p \leq 0,001$ ).

Az élőhelytípuson túlmenően a különböző mintavételi helyeket trofikus állapotuk szerint mezoeutróf, eutróf és hipereutróf vizekbe is besoroltuk (**4. táblázat, 16. ábra**). A különböző trofikus szintű környezetekből gyűjtött *Hydra* polipok bakteriális diverzitásának összehasonlítása szignifikáns klasztereződést mutatott, ha a faktort egyedileg vizsgáltuk (**5. táblázat, 16A,**

**B. ábra).** Konkrétan, a mezoeutróf víztestekből származó, hidrával asszociált baktériumközösségek lényegesen kevésbé változatosak voltak, mint az eu- vagy hipereutróf víztestekben élő hidrapolipokhoz kapcsolódó baktériumközösségek (**16D. ábra**). Ezt a különbséget az is bizonyítja, hogy a mezoeutróf élőhelyen élő *Hydra* polipokból származó baktériumközösségek jobban hasonlítottak egymásra, mint az eu- vagy hipertróf élőhelyeken élő polipokból származó baktériumközösségekre (**16C. ábra**). Az indikátorelemzés kimutatta, hogy a Campylobacterales és Cytophagales csoportokba tartozó baktériumok kifejezetten mezoeutróf élőhelyeken élő polipokon voltak nagy mennyiségben jelen. A statisztikai különbség azonban elveszett, ha a trofikus szintet többváltozós modellekkel teszteltük (**5. táblázat, 6. táblázat**), ami azt jelzi, hogy a tápanyagterhelés hatása csak kis mértékben járult hozzá a baktériumok sokféleségéhez. A bakteriális diverzitás magyarázó ereje valószínűleg a víztesttípuson belül van kódolva (vízfolyás vagy állóvíz), ahol a tényezők között a legmagasabb korrelációt észleltük.

**6. táblázat** A *Hydra* társult baktériumainak diverzitását meghatározó biotikus és abiotikus tényezők statisztikai elemzése, lineáris modellek alapján.

Változók	Egyváltozós lineáris modell			Többváltozós lineáris modell	
	R <sup>2</sup>	F	p-érték	X <sup>2</sup>	p-érték
Populáció azonosító	0.343	6.013	5.4E-12	N/A	N/A
Vízterítípus	0.085	23.205	6.3E-6	7.148	0.008
Trofikus állapot	0.070	9.355	0.2E-4	4.385	0.112
Faj	0.021	2.673	0.089	19.014	7.4E-5
Szaporodás	0.001	0.172	0.842	9.892	0.007

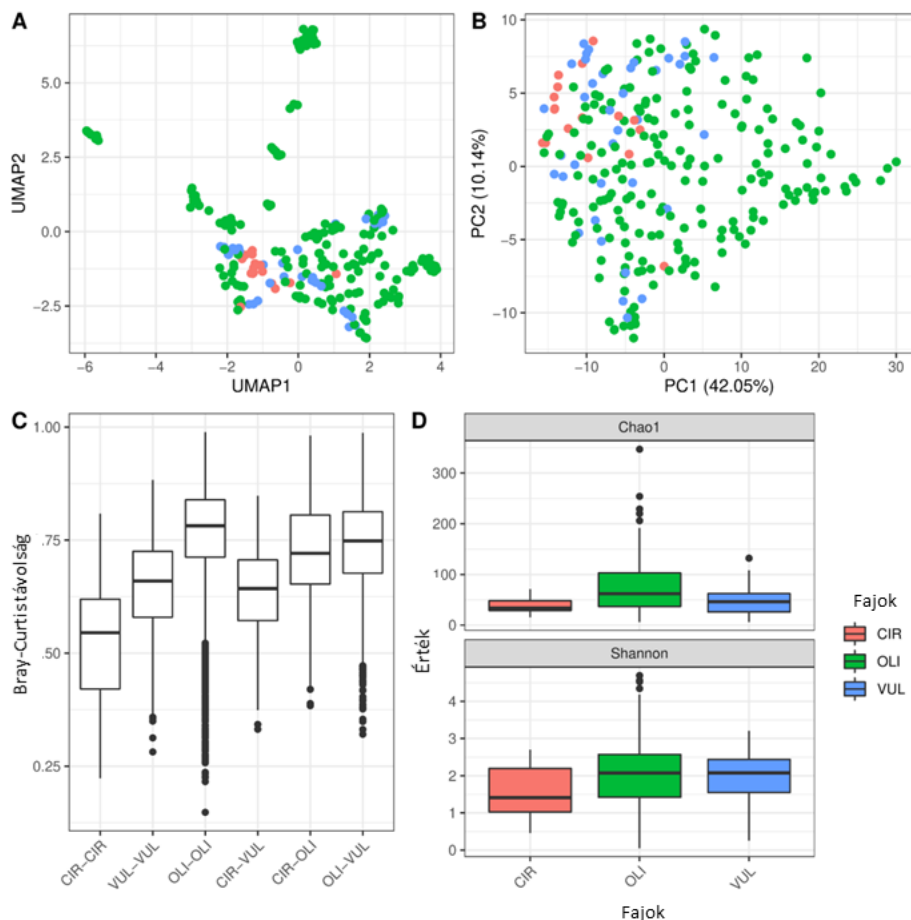


**16. ábra** A víztest trofikus állapotának hatása a baktériumok megtelepedésére *Hydra* esetében. A  $\beta$ -diverzitás UMAP (A) és PC ordinációja (B) (Bray-Curtis) a minták elválását mutatják a víztest trofikus állapota szerint. A mikrobiális közösségek trofikus állapot szerinti elválását támogatja az egyváltozós PERMANOVA ( $R^2 = 0,05$ ,  $p \leq 0,001$  999 permutációval, de nem a többváltozós PERMANOVA ( $R^2 = 0,04$ ,  $p = 0,2570$ , véletlenszerű hatások szerint 999 populáció azonosító és minden más tényező, mint kofaktor). A Bray-Curtis távolság (C) a mezoetróf víztestek között a legkisebbek, míg az összes többi trofikus állapotpár között nagyobbak. Ez azt jelzi, hogy a *Hydra* mikrobiótájának diverzitása korlátozottabb a mezoetróf víztestekben, mint többi csoportban. Ezen eredmény alátámasztására az  $\alpha$ -diverzitás szignifikánsan kisebb a mezoetróf víztestekben, mint az eutróf és hiperetróf víztestekben (D) az egyváltozós lineáris modellekben ( $R^2 = 0,070$ ,  $p \leq 0,2E-4$ , Shannon index alapján). A többváltozós modellek azonban nem támasztják alá a trofikus állapot hatását a baktériumok diverzitására (lineáris vegyes modell Shannon-indexen, populáció, mint véletlenszerű hatás, minden más tényező kofaktor,  $X^2 = 4,385$ ,  $p = 0,112$ ).

### A gazdafaj hatása a baktériumok kolonizációjára a *Hydra*-ban

A környezeti tényezők mellett a gazdafaj is magyarázta a különböző hidrapolipokhoz kapcsolódó 4%-os baktériumdiverzitás-variációt (5. táblázat). Míg a *H. oligactis* egyedeken élő baktériumközösségek csak gyenge

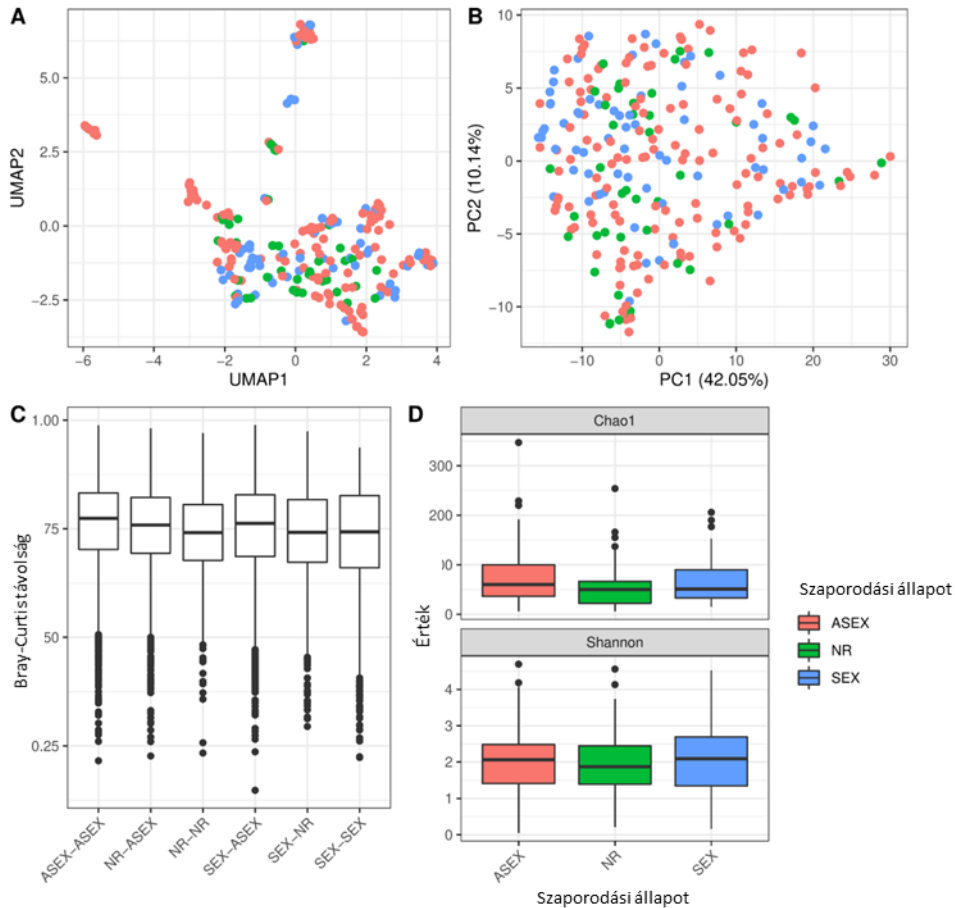
klasztereződést mutattak, a *H. circumcincta* egyedeken előforduló bakteriális diverzitás nagyon eltérő volt (**17A, B ábra**). Ezt az is bizonyítja, hogy a Bray-Curtis elemzésen belül a *H. circumcincta* baktérium közösségének távolsága volt a legkisebb, ezt követte a *H. vulgaris* (**17C. ábra**). A *H. oligactis* egyedeken élő baktériumközösségek belső távolságai mutatták a legnagyobb távolságokat, ami a bakteriális asszociációk kevésbé korlátozott sokféleségét jelzi. Hasonló tendenciát mutatott a *H. oligactis* magasabb alfa-diverzitása a *H. circumcincta* és a *H. vulgaris* mikrobiotájához képest (**17D. ábra**), amit a statisztika elemzés is alátámasztott, ha a környezeti kofaktorok elemzésével korrigáltunk (**6. táblázat**). Hasonló hatások voltak megfigyelhetők, ha egyetlen populációból származó mintákat külön elemeztünk, hogy a hatást környezetileg hasonló körülmények között teszteljük. PERMANOVA analízist végeztünk az M89 és M90 populációban a fajok hatásának meghatározására és a  $\beta$ -diverzitás esetében szoros összefüggését találtunk vele, ami a variabilitást 23%-át magyarázta meg. Ezenkívül hasonló tendenciát figyeltünk meg a *H. oligactis* esetében is a magasabb Shannon-indexekkel való összefüggésében, de statisztikai szignifikanciát csak az M90 populáció esetében találtunk. A *H. oligactis*-t gyakrabban kolonizáló bakteriális taxonok a Bacteroidiákhoz tartoztak, míg a *H. circumcincta* gyakrabban társult a Rickettsialeshez. Érdekes módon a legtöbb baktérium, amely kifejezetten a három faj közül csak az egyikhez kapcsolódott (indikátorfaj), a Betaproteobacteria-hoz tartozott.



**17. ábra** A gazdafajok hatása a mikrobiális diverzitásra a *Hydra* esetében. Az UMAP (A) és PCA (B) ordinációs parcellák a Bray-Curtis távolság a minták fajok szerinti mérsékelt csoportosulását mutatják. A klasztereződést a Bray-Curtis-féle távolságok PERMANOVA általi tesztelése támogatja ( $R^2 = 0,04$ ,  $p \leq 0,001$  999 permutációval, egy- és többváltozós modellekkel). A Bray-Curtis távolságokra vonatkozó boxplot (C) a  $\beta$ -diverzitás csökkenését mutatja a *H. circumcincta* mintákon belül a többihez képest, míg úgy tűnik, hogy a *H. oligactis* rendelkezik a legnagyobb eltérésekkel egy fajon belül, ami azt jelzi, hogy a *H. oligactis* képes változatosabb mikrobiális közösség fenntartására, mint a többi faj. A *H. circumcincta* és a *H. vulgaris* közötti különbség általában kisebb, mint a többi fajtár között, ami azt jelzi, hogy a két faj között hasonlóbb mikrobiális közösségek alakultak ki. Az  $\alpha$ -diverzitást hasonlóképpen befolyásolja a gazdafaj ( $p = 0,089$  és  $p \leq 0,001$  az egyváltozós lineáris modellnél, illetve többváltozós lineáris vegyes modellnél). A *H. circumcincta* mutatta a legalacsonyabb  $\alpha$ -diverzitást, amely szintén szignifikánsan eltér a többi fajtól.

Ezen kívül megvizsgáltuk a polipok szaporodási állapotát és azt, hogy ez befolyásolja-e a mikrobiális diverzitást. A szaporodó állapotokat az ivarmirigyek jelenléte (ivaros), a bimbók jelenléte (ivartalan) vagy mindkettő hiánya (nem szaporodó) szerint osztályoztuk. Általánosságban elmondható, hogy a szaporodási állapotnak csak csekély hatásai voltak, amelyek tükröződtek a

mikrobiális közösségben. Sem az UMAP, sem a PCA szaporodási mód szerinti klasztereződés nem volt egyértelműen látható (**18A, B ábra**) és a Bray-Curtis távolságok valamivel kisebbek voltak a nem szaporodó állatokon belül, mint az összes többi párosításnál (**18C. ábra**). Ez a kis hatás kimutatható volt az egyváltozós PERMANOVA modellben ( $p = 0,0012$ , **2. táblázat**), míg a többváltozós PERMANOVA modellben már nem ( $p = 0,2848$ , **2. táblázat**), ami azt jelzi, hogy a más tényezőkkel való összefüggések fontosabbak voltak a kis különbségek magyarázatához (pl. fajhozzárendelés). Hasonlóképpen, a szaporodási módnak csak csekély hatásait figyeltük meg az  $\alpha$ -diverzitásra (**18D. ábra**), ahol nem találtunk támogatást az egyváltozós lineáris modellben a Shannon-indexen ( $p = 0,842$ , **3. táblázat**). Érdekes módon kimutatható különbség volt a szaporodáshoz rendelt  $\alpha$ -diverzitásban a többváltozós lineáris vegyes modellünkben ( $p = 0,007$ , **3. táblázat**), amelyet az ivaros és ivartalan állatok közötti különbség vezérelt. Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -diverzitás különbségeinek vizsgálata az M89-es és M90-es populációkban nem mutatott ki szignifikáns összefüggést a szaporodási módok és diverzitási mutatók között, kivéve az egyváltozós PERMANOVA-t az M89 populációban. Ezt a különbséget főként a fajok közötti különbségek okozták, amelyek ebben az esetben tökéletes kollinearitást mutattak a *H. circumcincta* fajazonosság és az ivaros szaporodás között. A szaporodási módok közötti bakteriális összetétel nagyon hasonló volt, alig észrevehető különbségekkel a Betaproteobaktériumok megjelenésében a nem szaporodó állatokban, míg a Rickettsialák valamivel nagyobb abundanciával társultak az ivaros polipokhoz, összehasonlítva a többi állapottal. Ennek megfelelően csak néhány indikátorfajt azonosítottunk és ezek többsége a Betaproteobaktériumokhoz tartozik.

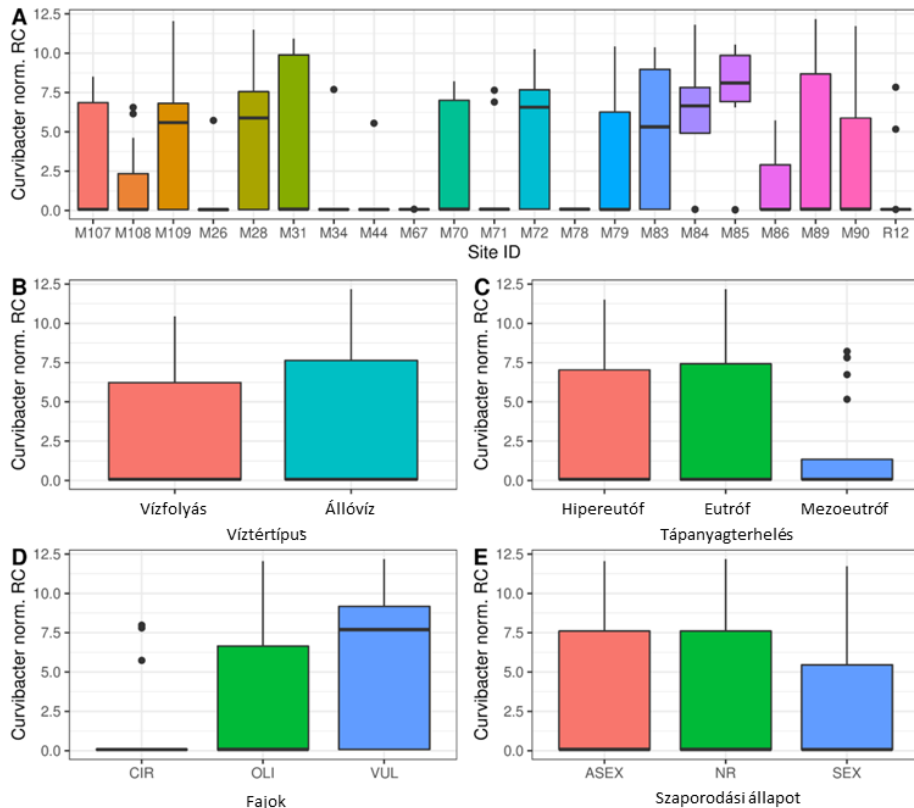


**18. ábra** A szaporodási mód hatása a mikrobiális diverzitásra a *Hydra* esetében. A Bray-Curtis eltérésre vonatkozó UMAP (A) és PCA (B) ordinációs diagramok nem mutatják a minták csoportosulását szaporodás módja szerint. Az egyváltozós PERMANOVA azonban a szaporodási mód szignifikáns hatását találta a  $\beta$ -diverzitásra ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = 0,0012$ , 999 permutáció). A többváltozós PERMANOVA-eredmények azonban nem támasztják alá a Bray-Curtis-féle távolságok szaporodási állapot miatti különbségek statisztikai hatását ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = 0,2848$ , 999 permutáció). Hasonlóképpen, a Bray-Curtis távolság (C) boxplotja nem mutat jelentős különbséget a szaporodási állapotok különböző párhoz között. Az  $\alpha$ -diverzitást azonban befolyásolja a szaporodási állapot egy többváltozós lineáris vegyes modellben ( $p = 0,007$ ), de ezt a hatást az egyváltozós lineáris modellek nem támasztják alá ( $p = 0,842$ ).

### A *Curvibacter*-ek mennyisége a gyűjtött *Hydra* polipokban

A *Curvibacter* a baktériumok egyik legerjedtebb csoportja, amely a laboratóriumi körülmények között a *Hydra* polipokat kolonizálja (Franzenburg et al 2013). Míg a *Curvibacter* a legtöbb mintavételezett *Hydra*-populációban kimutatható volt (**19A ábra**), ennek a baktériumcsoportnak az abundanciája sokkal alacsonyabb volt, mint a laboratóriumban tartott polipok esetében. Érdekes módon a *Curvibacter* fajok jelenléte erősen eltér a különböző

hidrapopulációkon belül (**19A. ábra**), de nem a vizsgált környezeti tényezők: a víztest típusa és tápanyagterhelése mentén (**19B, C ábra**). A *Curvibacter* általános megoszlása a különböző *Hydra* fajok között összhangban volt a korábbi laboratóriumi kísérletek eredményeivel (Franzenburg és mtsai, 2013), ahol a *H. vulgaris* nagyobb *Curvibacter* kolonizációt mutatott (**19D. ábra**). Úgy tűnt, hogy a szaporodási mód csekély mértékben befolyásolja csak a *Curvibacter* kolonizáció mértékét, mivel az ivarosn szaporodó polipok mikrobiális közösségében csak kicsit volt alacsonyabb a *Curvibacter*-ek mennyisége (**19E. ábra**).



**19. ábra** A *Curvibacter*, a *Hydra* laboratóriumi törzseinek fő kolonizálójá, következetesen megtalálható a természetes populációkban élő *Hydra*-mintákban. A *Curvibacter* fajok jelenléte a különböző mintavételi helyek környezeti viszonyaitól függ (A) (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ). A víz tápanyagterhelése (B) és a víztér típusa (C) azonban nincs szignifikáns hatással a kolonizáló *Curvibacter* mennyiségére (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). A *H. vulgaris* polipok nagyobb arányban mutatják a *Curvibacter*-ek kolonizációt (D) (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ). Úgy tűnik, hogy a szaporodási állapot csekély mértékben befolyásolja a *Curvibacter* kolonizáció mértékét (E) (Kruskal-Wallis,  $p < 0,002$ ). CIR - *H. circumcincta*, OLI - *H. oligactis*, VUL - *H. vulgaris*, ASEX - ivartalanul szaporodó egyedek, NR - nem szaporodó egyedek, SEX - ivarosn szaporodó egyedek.

#### 2.4.4. Diszkusszió

Ebben a tanulmányban közép-európai víztestekben élő édesvízi hidra fajokban (*Hydra oligactis*, *H. vulgaris* és *H. circumcincta*) vizsgáltuk a gazdaszervezethez tartozó baktériumok taxonómiai diverzitásának változásával összefüggő tényezőket. Megállapítottuk, hogy: először is, a *Hydra* populációk jelentősen különböztek a baktériumok összetételében és a populáció azonossága a mikrobiális  $\alpha$ - és  $\beta$ -diverzitás legfontosabb tényezője. Másodsor, az élőhely típusa magyarázza a baktériumok diverzitásának különbségeit. Harmadszor, szignifikáns különbségeket észleltünk a baktériumok diverzitásában a gazdafajok között (a legkevésbé változatos a *H. circumcincta*-ban volt). Negyedszer, a szaporodási mód (ivaros vs. ivartalan) esetében nem találtunk erős hatást a bakteriális összetételre.

Az adott populáció azonosság a legfontosabb tényezőnek bizonyult, amely megmagyarázza a *Hydra*-gazdszervezetekhez kapcsolódó baktériumok közösségének sokféleségét. Ez a megfigyelés némileg meglepő, tekintettel arra, hogy a mintavétel földrajzi kiterjedése nem volt túl nagy (a legtávolabbi populációk között is csak kb. 460 km volt) és a mintavételi helyek többnyire hasonló élőhelytípusok (alföldi víztestek) voltak. Ezenkívül ismert, hogy a *Hydra* különálló és nagyon specifikus mikrobafajokat tartalmaz (Fraune és Bosch 2007, Franzenburg és mtsai 2013; ez a tanulmány), amelyek részben vertikálisan terjednek át a szülőkről az utódokra (Fraune és mtsai, 2010), ami arra utalhat, hogy a mikrobióta összetétele generációkon át öröklődik, nem pedig a környezetből származik. Mindazonáltal úgy tűnik, hogy a különböző élőhelyekre jellemző mikrobiális közösségek átmenetileg kolonizálják a hidrákat, ami végül hosszú távú asszociációkat eredményezhet a baktériumokkal, amelyek vagy hozzáadódnak a gazdaspecifikus mikrobákhoz, vagy helyettesítik azokat. Például, ha funkcionálisan hasonló, de taxonómiailag eltérő baktériumok vannak jelen különböző élőhelyeken, akkor a *Hydra* egyedek taxonómiailag eltérő, de funkcionálisan nagyon hasonló mikrobaközösségekhez juthatnak. A mikrobiális összetételben az eredményeinkhez hasonló populáció-specifikus változást vízi gerinceseknél is leírtak már és az egymással összefüggő környezeti feltételek, például hőmérséklet, földrajzi helyzet, vízminőség és kémia változásának eredményeként magyarázták, amelyek befolyásolják a helyi mikrobiális közösségek összetételét és így végső soron a gazdaszervezethez kötődő mikrobákat (áttekintése: Sehnaal és mtsai, 2021).

Ezenkívül a populációnak a mikrobiális sokféleségre gyakorolt hatása tovább fokozódhat a gazdaszervezet genetikai differenciálódása révén (például a populációk közötti korlátozott génáramlás miatt). Ha a gazdapopuláció

izolálódik, akkor az eredeti mikrobiális összetételük is differenciálódhat a mikrobiális taxonok sztochasztikus elvesztése és növekedése, illetve a gazdaszervezet genetikai és immunitásbeli adaptív különbségei miatt (Chaston és mtsai 2016, Glasl és mtsai, 2019). Ebben az esetben a mikrobiális összetételben és diverzitásban mutatkozó populációs különbségek a gazdaszervezet evolúciós történetét és populációszerkezetét tükrözhetik. Bár jelenleg nem tudjuk teljesen kizárni ezt a lehetőséget, egy korábbi *H. oligactis*-on végzett populációgenetikai vizsgálatunk alapján csak igen korlátozott térbeli genetikai strukturáltság volt megfigyelhető néhány, ebben a vizsgálatban is mintavételezett populációban (Miklós és mtsai, 2021). Ezért valószínűtlennek tartjuk, hogy a populáció szerkezete vagy a gazdaszervezet genotípusának különbségei magyarázzák a mikrobiális diverzitás populáció függőségét.

Azt is meg kell jegyeznünk, hogy az ebben a tanulmányban kimutatott gazdaszervezethez kapcsolódó baktériumok sokfélesége olyan taxonok jelenlétéből eredhet, amelyek csak átmenetileg kapcsolódnak a gazdaszervezethez. Például, ha lokálisan jelenlévő bakteriális taxonok (amelyek a vízben, a szubsztrátumokon, amelyekhez a polipok kötődnek, vagy az általuk fogyasztott táplálékban találhatóak) megtelepednek a polipok felszínén vagy talpkorongján, esetleg felhalmozódnak a gasztrális üregükben. Ezt a lehetőséget a jövőben laboratóriumi vizsgálatokkal lehetne felderíteni, pl. különböző helyekről mintavételezett polipokat hasonló körülmények között (azonos közegben és táplálékon) tartva, majd megvizsgálva, hogy az azonos környezeti feltételek mellett fennmaradnak-e a mikrobaközösségükben mutatkozó különbségek. Az ilyen átmenetileg asszociált taxonok azonban nem magyarázhatják meg a tanulmányban megfigyelt faji különbségeket, mivel a különböző fajokhoz tartozó polipokat gyakran ugyanabból a populációból gyűjtöttük (lásd alább). Továbbá, bár az átmenetileg asszociált mikrobiális taxonokat gyakran nem tekintik fontosnak és a legtöbb tanulmány az úgynevezett „mag” mikrobiális közösségre összpontosít, a legújabb kutatások azt mutatják, hogy az ilyen átmenetileg asszociált mikrobiális fajok erősen befolyásolhatják a gazdaszervezetet (Amor és mtsai, 2020). Éppen ezért az általunk megfigyelt populációs különbségek a mikrobiális diverzitásban fontos funkcionális következményekkel járhatnak a gazdaszervezet számára, bár ezt az elképzelést a jövőben kísérletileg is tisztázni kell.

Tekintettel arra, hogy a mintavételi hely identitása olyan fontos hatással volt a mikrobiális diverzitásra, mi lehet ezeknek a különbségeknek a hajtóereje? A különböző élőhelytípusokból gyűjtött *Hydra* polipok mikrobiális diverzitását összehasonlítva azt találtuk, hogy a trofikus szint és a víztest típusa (azaz állóvíz vs. vízfolyás) szignifikánsan befolyásolta a mikrobiális diverzitást az

előrejelző modelljeinkben, így az vízfolyások és/vagy alacsonyabb trofitású élőhelyek csökkentették a hidrák mikrobiális diverzitását. Ez arra utal, hogy az élőhely fizikai tulajdonságai vagy az eutróf/hipertróf víztestek magasabb tápanyagtartalma megváltoztathatja a gazdaszervezethez kapcsolódó baktériumok sokféleségét, például azáltal, hogy befolyásolják az ezeken az élőhelyeken jelen lévő és az ott élő állatokat kolonizálni képes baktérium taxonok számát és metabolikus funkciójuk sokféleségét (Dickerson és Williams 2014, Kiersztyn és mtsai, 2019). Hasonló megfigyeléseket végeztek korábban kísérletileg módosított tápanyagterhelés mellett is, pl. korallokban (Jessen és mtsai, 2013, Shaver és mtsai, 2017). Meg kell azonban említenünk, hogy adataink alapján nehéz egyértelműen felismerni a különböző élőhelyi jellemzők szerepét a mikrobiális diverzitás előmozdításában, mivel a két kategorizálás (egyrészt trofikus szint, másrészt állóvíz vs. vízfolyás) korrelál egymással, egyes esetekben a faktorszintek teljes elkülönülésével (pl. minden mezoeutróf élőhely a vízfolyás kategóriába tartozott). Ezért a jövőbeli vizsgálatokhoz kiegyensúlyozottabb mintavételre lesz szükség a különböző élőhelytípusokból, hogy egyértelműen meg lehessen állapítani, hogy az élőhely, mely jellemzői befolyásolják a mikrobiális sokféleséget. Másrészt figyelemre méltó, hogy a magyarázható diverzitás a  $\beta$ -diverzitásban a víztest típusára és a trofikus állapotra vonatkozóan alacsony (4%, illetve 3%) a populációhoz rendelhető változékonysághoz (41%) képest, ami azt jelzi, hogy az általunk értékelteken kívül más környezeti tényezők is hozzájárulnak a mikrobióta felhalmozódásához a *Hydra*-ban. Tekintettel arra, hogy a víztest trofikus szintjei nagy hatással vannak a szabadon élő baktériumok sokféleségére (Dickerson és Williams 2014, Kiersztyn és mtsai, 2019), úgy tűnik, hogy ez kevésbé lényeges a *Hydra*-hoz kapcsolódó baktériumok számára. Lehetnek élőhely-specifikus *Bdellovibrio* baktériumok és hasonló organizmusok (BALO-k), amelyek a diverzitás változásának egy részét magyarázhatják. A BALO-kat ragadozó baktériumokként írták le, amelyek más Gram-negatív baktériumokkal táplálkoznak (Sockett, 2009) és összefüggésbe hozták a baktériumok sokféleségének növekedésével, ha jelen vannak a különböző metazoák mikrobiális közösségében (Johnke és mtsai, 2019). A BALO-k abundanciájában és fajprevalenciájában mutatkozó különbségek a vizsgált élőhelyeken így hozzájárulhatnak a megfigyelt diverzitásbeli különbségekhez.

Azt is megállapítottuk, hogy a mikrobiális diverzitást a gazdafajok jelentősen befolyásolták, még a populációra való kontrollálás után is, ami arra utal, hogy a fajok közötti különbségek konzisztensek. A vizsgálatunkban szereplő három különálló fajhoz tartozó polipok gyakran együtt fordultak elő, néha fizikailag nagyon közel egymáshoz, akár ugyanazon a szubsztrátdarabon. Ezért az eltérő mikrobiótájuk nagy valószínűséggel fajspecifikus gazda-mikróba társulások

eredménye. A specifikus mikrobiális taxonok és a gazdaszervezetek közötti hasonló konzisztens asszociációs mintázatokat számos állatcsoportban leírták már, a szivacsoktól az emlősökig (Yildirim és mtsai 2010, Lee és mtsai 2011, Carlos és mtsai 2013, Brooks és mtsai, 2016, Youngblut és mtsai, 2019) és gyakran nyilvánvalóak az együtt élő vízi állatfajokban (Sehnal és mtsai, 2021). A fajspecifikus mikrobiális összetételt korábban a *Hydra* esetében is leírták már (Fraune és Bosch 2007, Franzenburg és mtsai, 2013). Megfigyeléseink megerősítik Fraune és Bosch (2007) megfigyeléseit a nagyobb mintaméret és a szélesebb földrajzi hatókör tekintetében, amely így több hidrapopulációt is magába foglalt.

Bár szignifikáns különbségeket észleltünk a gazdafajok között, a fajok közötti eltérések viszonylag kicsik voltak (alacsonyabbak, mint a populációk közötti eltérések). A három faj közül a legkisebb mikrobiális diverzitás a *H. circumcincta* esetében, a legnagyobb a *H. oligactis* esetében volt megfigyelhető. Ezenkívül azt találtuk, hogy a *H. circumcincta* mikrobiális összetétele konzisztensebb volt a másik két fajhoz képest. Ez a faj filogenetikailag a legkülönbözőbb a három közül (Schwentner és Bosch 2015) és biológiailag is különbözik a többitől (pl. szimultán hermafrodita; Reisa 1973), ami lehetséges magyarázatot kínál eltérő mikrobiótájukra. A viszonylag alacsony fajok közötti eltérések megfigyelése egy közelmúltbeli tanulmányt tükröz, amely korlátozott differenciálódást talált a taxonómiailag változatos, de együtt létező édesvízi zooplankton szervezetek mikrobiotája között (Eckert és mtsai, 2021). Érdekes módon, míg egyes populációkban a három *Hydra* faj világosan differenciált mikrobiom összetételt mutatott, más esetekben nem volt ilyen különbség, ami arra utal, hogy a gazdafajok és a mintavételi hely közötti kölcsönhatás magyarázatot adhat a mikrobiális diverzitás eltéréseire a *Hydra*-ban. Mivel ebben a vizsgálatban a *H. oligactis* volt a legelterjedtebb faj, a nagyobb mikrobiális diverzitása a változatosabb környezetnek való kitettség eredménye lehet. Alternatív magyarázatként az ellenkezője is igaz lehet, vagyis a változatosabb mikrobióta nagyobb alkalmazkodóképességet és kolonizációs képességet biztosít a gazdának a változatosabb élőhelyeken (Voolstra és Ziegler 2020). Ismét meg kell jegyeznünk, hogy a fajok hatása az  $\alpha$ - és  $\beta$ -diverzitásra kicsi a populációk hatásához képest. Ebből arra a következtetésre juthatunk, hogy a fajspecifikus különbségek nagyon erősek, de környezetfüggő kontextusban valósulnak meg – ami végül is a mikrobiális diverzitás fő prediktora a *Hydra*-hoz kapcsolódó baktérium közösségek esetében. Azonban még ha a fajok közötti különbségek kicsik is, funkcionálisan fontosak lehetnek. Például a *Hydra*-kal végzett laboratóriumi kísérletekben az egyes bakteriális taxonok fontos fitness előnyöket biztosíthatnak a gazdaszervezet számára (Fraune és mtsai, 2015, Taubenheim és mtsai, 2020).

A mintavételi helyhez és a gazdafaj azonosságához képest a *Hydra* polipok szaporodási állapota kevésbé tűnt fontosnak a mikrobiális diverzitás meghatározásában. Szignifikáns különbséget vártunk az ivaros és ivartalan polipok között, mivel az ivaros egyedek fiziológiája jelentősen eltér az ivartalanokétól. Ezt a különbséget az  $\alpha$ -diverzitásban egy többváltozós modellben észleltük az összes többi kovariáns figyelembevételével, ez a különbség nagyon gyenge volt, ami azt jelzi, hogy a szaporodási mód csak marginális hatással van a mikrobiális közösségre. A *H. oligactis* esetében az ivaros szaporodás a csökkent regenerációs képességgel, a szomatikus őssejtek, a táplálékfelvételben részt vevő nematociták és az idegsejtek kimerülésével, valamint a mortalitási kockázat növekedésével jár (Yoshida és mtsai, 2006, Sebestyén és mtsai, 2018, Tomczyk és mtsai, 2020, Ngo és mtsai, 2021). A *Hydra* idegsejtjei kiemelkedően részt vesznek a mikroba közösség összetételét alakító antimikrobiális peptidok előállításában (Augustin és mtsai, 2017), ezért elvesztésük várhatóan hatással lesz a mikrobiális összetételre. Ezenkívül a fejlődő petékkel ivarosán szaporodó *Hydra* jelentősen megnövekedett a periculin antimikrobiális peptid expressziót mutat, amely aktívan alakítja a fejlődő embrió mikrobiális összetételét, miközben az még a szülőállathoz kötődik (Fraune és mtsai, 2010). Végül egy korábbi vizsgálat lényeges különbségeket mutatott ki a *Potamopyrgus antipodarum* csiga ivaros és ivartalan egyedei között (Takacs-Vesbach és mtsai, 2016). Mindazonáltal csak csekély eltérést találtunk az ivartalan és ivaros *Hydra* polipok mikrobiális diverzitásában, ami azt jelzi, hogy a fent leírt fiziológiai változások csak korlátozott hatással vannak a teljes mikrobiális diverzitásra. Másrészt az is lehetséges, hogy az általunk gyűjtött ivaros egyedek az ivaros fejlődés korai szakaszában voltak (mivel az ivaros szaporodási időszak kezdetén mintavételeztünk) és a fiziológiai különbségek így még nem voltak olyan kifejezettek, hogy a mikrobiális összetételben különbséget generáljanak.

Összefoglalva, természetes populációkból gyűjtött *Hydra* polipok nagy adatkészletének felhasználásával azt találtuk, hogy a gazdaszervezethez kapcsolódó baktériumok diverzitásának változása elsősorban a helyi környezettel függ össze és az eutrofizáció potenciálisan szerepet játszhat a mikrobiális diverzitás növelésében. Ezen túlmenően, a mikrobiális összetétel jelentősen eltérő a különböző gazdafajok szerint és a *H. circumcincta* hordozta a legkevésbé változatos és legkonzisztensebb mikrobaközösségeket. Ezzel szemben a gazdaszervezet szaporodási módja nem magyarázza meg a mikrobiális diverzitás változásait. Azok a mechanizmusok, amelyeken keresztül a helyi környezet kölcsönhatásba lép a gazdafajjal/genotípussal a mikrobióta összeállítása során, továbbra is érdekes témát jelent, a rendszer további vizsgálataihoz.

### 3. Összefoglalás

Doktori dolgozatomban elsősorban a molekuláris genetika segítségével igyekeztem feltárni a Kárpát-medencei édesvízi hidrák populációgenetikai, szaporodásbiológiai tulajdonságait és mutualisztikus kapcsolatait. Ezt munkát 4 tanulmányon keresztül végeztem el melyekből, az **1. tanulmány** a hazai populációk populációgenetikai szerkezetét vizsgálta, az állatok szaporodási stratégiáinak szempontjából, valamint az ezzel kapcsolatos genetikai differenciációt. A **2. tanulmány** egy általunk régóta vizsgált populációból származó egyedek szaporodási stratégiának pontosabb megértését (ivaros készülségi állapot) célozta laboratóriumi vizsgálaton keresztül. A **3. tanulmány** az előző tanulmányban azonosított szaporodási stratégiákat vettette össze az egyedek genotípusával. A **4. tanulmány** a kárpát-medencei hidrapopulációk mikrobiom összetételének és diverzitásának megismerését célozta meg, a lehetséges befolyásoló külső és belső hatótényezők azonosítása és hatásának kimutatása mellett. Alább részletezem a legfontosabb következtetéseinket, tanulmányainkra lebontva.

Az **első tanulmányunk** célja az volt, hogy megvizsgáljuk a különböző párhuzamosan létező szaporodási stratégiák (ivartalan és ivaros) genetikai hátterét és differenciálódását a *Hydra oligactis* természetes populációiban. Megállapítottuk, hogy egyértelmű bizonyítékok vannak a szaporodási mód fenotipikus plaszticitására (a klónoknak azonosított polipok szaporodási módjai eltérőek voltak) és nem volt észlelhető genetikai struktúra a szaporodási mód tekintetében (az ivaros polipok nem mutattak különbséget az ivartalan polipoktól). Emellett magas genetikai rokonságot találtunk a populációk között (másodrendű rokonságot észleltünk a távoli populációkhoz tartozó egyedek között is) és két látszólagos nemváltást is megfigyeltünk (azonos klonális származású hímek és nőstények). Ezenkívül nem találtunk bizonyítékot a kriptikus fajok létezésére a Kárpát-medencei *H. oligactis* populációkban.

A **második tanulmányban** megvizsgáltuk a tavasszal és ősszel gyűjtött polipokból alapított, standard laboratóriumi körülmények között tartott *H. oligactis* törzsek ivaros szaporodásra vonatkozó készülségi állapotát. Megállapítottuk, hogy ugyanaz a környezeti jelzés, amely a tél beálltát jelzi, eltérő reakciókat vált ki a tavasszal és ősszel gyűjtött törzsekben. Az ősszel gyűjtött polipokból származó törzsek ivaros szaporodásra vonatkozó készülsége magasabb volt: nagyobb arányban mentek át ivaros szaporodáson és több mint egy héttel kevesebb időbe telt, mire megindult a gonadogenezisük.

A **harmadik tanulmányunk** célja az volt, hogy az előző vizsgálatban is szereplő *H. oligactis* populáció genetikai összetételének szezonális változását vizsgáljuk meg, valamint összevessük az egyedek ivaros készülségi állapotát a genotípusokkal. Sikerült kimutatnunk korlátozott változásokat a populáció szezonális genetikai összetételében és ezentúl megállapítottuk, hogy egyes hidraklónvonalak évek és évszakok között is fennmaradhatnak (túlélhetnek). Továbbá azt is megállapítottuk, hogy a különböző genotípusok ivaros szaporodási gyakoriságukban különböznek egymástól. Végül a fenti különbségek nem befolyásolták, hogy ezek a genotípusok újra megjelennek-e a mintavételek (évszakok és évek) között.

Az **utolsó tanulmányunkban** közép-európai víztestekben élő édesvízi hidra fajokban (*H. oligactis*, *H. vulgaris* és *H. circumcincta*) vizsgáltuk a gazdaszervezethez tartozó baktériumok taxonómiai diverzitásának változásával összefüggő külső (víztest típusa) és belső tényezőket (faji hovatartozás, szaporodási állapot). Megállapítottuk, hogy a *Hydra* populációk jelentősen különböztek a hordozott baktérium közösség összetételében és a populáció azonossága a mikrobiális  $\alpha$ - és  $\beta$ -diverzitás legfontosabb tényezője. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy az élőhely típusa erőteljesen magyarázza a baktériumok diverzitásának különbségeit. Szignifikáns különbségeket észleltünk a baktériumok diverzitásában a gazdafajok között (a legkevésbé változatos mikrobiomközösség a *H. circumcincta* esetében volt). Végül a szaporodási módnak (ivaros vs. ivartalan) nem találtunk erős hatását a hidrák által hordozott bakteriális közösségek összetételére. Összeségében megállapítottuk, hogy az  $\alpha$ - és  $\beta$ -diverzitásra a legerősebben a mintavételi hely (populáció) van hatással, ezt követi a víztest típusa, míg a gazdatényezők (faj és szaporodási mód) jóval gyengébb, de konzisztens hatást gyakoroltak a bakteriális diverzitásra. Az eredmények azt mutatták, hogy a környezeti tényezők a legerősebben a mikrobaközösség változásaihoz kapcsolódnak, miközben a baktériumközösségek szerkezete továbbra is kifejezetten a gazdafajokat tükrözik.

## 4. Summary

In my doctoral dissertation, I explored the population genetic, reproductive biological properties and mutualistic relationships of freshwater hydras in the Carpathian Basin, primarily with the tools of molecular genetics. I carried out this work through 4 studies, the **1. study** of which examined the population genetic structure of the Hungarian populations in terms of the reproductive strategies of the animals and their related genetic differentiation. The **2. study** aimed at a more accurate understanding of the reproductive strategy (sexual readiness) of individuals from a population we have long studied through laboratory testing. The **3. study** compared the reproductive strategies observed in the previous study with the genotype of the individuals. The **4. study** aimed to understand the microbiome composition and diversity of the Carpathian Basin *Hydra* populations, while identifying the potential external and internal influencing factors. I detail our main conclusions below, broken down into our studies.

The aim of our **first study** was to investigate the genetic background and differentiation of different coexisting reproductive strategies (asexual and sexual) in natural populations of *Hydra oligactis*. We found that there is clear evidence for the phenotypic plasticity of the mode of reproduction (the modes of reproduction of the polyps identified for the clones were different) and no genetic structure was observed for the mode of reproduction (sexual polyps showed no difference from asexual polyps). In addition, high genetic relatedness was found between populations (a second-order relationship was also observed between individuals belonging to distant populations) and two apparent sex changes were observed (males and females of the same clonal origin). In addition, we found no evidence for the existence of cryptic species in the populations of *H. oligactis* in the Carpathian Basin.

In the **second study**, we examined the readiness for sexual reproduction of *H. oligactis* strains based on polyps collected in spring and autumn under standard laboratory conditions. We found that the same environmental signal that indicates the onset of winter elicits different reactions in the strains collected in spring and autumn. Strains derived from collected hydras in the fall had higher sexual readiness: they underwent a higher rate of sexual reproduction, and it took more than a week less time for their gonadogenesis to begin.

The aim of our **third study** was to investigate the seasonal variation in the genetic composition of the *H. oligactis* population included in the previous study and to compare the sexual readiness of the individuals with their genotypes. We have been able to detect limited changes in the seasonal genetic

composition of the population and have henceforth found that some hydra lines can persist between years and seasons. Furthermore, we found that different genotypes differ in their sexual reproduction frequency. Finally, the above differences did not affect whether these genotypes reappear between samples (seasons).

In our **last study**, we examined external (water body type) and internal factors (species affiliation, reproductive status) related to changes in the taxonomic diversity of host microbes in freshwater hydra species (*H. oligactis*, *H. vulgaris*, and *H. circumcincta*) living together in Central European water bodies. We found that Hydra populations differed significantly in the composition of the carried bacterial community and that population identity was a major factor in microbial  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity. In addition, we have shown that habitat type strongly explains the differences in bacterial diversity. Significant differences in bacterial diversity were observed between host species (the least varied in *H. circumcincta*). Finally, we found no strong effect of the mode of reproduction (sexual vs. asexual) on the composition of the bacterial community of hydras. Overall,  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity were found to be most strongly affected by the sampling site (population), followed by the type of water body, while host factors (species and mode of reproduction) had a much weaker but consistent effect on bacterial diversity. The results showed that environmental factors are most strongly associated with changes in the microbial community, while the bacterial communities still specifically reflect the host species.

## 5. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom minden társszerzőmnek, akik tudásukkal, munkájukkal és szakértelmükkel hozzájárultak a dolgozatom elkészüléséhez, név szerint Laczkó Levente, Barta Zoltán, Sramkó Gábor, Sebestyén Flóra, Gergely Réka, Sebastian Fraune és Jan Taubenheim. Külön köszönet illeti Tökölyi Jácintot, aki témavezetésével és megfelelő útmutatásával segítette szakmai fejlődésemet, valamint nagyszerű labor és terep munkán nyújtott segítségét, ami nélkül a disszertációm nem készülhetett volna el. Köszönettel tartozom még Gergely Rékának a terepi gyűjtésekben való nagy segítségéért. Ezentúl külön köszönet illeti Mester Valériát is, aki sok segítséget nyújtott a minták laboratóriumi feldolgozásában. Végül de nem utolsó sorban köszönöt illeti a Debreceni Egyetem, Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszékének minden munkatársát is, akik segítettek valamilyen módon a dolgozat elkészültében. A doktori disszertációm elkészítése az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-22-4-I.) támogatásával valósult meg.

## 6. Irodalomjegyzék

- Aboobaker, A. A. (2011). Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. *Trends in Cell Biology*, 21(5), 304–311. doi: 10.1016/j.tcb.2011.01.005
- Adamack, A. T., & Gruber, B. (2014). PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(4), 384–387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
- Alekseev, V., and W. Lampert. 2001. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature*, 414:899–901.
- Ament-Velásquez, S. L., Figuet, E., Ballenghien, M., Zattara, E. E., Norenburg, J. L., Fernández-Álvarez, F. A., ... Galtier, N. (2016). Population genomics of sexual and asexual lineages in fissiparous ribbon worms (Lineus, Nemertea): hybridization, polyploidy and the Meselson effect. *Molecular Ecology*, 25(14), 3356–3369. doi: 10.1111/mec.13717
- Amor, D. R., C. Ratzke, and J. Gore. (2020). Transient invaders can induce shifts between alternative stable states of microbial communities. *Science Advances*, 6:eaay8676.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81–92. doi: 10.1038/nrg.2015.28
- Augustin, R., K. Schröder, A. P. Murillo Rincón, S. Fraune, F. Anton-Erxleben, E.-M. Herbst, J. Wittlieb, M. Schwentner, J. Grötzinger, T. M. Wassenaar, and T. C. G. Bosch. (2017). A secreted antibacterial neuropeptide shapes the microbiome of *Hydra*. *Nature Communications*, 8:698.
- Avise, J. C., Quattro, J. M., & Vrijenhoek, R. C. (1992). Molecular clones within organismal clones. In M. K. Hecht, B. Wallace, & R. J. Macintyre (Eds.), *Evolutionary Biology*, 26 (pp. 225–246). doi: 10.1007/978-1-4615-3336-8\_6
- Baguñà, J. (1998). Planarians. In P. Ferretti & J. Géraudie (Eds.), *Cellular and molecular basis of regeneration: from invertebrates to humans* (pp. 135–165). Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Baguñà, J., Carranza, S., Pala, M., Ribera, C., Giribet, G., Arnedo, M. A., ... Riutort, M. (1999). From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Italian Journal of Zoology*, 66(3), 207–214. doi: 10.1080/11250009909356258
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., ... Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLOS ONE*, 3(10), e3376. doi: 10.1371/journal.pone.0003376
- Balanyá, J., Oller, J. M., Huey, R. B., Gilchrist, G. W., & Serra, L. (2006). Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. *Science*, (New York, N.Y.), 313(5794), 1773–1775. <https://doi.org/10.1126/science.1131002>
- Balloux, F., Lehmann, L., & de Meeûs, T. (2003). The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, 164(4), 1635–1644.

- Barracough, T. G., Birky, C. W., & Burt, A. (2003). Diversification in sexual and asexual organisms. *Evolution*, 57(9), 2166–2172. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00394.x
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. and Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.
- Bell, G. (1982). The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality. London: Croom Helm.
- Berg, G., D. Rybakova, D. Fischer, T. Cernava, M.-C. C. Vergès, T. Charles, X. Chen, L. Cocolin, K. Eversole, G. H. Corral, M. Kazou, L. Kinkel, L. Lange, N. Lima, A. Loy, J. A. Macklin, E. Maguin, T. Mauchline, R. McClure, B. Mitter, M. Ryan, I. Sarand, H. Smidt, B. Schelkle, H. Roume, G. S. Kiran, J. Selvin, R. S. C. de Souza, L. van Overbeek, B. K. Singh, M. Wagner, A. Walsh, A. Sessitsch, and M. Schloter. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8:103.
- Birky, C. W., & Barracough, T. G. (2009). Asexual Speciation. In I. Schön, K. Martens, & P. Dijk (Eds.), *Lost Sex* (pp. 201–216). doi: 10.1007/978-90-481-2770-2\_10
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bosch, T. C. G., & David, C. N. (1986). Male and female stem cells and sex reversal in Hydra polyps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9478–9482. doi: 10.1073/pnas.83.24.9478
- Bosch, T. C., Krylow, S. M., Bode, H. R., & Steele, R. E. (1988). Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in Hydra attenuata but absent in Hydra oligactis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85:7927-7931.
- Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. (2001). Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14509–14511. <https://doi.org/10.1073/pnas.241391498>
- Brennecke, T., Gellner, K., & Bosch, T. C. G. (1998). The lack of a stress response in Hydra oligactis is due to reduced hsp70 mRNA stability. *European Journal of Biochemistry*, 255(3), 703–709. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2550703.x
- Bresadola, L., Link, V., Buerkle, C. A., Lexer, C., & Wegmann D. (2020). Estimating and accounting for genotyping errors in RAD-seq experiments. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 856– 870. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.13153>
- Brien, P. (1953). La Perennite somatique. *Biological Reviews*, 28(3), 308–349. doi: 10.1111/j.1469-185X.1953.tb01381.x
- Brooks, A. W., K. D. Kohl, R. M. Brucker, E. J. van Opstal, and S. R. Bordenstein. (2016). Phyllosymbiosis: Relationships and Functional Effects of Microbial Communities across Host Evolutionary History. *PLOS Biology*, 14:e2000225.
- Bryden, R. R. (1952). Ecology of Pelmatohydra oligactis in Kirkpatrick's Lake, Tennessee. *Ecological Monographs*, 22(1), 45–68. doi: 10.2307/1948528

- Camp, A. A., M. H. Haeba, and G. A. LeBlanc. (2019). Complementary roles of photoperiod and temperature in environmental sex determination in *Daphnia* spp. *Journal of Experimental Biology*, 222:jeb195289.
- Carlos, C., T. T. Torres, and L. M. M. Ottoboni. (2013). Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Scientific Reports*, 3:1624.
- Carpenter, K. E., Abrar, M., Aeby, G., Aronson, R. B., Banks, S., Bruckner, A., Chiriboga, A., Cortés, J., Delbeek, J. C., DeVantier, L., Edgar, G. J., Edwards, A. J., Fenner, D., Guzmán, H. M., Hoeksema, B. W., Hodgson, G., Johan, O., Licuanan, W. Y., Livingstone, S. R., ... Wood, E. (2008). One-Third of Reef-Building Corals Face Elevated Extinction Risk from Climate Change and Local Impacts. *Science*, 321(5888), 560–563. <https://doi.org/10.1126/science.1159196>
- Carvalho, G. R. (1994). Genetics of aquatic clonal organisms. In: Beaumont A (ed). In Genetics and evolution of aquatic organisms (Beaumont, pp. 291–323). Chapman and Hall.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124–3140. doi: 10.1111/mec.12354
- Chang, E. S., Orive, M. E., & Cartwright, P. (2018). Nonclonal coloniality: Genetically chimeric colonies through fusion of sexually produced polyps in the hydrozoan *Ectopleura larynx*. *Evolution Letters*, 2(4), 442–455. doi: 10.1002/evl3.68
- Chase, M. W., & Hills, H. H. (1991). Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 40(2), 215. doi: 10.2307/1222975
- Chaston, J. M., A. J. Dobson, P. D. Newell, and A. E. Douglas. (2016). Host Genetic Control of the Microbiota Mediates the *Drosophila* Nutritional Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 82:671–679.
- Combosch, D. J., & Vollmer, S. V. (2015). Trans-Pacific RAD-Seq population genomics confirms introgressive hybridization in Eastern Pacific *Pocillopora* corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 88, 154–162. doi: 10.1016/j.ympev.2015.03.022
- Cousyn, C., Meester, L. D., Colbourne, J. K., Brendonck, L., Verschuren, D., & Volckaert, F. (2001). Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6256–6260. <https://doi.org/10.1073/pnas.111606798>
- Coyte, K. Z., J. Schluter, and K. R. Foster. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*, 350:663–666.
- Csardi, G., & Nepusz, T. (2005). The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems*, 1695(5), 1–9.
- Cserkés, T., Fülöp, A., Almerikova, S., Kondor, T., Laczkó, L., & Sramkó, G. (2017). Phylogenetic and morphological analysis of birch mice (Genus *Sicista*, Family *Sminthidae*, Rodentia) in the Kazak cradle with description of a new species. *Journal of Mammalian Evolution*, doi: 10.1007/s10914-017-9409-6

- Cserkés, T., Rusin, M., & Sramkó, G. (2016). An integrative systematic revision of the European southern birch mice (Rodentia: Sminthidae, *Sicista subtilis* group). *Mammal Review*, 46(2), 114–130. doi: 10.1111/mam.12058
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5–6), 416–423. doi: 10.1093/bfpg/elq031
- De Meester, L. (1996). Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes. *Écoscience*, 3(4), 385–399. <https://doi.org/10.1080/11956860.1996.11682356>
- De Meester, L., Gomez, A., & Simon, J. C. (2004). Evolutionary and ecological genetics of cyclical parthenogens (pp. 122–134). Oxford University Press; Oxford. <https://lirias.kuleuven.be/1704928>
- De Meester, L., Gómez, A., Okamura, B., & Schwenk, K. (2002). The Monopolization Hypothesis and the dispersal–gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23(3), 121–135. doi: 10.1016/S1146-609X(02)01145-1
- De Meester, L., Vanoverbeke, J., De Gelas, K., Ortells, R., & Spaak, P. (2006). Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations – a conceptual framework. *Archiv Für Hydrobiologie*, 167(1–4), 217–244. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2006/0167-0217>
- Decaestecker, E., De Meester, L., & Mergeay, J. (2009). Cyclical Parthenogenesis in *Daphnia*: Sexual Versus Asexual Reproduction. In I. Schön, K. Martens, & P. Dijk (Eds.), *Lost Sex* (pp. 295–316). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2770-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2770-2_15)
- Deines, P., and T. C. G. Bosch. (2016). Transitioning from Microbiome Composition to Microbial Community Interactions: The Potential of the Metaorganism *Hydra* as an Experimental Model. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Deng, H.-W., & Lynch, M. (1996). Change of Genetic Architecture in Response to Sex. *Genetics*, 143(1), 203–212.
- Dickerson, T. L., and H. N. Williams. (2014). Functional Diversity of Bacterioplankton in Three North Florida Freshwater Lakes over an Annual Cycle. *Microbial Ecology*, 67:34–44.
- Dorken, M. E., & Eckert, C. G. (2001). Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 89(3), 339–350. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2001.00558.x>
- Dowle, M., and A. Srinivasan. (2021). data.table: Extension of `data.frame`.
- Dudycha, J. L., & Hassel, C. (2013). Aging in sexual and obligately asexual clones of *Daphnia* from temporary ponds. *Journal of Plankton Research*, 35(2), 253–259. doi: 10.1093/plankt/fbt008

- Easson, C. G., and R. W. Thacker. (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Eckert, E. M., N. Anicic, and D. Fontaneto. (2021). Freshwater zooplankton microbiome composition is highly flexible and strongly influenced by the environment. *Molecular Ecology*, n/a.
- Elliott, S. A., & Sánchez Alvarado, A. (2013). The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration: Contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(3), 301–326. doi: 10.1002/wdev.82
- Fadrosh, D. W., B. Ma, P. Gajer, N. Sengamalay, S. Ott, R. M. Brotman, and J. Ravel. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2:6.
- Fox, J., and S. Weisberg. (2019). *An R Companion to Applied Regression*. Third. Sage, Thousand Oaks CA.
- Franch-Gras, L., E. M. García-Roger, M. Serra, and M. José Carmona. (2017). Adaptation in response to environmental unpredictability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284:20170427.
- Franzenburg, S., J. Walter, S. Künzel, J. Wang, J. F. Baines, T. C. G. Bosch, and S. Fraune. (2013). Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:E3730–E3738.
- Fraune, S., and T. C. G. Bosch. (2007). Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:13146–13151.
- Fraune, S., Anton-Erxleben, F., Augustin, R., Franzenburg, S., Knop, M., Schröder, K., Willoweit-Ohl, D., & Bosch, T. C. (2015). Bacteria–bacteria interactions within the microbiota of the ancestral metazoan Hydra contribute to fungal resistance. *The ISME Journal*, 9(7), 1543–1556. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.239>
- Fraune, S., R. Augustin, F. Anton-Erxleben, J. Wittlieb, C. Gelhaus, V. B. Klimovich, M. P. Samoilovich, and T. C. G. Bosch. (2010). In an early branching metazoan, bacterial colonization of the embryo is controlled by maternal antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:18067–18072.
- Freeland, J. R., Rimmer, V. K., & Okamura, B. (2001). Genetic changes within freshwater bryozoan populations suggest temporal gene flow from statoblast banks. *Limnology and Oceanography*, 46(5), 1121–1129. doi: 10.4319/lo.2001.46.5.1121
- Freeland, J. R., Romualdi, C., & Okamura, B. (2000). Gene flow and genetic diversity: a comparison of freshwater bryozoan populations in Europe and North America. *Heredity*, 85(5), 498–508. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00780.x
- Gardner, S. N., & Mangel, M. (1997). When can a clonal organism escape senescence? *The American Naturalist*, 150(4), 462–490. doi: 10.1086/286076
- Gerber, N., I. Booksmythe, and H. Kokko. (2018). Sex allocation theory for facultatively sexual organisms inhabiting seasonal environments: the importance of bet hedging. *The American Naturalist*, 192:155–170.

- Glasl, B., C. E. Smith, D. G. Bourne, and N. S. Webster. (2019). Disentangling the effect of host-genotype and environment on the microbiome of the coral *Acropora tenuis*. *PeerJ*, 7.
- GouDET, J., Jombart, T., Kamvar, Z. N., Archer, E., & Hardy, O. (2020). hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics (0.5-7) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=hierfstat>
- Gould, A. L., V. Zhang, L. Lamberti, E. W. Jones, B. Obadia, N. Korasidis, A. Gavryushkin, J. M. Carlson, N. Beerenwinkel, and W. B. Ludington. (2018). Microbiome interactions shape host fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115:E11951–E11960.
- Griffiths, S. M., X. A. Harrison, C. Weldon, M. D. Wood, A. Pretorius, K. Hopkins, G. Fox, R. F. Preziosi, and R. E. Antwis. (2018). Genetic variability and ontogeny predict microbiome structure in a disease-challenged montane amphibian. *The ISME Journal*, 12:2506–2517.
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Hackett, B. J., Gimnig, J., Guelbeogo, W., Costantini, C., Koekemoer, L. L., Coetzee, M., ... Besansky, N. J. (2000). Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Molecular Biology*, 9(4), 369–374. doi: 10.1046/j.1365-2583.2000.00198.x
- Hadany, L., & Beker, T. (2003). On the evolutionary advantage of fitness-associated recombination. *Genetics*, 165(4), 2167–2179.
- Hadany, L., & Otto, S. P. (2007). The evolution of condition-dependent sex in the face of high costs. *Genetics*, 176(3), 1713–1727. doi: 10.1534/genetics.107.074203
- Hadany, L., and S. P. Otto. (2009). Condition-dependent sex and the rate of adaptation. *The American Naturalist*, 174:S71–S78.
- Hairston, N. G., Holtmeier, C. L., Lampert, W., Weider, L. J., Post, D. M., Fischer, J. M., Cáceres, C. E., Fox, J. A., & Gaedke, U. (2001). Natural Selection for Grazer Resistance to Toxic Cyanobacteria: Evolution of Phenotypic Plasticity? *Evolution*, 55(11), 2203–2214. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00736.x>
- Haldane, J. B. S. (1932). *The causes of evolution*. London: Longmans: Green & Co.
- Halkett, F., Simon, J.-C., & Balloux, F. (2005). Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(4), 194–201. doi: 10.1016/j.tree.2005.01.001
- Harrison, X. A., S. J. Price, K. Hopkins, W. T. M. Leung, C. Sergeant, and T. W. J. Garner. (2019). Diversity-Stability Dynamics of the Amphibian Skin Microbiome and Susceptibility to a Lethal Viral Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Harvell, C. D., and R. K. Grosberg. (1988). The timing of sexual maturity in clonal animals. *Ecology*, 69:1855–1864.

- Hoffmann, A. A., Hallas, R. J., Dean, J. A., & Schiffer, M. (2003). Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest *Drosophila* species. *Science*, (New York, N.Y.), 301(5629), 100–102. <https://doi.org/10.1126/science.1084296>
- Holstein, T. (1995). Cnidaria: Hydrozoa. In: Süßwasserfauna von Mitteleuropa. Gustav Fisher, Stuttgart.: Schwoerbel J.
- Infante-Villamil, S., R. Huerlimann, and D. R. Jerry. 2020. Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, n/a.
- Jessen, C., J. F. V. Lizcano, T. Bayer, C. Roder, M. Aranda, C. Wild, and C. R. Voolstra. (2013). In-situ Effects of Eutrophication and Overfishing on Physiology and Bacterial Diversity of the Red Sea Coral *Acropora hemprichii*. *PLOS ONE*, 8:e62091.
- Johnke, J., S. Fraune, T. C. G. Bosch, U. Hentschel, and H. Schulenburg. (2020). *Bdellovibrio* and Like Organisms Are Predictors of Microbiome Diversity in Distinct Host Groups. *Microbial Ecology*, 79:252–257.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Jones, O. R., & Wang, J. (2010). COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 551–555. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x>
- Kaliszewicz, A., and Lipińska, A. (2013). Environmental condition related reproductive strategies and sex ratio in hydras. *Acta Zoologica*, 94(2), 177-183.
- Kamvar, Z. N., Brooks, J. C., & Grünwald, N. J. (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics*, 6. doi: 10.3389/fgene.2015.00208
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. doi: 10.7717/peerj.281
- Kawaida, H., Shimizu, H., Fujisawa, T., Tachida, H., & Kobayakawa, Y. (2010). Molecular phylogenetic study in genus *Hydra*. *Gene*, 468(1–2), 30–40. doi: 10.1016/j.gene.2010.08.002
- Kiersztyn, B., R. Chróst, T. Kaliński, W. Siuda, A. Bukowska, G. Kowalczyk, and K. Grabowska. (2019). Structural and functional microbial diversity along a eutrophication gradient of interconnected lakes undergoing anthropopressure. *Scientific Reports*, 9:11144.
- King, C. E., & Schonfeld, J. (2001). The approach to equilibrium of multilocus genotype diversity under clonal selection and cyclical parthenogenesis. In L. Sanoamuang, H. Segers, R. J. Shiel, & R. D. Gulati (Eds.), *Rotifera IX* (pp. 323–331). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0756-6\\_42](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0756-6_42)
- Kobayashi, K., & Hoshi, M. (2002). Switching from asexual to sexual reproduction in the Planarian *Dugesia ryukyuensis*: Change of the fissiparous capacity along

- with the sexualizing process. *Zoological Science*, 19(6), 661–666. doi: 10.2108/zsj.19.661
- Kokko, H. (2020). When Synchrony Makes the Best of Both Worlds Even Better: How Well Do We Really Understand Facultative Sex? *The American Naturalist*, 195(2), 380–392. <https://doi.org/10.1086/706812>
- Kondrashov, A. S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336(6198), 435. doi: 10.1038/336435a0
- Konopka, T. (2020). umap: Uniform Manifold Approximation and Projection.
- Krois, N. R., Cherukuri, A., Puttagunta, N., & Neiman, M. (2013). Higher rate of tissue regeneration in polyploid asexual versus diploid sexual freshwater snails. *Biology Letters*, 9(4), 20130422–20130422. doi: 10.1098/rsbl.2013.0422
- Kueneman, J. G., M. C. Bletz, V. J. McKenzie, C. G. Becker, M. B. Joseph, J. G. Abarca, H. Archer, A. L. Arellano, A. Bataille, M. Becker, L. K. Belden, A. Crottini, R. Geffers, C. F. B. Haddad, R. N. Harris, W. M. Holden, M. Hughey, M. Jarek, P. J. Kearns, J. L. Kerby, J. Kielgast, A. Kurabayashi, A. V. Longo, A. Loudon, D. Medina, J. J. Nuñez, R. G. B. Perl, A. Pinto-Tomás, F. C. E. Rabemananjara, E. A. Rebollar, A. Rodríguez, L. Rollins-Smith, R. Stevenson, C. C. Tebbe, G. Vargas Asensio, B. Waldman, J. B. Walke, S. M. Whitfield, K. R. Zamudio, I. Zúñiga Chaves, D. C. Woodhams, and M. Vences. (2019). Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. *Nature Ecology & Evolution*, 3:381–389.
- Kuznetsova, A., P. B. Brockhoff, and R. H. B. Christensen. (2017). lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software* 82:1–26.
- Langer, G., Nehrke, G., Probert, I., Ly, J., & Ziveri, P. (2009). Strain-specific responses of *Emiliana huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences*, 6(11), 2637–2646. <https://doi.org/10.5194/bg-6-2637-2009>
- Learner, M. A., Lochhead, G., & Hughes, B. D. (1978). A review of the biology of British Naididae (Oligochaeta) with emphasis on the lotic environment. *Freshwater Biology*, 8(4), 357–375. doi: 10.1111/j.1365-2427.1978.tb01457.x
- Lee, O. O., Y. Wang, J. Yang, F. F. Lafi, A. Al-Suwailem, and P.-Y. Qian. (2011). Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *The ISME Journal*, 5:650–664.
- Lenhoff, H. M. (1983). *Hydra: Research Methods*. New York and London.: Plenum Press.
- Lenth, R. V. (2016). Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software* 69:1–33.
- Leria, L., Vila-Farré, M., Álvarez-Presas, M., Sánchez-Gracia, A., Rozas, J., Sluys, R., & Riutort, M. (2020). Cryptic species delineation in freshwater planarians of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida): Extreme intraindividual genetic diversity, morphological stasis, and karyological variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 143, 106496. doi: 10.1016/j.ympev.2019.05.010
- Littlefield, C. L. (1986). Sex determination in hydra: Control by a subpopulation of interstitial cells in *Hydra oligactis* males. *Developmental Biology*, 117(2), 428–434. doi: 10.1016/0012-1606(86)90311-8

- Littlefield, C. L. (1991). Cell lineages in Hydra: Isolation and characterization of an interstitial stem cell restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Developmental Biology*, 143:378–388.
- Littlefield, C. L., Finkemeier, C., & Bode, H. R. (1991). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*: II. How temperature controls the reciprocity of sexual and asexual reproduction. *Developmental Biology*, 146(2), 292–300. doi: 10.1016/0012-1606(91)90231-Q
- Llewellyn, M. S., P. McGinnity, M. Dionne, J. Letourneau, F. Thonier, G. R. Carvalho, S. Creer, and N. Derome. (2016). The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *The ISME Journal*, 10:1280–1284.
- Loiselle, B. A., Sork, V. L., Nason, J., & Graham, C. (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82(11), 1420. doi: 10.2307/2445869
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15:550.
- Lutz, H. L., E. W. Jackson, P. W. Webala, W. S. Babyesiza, J. C. K. Peterhans, T. C. Demos, B. D. Patterson, and J. A. Gilbert. (2019). Ecology and Host Identity Outweigh Evolutionary History in Shaping the Bat Microbiome. *mSystems*, 4.
- Martínez, D. E., & Levinton, J. S. (1992). Asexual metazoans undergo senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9920–9923. doi: 10.1073/pnas.89.20.9920
- Martínez, D. E., Iñiguez, A. R., Percell, K. M., Willner, J. B., Signorovitch, J., & Campbell, R. D. (2010). Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(1), 403–410. doi: 10.1016/j.ympev.2010.06.016
- Mastretta-Yanes, A., Arrigo, N., Alvarez, N., Jorgensen, T. H., Piñero, D., & Emerson, B. C. (2015). Restriction site-associated DNA sequencing, genotyping error estimation and de novo assembly optimization for population genetic inference. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 28–41. doi: 10.1111/1755-0998.12291
- Maynard-Smith, J. (1978). *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Maynard-Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M., & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4384–4388. doi: 10.1073/pnas.90.10.4384
- Mayr, E. (1948). The bearing of the new systematics on genetical problems the nature of species. In *Advances in Genetics*, (Vol. 2, pp. 205–237). doi: 10.1016/S0065-2660(08)60469-1
- McFall-Ngai, M., M. G. Hadfield, T. C. G. Bosch, H. V. Carey, T. Domazet-Lošo, A. E. Douglas, N. Dubilier, G. Eberl, T. Fukami, S. F. Gilbert, U. Hentschel, N. King, S. Kjelleberg, A. H. Knoll, N. Kremer, S. K. Mazmanian, J. L. Metcalf, K. Neelson, N. E. Pierce, J. F. Rawls, A. Reid, E. G. Ruby, M. Rumpho, J. G. Sanders, D. Tautz, and J. J. Wernegreen. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:3229–3236.

- McMurdie, P. J., and S. Holmes. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*, 8:e61217.
- Meloni, M., Reid, A., Caujapé-Castells, J., Marrero, Á., Fernández-Palacios, J. M., Mesa-Coelo, R. A., & Conti, E. (2013). Effects of clonality on the genetic variability of rare, insular species: the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. *Ecology and Evolution*, 3(6), 1569–1579. doi: 10.1002/ece3.571
- Miklós, M., Laczkó, L., Sramkó, G., Sebestyén, F., Barta, Z., & Tökölyi, J. (2021). Phenotypic plasticity rather than genotype drives reproductive choices in *Hydra* populations. *Molecular Ecology*, 30(5), 1206–1222. <https://doi.org/10.1111/mec.15810>
- Minten-Lange, T., and S. Fraune. (2020). *Hydra* and *Curvibacter*: An intimate crosstalk at the epithelial interface. Page Cellular Dialogues in the Holobiont. CRC Press.
- Moran, N. A. (1992). The evolution of aphid life cycles. *The Evolution of Aphid Life Cycles*, 37(1), 321–348. doi: 10.1146/annurev.en.37.010192.0015
- Mortzfeld, B. M., S. Urbanski, A. M. Reitzel, S. Künzel, U. Technau, and S. Fraune. (2016). Response of bacterial colonization in *Nematostella vectensis* to development, environment and biogeography. *Environmental Microbiology*, 18:1764–1781.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2–9. doi: 10.1016/0027-5107(64)90047-8
- Murillo-Rincon, A. P., A. Klimovich, E. Pemöller, J. Taubenheim, B. Mortzfeld, R. Augustin, and T. C. G. Bosch. (2017). Spontaneous body contractions are modulated by the microbiome of *Hydra*. *Scientific Reports*, 7:15937.
- Navarro, B. S., J. Jokela, N. K. Michiels, and T. G. D’souza. (2013). Population genetic structure of parthenogenetic flatworm populations with occasional sex. *Freshwater Biology*, 58:416–429.
- Nespolo, R. F., Halkett, F., Figueroa, C. C., Plantegenest, M., & Simon, J.-C. (2009). Evolution of trade-offs between sexual and asexual phases and the role of reproductive plasticity in the genetic architecture of aphid life histories. *Evolution*, 63(9), 2402–2412. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00706.x
- Newmark, P. A., & Alvarado, A. S. (2002). Not your father’s planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 210–219. doi: 10.1038/nrg759
- Ngo, K. S., R-Almási, B., Barta, Z., & Tökölyi, J. (2021). Experimental manipulation of body size alters life history in *hydra*. *Ecology Letters*, 24(4), 728–738. <https://doi.org/10.1111/ele.13698>
- Nilsson Sköld, H., & Obst, M. (2011). Potential for clonal animals in longevity and ageing studies. *Biogerontology*, 12(5), 387–396. doi: 10.1007/s10522-011-9333-8
- Nishimiya-Fujisawa, C., & Kobayashi, S. (2018). Roles of germline stem cells and somatic Multipotent stem cells in *Hydra* sexual reproduction. In K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, & M. Kondo (Eds.), *Reproductive and Developmental Strategies*, (pp. 123–155). doi: 10.1007/978-4-431-56609-0\_7

- Noda, K. (1982). Sexual differentiation in *Pelmatohydra robusta*. I. Response to a temperature change is dependent on the duration of an asexual period after hatching. *Journal of Experimental Zoology*, 221:237–243.
- Nunney, L. (1989). The Maintenance of Sex by Group Selection. *Evolution*, 43(2), 245–257. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04225.x>
- Oksanen, J., F. G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O’Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs, and H. Wagner. (2020). *vegan: Community Ecology Package*.
- Ortells, R., Gómez, A., & Serra, M. (2006). Effects of duration of the planktonic phase on rotifer genetic diversity. *Archiv Für Hydrobiologie*, 167(1–4), 203–216. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2006/0167-0203>
- Paradis, E. (2010). *pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach*. *Bioinformatics*, 26(3), 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Paris, J. R., Stevens, J. R., & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1360–1373. doi: 10.1111/2041-210X.12775
- Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., & Simon, J.-C. (2009). A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7495–7500. doi: 10.1073/pnas.081117106
- Peck, J. R., Yearsley, J. M., & Waxman, D. (1998). Explaining the geographic distributions of sexual and asexual populations. *Nature*, 391(6670), 889–892. doi: 10.1038/36099
- Peck, J. R., Yearsley, J., & Barreau, G. (1999). The maintenance of sexual reproduction in a structured population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1431), 1857–1863. doi: 10.1098/rspb.1999.0857
- Pfrender, M. E., & Lynch, M. (2000). Quantitative Genetic Variation in *Daphnia*: Temporal Changes in Genetic Architecture. *Evolution*, 54(5), 1502–1509. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00696.x>
- Pigliucci, M., Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2362–2367. doi: 10.1242/jeb.02070
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2020). *\_nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models\_*. R package version 3.1-144, URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Pistevos, J. C. A., Calosi, P., Widdicombe, S., & Bishop, J. D. D. (2011). Will variation among genetic individuals influence species responses to global climate change? *Oikos*, 120(5), 675–689. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.19470.x>
- Polidoro, B. A., Carpenter, K. E., Collins, L., Duke, N. C., Ellison, A. M., Ellison, J. C., Farnsworth, E. J., Fernando, E. S., Kathiresan, K., Koedam, N. E., Livingstone, S. R., Miyagi, T., Moore, G. E., Nam, V. N., Ong, J. E., Primavera,

- J. H., Iii, S. G. S., Sanciangco, J. C., Sukardjo, S., ... Yong, J. W. H. (2010). The Loss of Species: Mangrove Extinction Risk and Geographic Areas of Global Concern. *PLOS ONE*, 5(4), e10095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010095>
- Pollock, F. J., R. McMinds, S. Smith, D. G. Bourne, B. L. Willis, M. Medina, R. V. Thurber, and J. R. Zaneveld. (2018). Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis and cophylogeny. *Nature Communications*, 9:4921.
- Pongratz, N., Sharbel, T. F., Beukeboom, L. W., & Michiels, N. K. (1998). Allozyme variability in sexual and parthenogenetic freshwater planarians: evidence for polyphyletic origin of parthenogenetic lineages through hybridization with coexisting sexuals. *Heredity*, 81(1), 38–47. doi: 10.1046/j.1365-2540.1998.00359.x.
- Pongratz, N., Storhas, M., Carranza, S., & Michiels, N. K. (2003). Phylogeography of competing sexual and parthenogenetic forms of a freshwater flatworm: patterns and explanations. *BMC Evolutionary Biology*, 3(1), 23. doi: 10.1186/1471-2148-3-23
- Popkes, M., and D. R. Valenzano. (2020). Microbiota–host interactions shape ageing dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375:20190596.
- Post, R. J., Flook, P. K., & Millest, A. L. (1993). Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(1), 85–92. doi: 10.1016/0305-1978(93)90012-G
- Pound, G. E., Cox, S. J., & Doncaster, C. P. (2004). The accumulation of deleterious mutations within the frozen niche variation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 651–662. doi: 10.1111/j.1420-9101.2003.00690.x
- Pratlong, M., Haguenaer, A., Chenesseau, S., Brener, K., Mitta, G., Toulza, E., ... Pontarotti, P. (2017). Evidence for a genetic sex determination in Cnidaria, the Mediterranean red coral ( *Corallium rubrum* ). *Royal Society Open Science*, 4(3), 160880. doi: 10.1098/rsos.160880
- R Core Team. (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahat, M., and C. Dimentman. (1982). Cultivation of bacteria-free *Hydra viridis*: missing budding factor in nonsymbiotic hydra. *Science*, 216:67–68.
- Rathje, K., B. Mortzfeld, M. P. Hoepfner, J. Taubenheim, T. C. G. Bosch, and A. Klimovich. (2020). Dynamic interactions within the host-associated microbiota cause tumor formation in the basal metazoan *Hydra*. *PLOS Pathogens*, 16:e1008375.
- Reisa, J. (1973). Ecology of hydra. In Burnett, A. (ed), *Biology of Hydra*. New York and London: Academic Press.
- Reitzel, A. M., Herrera, S., Layden, M. J., Martindale, M. Q., & Shank, T. M. (2013). Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 2953–2970. doi: 10.1111/mec.12228
- Reznik, S. Ya., and K. G. Samartsev. (2015). Multigenerational maternal inhibition of prepupal diapause in two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Insect Physiology*, 81:14–20.

- Ribi, G., Tardent, R., & Scascighini, C. (1985). Dynamics of hydra populations in Lake Ziirich, Switzerland, and Lake Maggiore, Italy. *Swiss Journal of Hydrology*, 47(1), 45–56. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02538183>
- Rink, J. C. (2013). Stem cell systems and regeneration in planaria. *Development Genes and Evolution*, 223(1–2), 67–84. doi: 10.1007/s00427-012-0426-4
- Roser, L. G., Ferreyra, L. I., Saidman, B. O., & Vilardi, J. C. (2017). EcoGenetics: An R package for the management and exploratory analysis of spatial data in landscape genetics. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e241–e250. doi: 10.1111/1755-0998.12697
- Rozenfeld, A. F., Arnaud-Haond, S., Hernández-García, E., Eguíluz, V. M., Matías, M. A., Serrão, E., & Duarte, C. M. (2007). Spectrum of genetic diversity and networks of clonal organisms. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(17), 1093–1102. doi: 10.1098/rsif.2007.0230
- Ryan, W. H., and T. E. Miller. (2019). Reproductive strategy changes across latitude in a clonal sea anemone. *Marine Ecology Progress Series*, 611:129–141.
- Sakai, S. (1995). Optimal resource allocation to vegetative and sexual reproduction of a plant growing in a spatially varying environment. *Journal of Theoretical Biology*, 175(3), 271–282. doi: 10.1006/jtbi.1995.0141
- Schmidt, V. T., K. F. Smith, D. W. Melvin, and L. A. Amaral-Zettler. (2015). Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Molecular Ecology*, 24:2537–2550.
- Schröder, T. (2005). Diapause in monogonont rotifers. In A. Herzig, R. D. Gulati, C. D. Jersabek, & L. May (Eds.), *Rotifera X: Rotifer Research: Trends, New Tools and Recent Advances*, Proceedings of the Xth International Rotifer Symposium, held in Illmitz, Austria, 7–13 June 2003 (pp. 291–306). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4408-9\\_30](https://doi.org/10.1007/1-4020-4408-9_30)
- Schröder, T., and J. J. Gilbert. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: intracolonial, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology*, 18:458–466.
- Schuchert, P. (2010). The European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Capitata Part 2. *Revue Suisse de Zoologie*, 117, 337–555.
- Schwentner, M., & Bosch, T. C. G. (2015). Revisiting the age, evolutionary history and species level diversity of the genus Hydra (Cnidaria: Hydrozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 91, 41–55. doi: 10.1016/j.ympev.2015.05.013
- Sebestyén, F., Barta, Z., & Tökölyi, J. (2018). Reproductive mode, stem cells and regeneration in a freshwater cnidarian with postreproductive senescence. *Functional Ecology*, 32(11), 2497–2508. doi: 10.1111/1365-2435.13189
- Sebestyén, F., M. Miklós, K. Iván, and J. Tökölyi. (2020). Age-dependent plasticity in reproductive investment, regeneration capacity and survival in a partially clonal animal. *Journal of Animal Ecology*, 89(10):2246–2257. doi: 10.1111/1365-2656.13287.
- Sehnal, L., E. Brammer-Robbins, A. M. Wormington, L. Blaha, J. Bisesi, I. Larkin, C. J. Martyniuk, M. Simonin, and O. Adamovsky. (2021). Microbiome Composition and Function in Aquatic Vertebrates: Small Organisms Making Big Impacts on Aquatic Animal Health. *Frontiers in Microbiology*, 12.

- Shaver, E. C., A. A. Shantz, R. McMinds, D. E. Burkepile, R. L. V. Thurber, and B. R. Silliman. (2017). Effects of predation and nutrient enrichment on the success and microbiome of a foundational coral. *Ecology*, 98:830–839.
- Sherrill-Mix, S. (2019). taxonomizr: Functions to Work with NCBI Accessions and Taxonomy (0.5.3) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=taxonomizr>
- Shin, S. C., S.-H. Kim, H. You, B. Kim, A. C. Kim, K.-A. Lee, J.-H. Yoon, J.-H. Ryu, and W.-J. Lee. (2011). Drosophila Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. *Science*, 334:670–674.
- Shreiner, A. B., J. Y. Kao, and V. B. Young. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, 31:69–75.
- Siebert, S., & Juliano, C. E. (2017). Sex, polyps, and medusae: Determination and maintenance of sex in cnidarians. *Molecular Reproduction and Development*, 84(2), 105–119. doi: 10.1002/mrd.22690
- Simon, J.-C., Delmotte, F., Rispe, C., & Crease, T. (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), 151–163. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00175.x
- Simon, J.-C., Rispe, C., & Sunnucks, P. (2002). Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02331-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02331-X)
- Simons, A. M. (2009). Fluctuating natural selection accounts for the evolution of diversification bet hedging. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1664), 1987. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1920>
- Sison-Mangus, M. P., A. A. Mushegian, and D. Ebert. (2015). Water fleas require microbiota for survival, growth and reproduction. *The ISME journal*, 9:59–67.
- Slatkin, M. (1974). Hedging one's evolutionary bets. *Nature*, 250, 704–705. doi: 10.1038/250704b0
- Sockett, R. E. (2009). Predatory Lifestyle of Bdellovibrio bacteriovorus. *Annual Review of Microbiology*, 63:523–539.
- Steele, R. E., P. Lieu, N. H. Mai, M. A. Shenk, and M. P. Sarras Jr. (1996). Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in Hydra. *Development Genes and Evolution*, 206:247–259.
- Steele, R. E., Updegrove, M. D., Kirolos, S. A., Mowery, L., Martínez, D. E., & Bryant, P. J. (2019). Reproductive Bet-Hedging and Existence in Vernal Pools as Components of Hydra Life History. *The Biological Bulletin*, 237(2), 111–118. <https://doi.org/10.1086/705161>
- Stelzer, C.-P. (2012). Population regulation in sexual and asexual rotifers: An eco-evolutionary feedback to population size? *Functional Ecology*, 26(1), 180–188.
- Stelzer, C.-P., & Lehtonen, J. (2016). Diapause and maintenance of facultative sexual reproductive strategies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1706), 20150536. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0536>
- Sullam, K. E., B. E. Rubin, C. M. Dalton, S. S. Kilham, A. S. Flecker, and J. A. Russell. (2015). Divergence across diet, time and populations rules out parallel

- evolution in the gut microbiomes of Trinidadian guppies. *The ISME Journal*, 9:1508–1522.
- Sylvain, F.-É., B. Cheaib, M. Llewellyn, T. Gabriel Correia, D. Barros Fagundes, A. Luis Val, and N. Derome. (2016). pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific Reports*, 6:32032.
- Takacs-Vesbach, C., K. King, D. V. Horn, K. Larkin, and M. Neiman. (2016). Distinct Bacterial Microbiomes in Sexual and Asexual *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand Freshwater Snail. *PLOS ONE*, 11:e0161050.
- Tan, T. C. J., Rahman, R., Jaber-Hijazi, F., Felix, D. A., Chen, C., Louis, E. J., & Aboobaker, A. (2012). Telomere maintenance and telomerase activity are differentially regulated in asexual and sexual worms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4209–4214. doi: 10.1073/pnas.1118885109
- Tarazona, E., García-Roger, E. M., & Carmona, M. J. (2017). Experimental evolution of bet hedging in rotifer diapause traits as a response to environmental unpredictability. *Oikos*, 126(8), 1162–1172. <https://doi.org/10.1111/oik.04186>
- Taubenheim, J., D. Willoweit-Ohl, M. Knop, S. Franzenburg, J. He, T. C. G. Bosch, and S. Fraune. (2020). Bacteria- and temperature-regulated peptides modulate  $\beta$ -catenin signaling in *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117:21459–21468.
- Taubenheim, J., Miklós, M., Tökölyi, J., Fraune, S. (2022). Population differences and host species predict variation in the diversity of host-associated microbes in *Hydra*. *Frontiers in Microbiology*, Accepted. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.799333>
- Tessier, A. J., & Caceres, C. E. (2004). Differentiation in sex investment by clones and populations of *Daphnia*. *Ecology Letters*, 7(8), 695–703. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00627.x
- Tessier, A. J., Young, A., & Leibold, M. (1992). Population dynamics and body-size selection in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 37(1), 1–13. <https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.1.0001>
- Tibayrenc, M., & Ayala, F. J. (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, 18(9), 405–410. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02357-7
- Tomczyk, S., Buzgariu, W., Perruchoud, C., Fisher, K., Austad, S., & Galliot, B. (2019). Loss of neurogenesis in aging *Hydra*. *Developmental Neurobiology*, doi: 10.1002/dneu.22676
- Tomczyk, S., Fischer, K., Austad, S., & Galliot, B. (2015). *Hydra*, a powerful model for aging studies. *Invertebrate Reproduction & Development*, 59(sup1), 11–16. doi: 10.1080/07924259.2014.927805
- Tomczyk, S., N. Suknovic, Q. Schenkelaars, Y. Wenger, K. Ekundayo, W. Buzgariu, C. Bauer, K. Fischer, S. Austad, and B. Galliot. (2020). Deficient autophagy in epithelial stem cells drives aging in the freshwater cnidarian *Hydra*. *Development*, 147.

- Tomczyk, S., W. Buzgariu, C. Perruchoud, K. Fisher, S. Austad, and B. Galliot. (2019). Loss of Neurogenesis in Aging Hydra. *Developmental Neurobiology*, 79:479–496.
- Tökölyi, J., B. Kozma, F. Sebestyén, M. Miklós, and Z. Barta. (2017a). Life history traits and previous exposure predict resistance to UV irradiation in the freshwater cnidarian *Hydra oligactis*. *Invertebrate Biology*, 136:217–227.
- Tökölyi, J., Bradács, F., Hóka, N., Kozma, N., Miklós, M., Mucza, O., ... Barta, Z. (2016). Effects of food availability on asexual reproduction and stress tolerance along the fast–slow life history continuum in freshwater hydra (Cnidaria: Hydrozoa). *Hydrobiologia*, 766(1), 121–133. doi: 10.1007/s10750-015-2449-0
- Tökölyi, J., Gergely, R., & Miklós, M. (2021). Seasonal variation in sexual readiness in a facultatively sexual freshwater cnidarian with diapausing eggs. *Ecosphere*, 12(8), e03713. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3713>
- Tökölyi, J., J. M. McNamara, A. I. Houston, and Z. Barta. (2012). Timing of avian reproduction in unpredictable environments. *Evolutionary Ecology*, 26:25–42.
- Tökölyi, J., Z. Ósz, F. Sebestyén, and Z. Barta. (2017b). Resource allocation and post-reproductive degeneration in the freshwater cnidarian *Hydra oligactis* (Pallas, 1766). *Zoology*, 120:110–116.
- Tougeron, K., M. Devogel, J. van Baaren, C. Le Lann, and T. Hance. (2020). Trans-generational effects on diapause and life-history-traits of an aphid parasitoid. *Journal of Insect Physiology*, 121:104001.
- Valenzano, D. R., Aboobaker, A., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2017). Non-canonical aging model systems and why we need them. *The EMBO Journal*, 36(8), 959–963. doi: 10.15252/embj.201796837
- van Leeuwen, C. H. A., Lovas-Kiss, Á., Ovegård, M., & Green, A. J. (2017). Great cormorants reveal overlooked secondary dispersal of plants and invertebrates by piscivorous waterbirds. *Biology Letters*, 13(10), 20170406. doi: 10.1098/rsbl.2017.0406
- van Leeuwen, C. H. A., van der Velde, G., van Groenendael, J. M., & Klaassen, M. (2012). Gut travellers: internal dispersal of aquatic organisms by waterfowl. *Journal of Biogeography*, 39(11), 2031–2040. doi: 10.1111/jbi.12004
- Vargas, S., L. Leiva, and G. Wörheide. (2021). Short-Term Exposure to High-Temperature Water Causes a Shift in the Microbiome of the Common Aquarium Sponge *Lendenfeldia chondrodes*. *Microbial Ecology*, 81:213–222.
- Vekemans, X., & Hardy, O. J. (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13(4), 921–935. doi: 10.1046/j.1365-294X.2004.02076.x
- Vieira-Silva, S., G. Falony, Y. Darzi, G. Lima-Mendez, R. Garcia Yunta, S. Okuda, D. Vandeputte, M. Valles-Colomer, F. Hildebrand, S. Chaffron, and J. Raes. (2016). Species–function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nature Microbiology*, 1:1–8.
- Voolstra, C. R., and M. Ziegler. (2020). Adapting with Microbial Help: Microbiome Flexibility Facilitates Rapid Responses to Environmental Change. *BioEssays*, 42:2000004.

- Vrijenhoek, R. C. (1984). Ecological differentiation among Clones: the frozen niche variation model. In K. Wöhrmann & V. Loeschcke (Eds.), *Population Biology and Evolution*, (pp. 217–231).
- Vuong, H. E., J. M. Yano, T. C. Fung, and E. Y. Hsiao. (2017). The Microbiome and Host Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 40:21–49.
- Walsh, E. J., Smith, H. A., & Wallace, R. L. (2014). Rotifers of temporary waters. *International Review of Hydrobiology*, 99(1–2), 3–19. <https://doi.org/10.1002/iroh.201301700>
- Walsh, M. R. (2013). The link between environmental variation and evolutionary shifts in dormancy in zooplankton. *Integrative and Comparative Biology*, 53:713–722.
- Wang, J. (2004). Sibship Reconstruction From Genetic Data With Typing Errors. *Genetics*, 166(4), 1963–1979. doi: 10.1534/genetics.166.4.1963
- Wang, J. (2016). Individual identification from genetic marker data: developments and accuracy comparisons of methods. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 163–175. doi: 10.1111/1755-0998.12452
- Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J. B., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J. W., Heck, K. L., Hughes, A. R., Kendrick, G. A., Kenworthy, W. J., Short, F. T., & Williams, S. L. (2009). Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12377–12381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905620106>
- Webster, T. M. U., S. Consuegra, M. Hitchings, and C. G. de Leaniz. (2018). Interpopulation Variation in the Atlantic Salmon Microbiome Reflects Environmental and Genetic Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 84.
- Welch, D. M., & Meselson, M. (2000). Evidence for the evolution of Bdelloid Rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, 288(5469), 1211–1215. doi: 10.1126/science.288.5469.1211
- Welch, P. S., & Loomis, H. A. (1924). A limnological study of *Hydra oligactis* in Douglas Lake, Michigan. *Transactions of the American Microscopical Society*, 43(4), 203. doi: 10.2307/3221738
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilke, C. O. (2020). *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for “ggplot2.”*
- Woodhams, D. C., M. C. Bletz, C. G. Becker, H. A. Bender, D. Buitrago-Rosas, H. Diebboll, R. Huynh, P. J. Kearns, J. Kueneman, E. Kurosawa, B. C. LaBumbard, C. Lyons, K. McNally, K. Schliep, N. Shankar, A. G. Tokash-Peters, M. Vences, and R. Whetstone. (2020). Host-associated microbiomes are predicted by immune system complexity and climate. *Genome Biology*, 21:23.
- Yildirim, S., C. J. Yeoman, M. Sipos, M. Torralba, B. A. Wilson, T. L. Goldberg, R. M. Stumpf, S. R. Leigh, B. A. White, and K. E. Nelson. (2010). Characterization of the Fecal Microbiome from Non-Human Wild Primates Reveals Species Specific Microbial Communities. *Plos One*, 5:e13963.

- Yin, M., Wolinska, J., & Gießler, S. (2010). Clonal diversity, clonal persistence and rapid taxon replacement in natural populations of species and hybrids of the *Daphnia longispina* complex. *Molecular Ecology*, 19(19), 4168–4178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04807.x>
- Yoshida, K., Fujisawa, T., Hwang, J. S., Ikeo, K., & Gojobori, T. (2006). Degeneration after sexual differentiation in hydra and its relevance to the evolution of aging. *Gene*, 385, 64–70. doi: 10.1016/j.gene.2006.06.031
- Youngblut, N. D., G. H. Reischer, W. Walters, N. Schuster, C. Walzer, G. Stalder, R. E. Ley, and A. H. Farnleitner. (2019). Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *Nature Communications*, 10:2200.
- Zattara, E. E., & Bely, A. E. (2016). Phylogenetic distribution of regeneration and asexual reproduction in Annelida: regeneration is ancestral and fission evolves in regenerative clades. *Invertebrate Biology*, 135(4), 400–414. doi: 10.1111/ivb.12151

## 7. Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények listája

- Miklós, M., Laczkó, L., Sramkó, G., Sebestyén, F., Barta, Z., & Tökölyi, J. (2021). Phenotypic plasticity rather than genotype drives reproductive choices in *Hydra* populations. *Molecular Ecology*, 30(5), 1206–1222. <https://doi.org/10.1111/mec.15810>
- Tökölyi, J., Gergely, R., & Miklós, M. (2021). Seasonal variation in sexual readiness in a facultatively sexual freshwater cnidarian with diapausing eggs. *Ecosphere*, 12(8), e03713. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3713>
- Miklós, M., Laczkó, L., Sramkó, G., Barta, Z., & Tökölyi, J. (2022). Seasonal variation of genotypes and reproductive plasticity in a facultative clonal freshwater invertebrate animal (*Hydra oligactis*) living in a temperate lake. *Ecology and Evolution*, Major revision.
- Taubenheim, J., Miklós, M., Tökölyi, J., Fraune, S. (2022). Population differences and host species predict variation in the diversity of host-associated microbes in *Hydra*. *Frontiers in Microbiology*, Elfogadva. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.799333>