

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Variabilitás és differenciálódás *Melitaea* (subg. *Mellicta*) fajok  
(Lepidoptera: Nymphalidae, Nymphalinae) Kárpát-medencei  
populációiban**

Variability and differentiation in *Melitaea* species (Lepidoptera:  
Nymphalidae) in the Carpathian Basin

**Bátori Edit**

Témavezetők: Dr. Pecsénye Katalin  
Dr. Varga Zoltán



**DEBRECENI EGYETEM**  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2013

## 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben egyre intenzívebben jelentkező antropogén hatások a természetes életterek beszűkülését, feldarabolódását, degradációját, bizonyos fajok népességeinek egyedszám csökkenését, a populációk fragmentálódását és izolációját eredményezték. Ezek a folyamatok nagymértékben hozzájárultak a veszélyeztetett növény- és állatfajok számának drasztikus növekedéséhez. Ennek következtében a gyakorlati természetvédelem számára kiemelkedő jelentőségűvé váltak a konzervációbiológiai kutatások, melyek egyik fontos részterülete annak vizsgálata, hogy az egyes fajok populációiban milyen evolúciós erők hatnak, és ezek milyen módon befolyásolják a populációk genetikai struktúráját, a variabilitás mértékét illetve annak szerkezetét.

A nappali lepkék (Lepidoptera: Papilionoidea) a fragmentált élőhelyek érzékeny indikátorainak bizonyultak. Metapopulációik fennmaradása szempontjából az élőhely minősége és izolációjának foka igen fontos tényező. Ebből a szempontból különösen érzékenyek azok a lepkefajok, melyek az r-K kontinuum r-hez közelebbi végén találhatóak. Az ő populációikban ugyanis a sztochasztikus eseményekből fakadó káros hatások egy nőstény csaknem összes utódát egyszerre érintik, és így ezekben a populációkban a véletlen hatások felerősödnek. Minthogy a különböző jelenségek háttérben álló okok ismerete nélkül sok esetben nem lehet a megfelelő természetvédelmi intézkedést végrehajtani, a konzervációbiológiában a tudományos megalapozottság alapvető fontosságú. Éppen ezért természetvédelmi szempontból elengedhetetlen a

demográfiai és ökológiai vizsgálatok mellett a genetikai és fenotípusos variancia elemzése is.

A *Melitaea* genus *Mellicta* subgenusába tartozó tarkalepke fajok természetvédelmi szempontból európai jelentőségűek, ugyanis populációik a kontinens egyes részein hanyatlóak vagy ritkák. A *Melitaea aurelia* Nickerl, 1840 (recés tarkalepke) és a *Melitaea britomartis* Assmann, 1847 (barna tarkalepke) számos országban veszélyeztetettként van nyilvántartva (Van Swaay és Warren 1999; Van Swaay és mtsai. 2010). A *Melitaea athalia* (Rottemburg, 1775) (közönséges tarkalepke) pedig Angliában a konzervációbiológia egyik központi lepkefajaként ismert. Emellett a *Mellicta* subgenus még taxonómiai szempontból is viszonylag bonyolult csoportnak tekinthető.

A tarkalepkék (Lepidoptera: Melitaea) – tekintettel arra, hogy még a rovarokhoz képest is magas szintű polimorfizmussal jellemezhetők az enzimlokuszokon – különösen alkalmasak a populációstruktúra részletes vizsgálatára, ugyanakkor morfometriai variabilitásuk is jelentős mértékű. Ezért a *M. athalia* fenológiai alakjainak elemzése során ennek a két módszernek a kombinálását találtam a legmegfelelőbbnek a variancia szerkezetének, valamint a differenciálódás mintázatának az elemzésére.

Dolgozatom négy fő témakörének legfontosabb kérdései:

(i) Hány genetikailag differenciálódott evolúciósan jelentős egységet lehet elkülöníteni a *Mellicta* subgenuson belül a Kárpát-medencében?

(ii) Milyen trendek figyelhetők meg a *M. athalia* Kárpát-medencei populációiban a genetikai ill. morfometriai differenciálódás tekintetében, továbbá ezeknek mi lehet a háttere?

(iii) Milyen a genetikai ill. fenotípusos variabilitás mértéke a *Mellicta* subgenuson belül a Kárpát-medencében, különös tekintettel a *M. athalia* populációkra?

(iv) Milyen kapcsolat figyelhető meg a genetikai és a fenotípusos variabilitás szintje és a struktúrája között a *M. athalia* populációkban?

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Minták

Vizsgálataimhoz a Kárpát-medence 6 régiójának 17 gyűjtőhelyéről származó 22 mintát használtam fel, melyek 1999 és 2009 között lettek begyűjtve.

### 2.2. Enzimpolimorfizmus vizsgálatok

Poliakrilamid gélelektroforézis segítségével 15 különböző enzimlokuszt vizsgáltam meg (*Got*, *G6pdh*,  $\alpha$ *Gpdh*, *Hk*, *Idh*, *Mdh*, *Me*, *6Pgdh*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod1*, *Sod2*, *Acon*, *Aox*, *Est*).

Az elektroforézis a töltéssel rendelkező molekuláknak elektromos erőterben való elmozdulásán alapuló elválasztási technika. Az eljárás során a különböző méretű és töltésű fehérjék vándorlási sebességük alapján különülnek el. A gélelektroforézist követően a vizsgált lokuszok által meghatározott allélikus enzimváltozatok specifikus eljárások révén megfesthetők, így a géntermékek közvetlenül vizsgálhatók. Mivel az alloenzimek kodomináns öröklődést mutatnak, az enzimmintázat alapján meg lehet határozni a populációk genotípus- és allélgyakoriságait. Ezeknek az ismeretében a variabilitás mértékét jellemző paraméterek (lokuszonkénti átlagos allélszám, polimorf lokuszok aránya, átlagos heterozigóta gyakoriság) kiszámíthatók, másrészt különböző statisztikai módszerek megfelelő alkalmazásával a differenciálódás mértékét és a variabilitás szerkezetét is elemezhetjük.

### **2.3. Morfometriai vizsgálatok**

A morfológiai szintű variabilitást és differenciálódást hagyományos morfometria segítségével vizsgáltam a *M. athalia* lepkeszárnyakon és a hím ivarszerveken. A szárnyakon 12, míg az ivarszerveken 11 jelleget mértem le.

### **2.4. Statisztikai analízisek**

#### **2.4.1. Enzimpolimorfizmus**

A megfigyelt enzimmintázatok alapján azonosítottam az egyedek genotípusát, majd lokuszonként és populációnként genotípus- és allélgyakoriságokat számoltam. Ezeket a gyakorisági értékeket felhasználva

a variabilitás mértékének megállapítása érdekében első lépésben meghatároztam a polimorfizmus mutatóit: átlagos allélszám ( $n_A$ ), polimorf lokuszok aránya (P) és átlagos heterozigóta gyakoriság (H). Annak érdekében, hogy még részletesebb képet kapjak a variabilitás mértékéről, meghatároztam az egyes fajokra vonatkoztatott összallélszámot, valamint a különböző gyakoriságú allélok megoszlását.

Első lépésben a genetikai variancia szerkezetét F-statisztika segítségével elemeztem, melynek során meghatároztam a populációk közötti variancia komponens jellemző fixációs indexet ( $F_{ST}$ ).

A populációk differenciálódásának megállapítására Fisher-féle egzakt tesztet végeztem.

Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA) segítségével megvizsgáltam a teljes genetikai variancia megoszlását a hierarchia különböző szintjein. A hierarchia szinteket az egyes vizsgálatok célkitűzéseinek megfelelően állapítottam meg.

Az allélfrekvencia adatok alapján a populációk között Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokat számoltam ki, majd a távolságmátrix alapján UPGMA dendrogramot szerkesztettem. A fa minden elágazására ún. *bootstrap* értékeket kalkuláltam (1000 ismétléssel).

A populációk allélgyakoriságai alapján főkomponens analízist (PCA) végeztem, hogy megvizsgáljam, milyen mértékben különülnek el az egyes populációk a változók redukált terében.

A populációk genetikai struktúráját az ún. Bayes-féle hierarchikus klaszterezési módszerrel is analizáltam. Ennek segítségével meghatároztam a genetikai klaszterek legvalószínűbb számát (K) a mintákban és megállapítottam a megoszlásukat az egyedekben.

#### **2.4.2. Morfometria**

A populációk fenotípusos variabilitásának a mértékét a Levene-féle változók segítségével elemeztem. A teszt során a populációk Levene-féle változóinak átlagát hasonlítottam össze hierarchikus ANOVA alkalmazásával.

A teljes fenotípusos variancia megoszlását hierarchikus ANOVA segítségével elemeztem minden vizsgált jelleg esetében. A totális fenotípusos varianciát a hierarchia szinteknek megfelelően komponensekre bontottam, melyeket az egyes vizsgálatok célkitűzései alapján állapítottam meg. Párhuzamosan analizáltam a szárnyak, és az ivarszervek jellegét.

A populációk jellegátlagait felhasználva főkomponens analízist (PCA) végeztem a szárny és a genitália adataira külön-külön. Ebben a vizsgálatban a populációk elkülönülését vizsgáltam meg egy redukált faktortérben.

Végül a mérési alapadatokat felhasználva diszkriminancia analízis segítségével megállapítottam a különböző szempontok alapján kialakított populációcsoportok (földrajzi régiók és zónák, valamint fenológiai alakok) elkülönülésének a mértékét. A többi elemzéshez hasonlóan, a diszkriminancia analízist is párhuzamosan végeztem a szárny és a genitália adatokra.

### 2.4.3. Enzimpolimorfizmus és morfometria

A genetikai valamint morfometriai eredményeket felhasználva összehasonlítottam a *M. athalia* populációkban tapasztalt morfológiai (szárny és ivarszerv) és genetikai (enzimpolimorfizmus) variabilitás mértékét és szerkezetét. A genetikai és fenotípusos változatosság mértékének vizsgálata során különböző jelleg/marker párokat alakítottam ki, és a közöttük lévő összefüggések vizsgálatára Spearman-féle rangkorrelációt hajtottam végre.

Második lépésben a genetikai, valamint fenotípusos differenciálódás között kerestem párhuzamot. A genetikai differenciálódást az allélfrekvencia adatok alapján kiszámolt Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokkal, a morfometriai differenciálódást pedig a kanonikus változók átlagainak euklideszi távolságával jellemeztem. A távolságmátrixokat felhasználva Mantel tesztet hajtottam végre.

## 3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

### 3.1. A genetikai differenciálódás mintázata, evolúciósan szignifikáns és konzervációbiológiai egységek a *Mellicta* subgenuson belül

A vizsgált három *Melitaea*-faj enzimpolimorfizmus vizsgálata során három Evolúciósan Szignifikáns Egységet (ESU-t) különítettem el a *Mellicta* subgenuson belül a három fajnak megfelelően. Az eredményeim

alapján a *M. britomartis* és a *M. aurelia* közelebbi, míg a *M. athalia* távolabbi rokonnak bizonyultak. Ez ellentmond Wahlberg és mtsai. eredményeinek, mivel az ő vizsgálataikban a *M. athalia* és a *M. britomartis* bizonyult közeli rokonnak. Ugyanakkor azt meg kell jegyezni, hogy a két vizsgálat módszere alapvetően különböző volt (markerek típusa, minták száma és eredete, stb.). A *M. athalia* két fenológiai típusa között egyik analízis során sem mutatkozott különbség, azaz nem tekinthetők genetikailag differenciálódott csoportoknak. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az egy illetve két generáció megjelenése egyfajta fenotípusos plaszticitásnak tekinthető, vagyis az elkülönülés élőhelybeli sajátosságokon alapszik. Az analízisek eredményei a *M. athalia* populációk nagymértékű genetikai differenciálódását mutatták, így további kérdések merültek fel a faj genetikai struktúráját illetően.

### **3.2. Genetikai és morfometriai differenciálódás a *M. athalia* Kárpát-medencei populációiban**

A *M. athalia* genetikai valamint morfometriai adatainak párhuzamos elemzése során fényt derítettem a populációk differenciálódásának mintázatára. Minden genetikai analízisben kimutattam a populációk regionális differenciálódását. Ugyanakkor a genetikai adatok alapján megállapítottam, hogy a régiók két jól elkülöníthető csoportot alkottak a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően. A *M. athalia* két fenológiai típusa között nem mutatkozott genetikai differenciálódás egyik analízisben sem. A fenotípusos differenciálódás vizsgálata során szintén a populációk regionális differenciálódását tapasztaltam mind a szárny mind

pedig a hímivarszerv jellegeinél. A szárnyjellegek esetében a régiók csak részlegesen különböztek el a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően. Az ivarszerv jellegei esetében azonban ilyen mintázat nem volt megfigyelhető. Eredményeim azt tükrözik tehát, hogy a genetikai és a morfometriai vizsgálatok eredményei részben hasonlóak, ugyanis mindkét esetben kimutatható volt a populációk regionális differenciálódása. Ez a mintázat azonban az enzimpolimorfizmus vizsgálatok során bonyolultabbnak bizonyult, mivel ebben az esetben a régiókra ráépült egy magasabb hierarchia szint is, amelyben a földrajzi régiók a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően csoportosíthatók. Bár a mintavételi stratégiából adódóan nem zárható ki a genetikai klin megléte, azonban az eredmények sokkal erősebben támasztják alá a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence populációinak elkülönülését.

### **3.3. A genetikai és a fenotípusos variabilitás szintje a *Mellicta* subgenus fajainak Kárpát-medencei populációiban**

A genetikai variabilitást megvizsgálva a *Mellicta* subgenuson belül mindhárom faj populációiban magas szintű enzimpolimorfizmust tapasztaltam. A vizsgált 15 enzimlokusz közül mind rendelkezett alternatív allélokkal, sőt a legtöbb igen polimorfnek bizonyult. Bár a polimorfizmus mutatói mindhárom faj esetében magasnak mutatkoztak, a három faj közül *M. athalia* volt a legvariábilisabb.

Mivel a *Melitaea*-fajok az r-K kontinuum r-hez közelebbi végén helyezkednek el, populációikat jelentős mértékben érintik a sztochasztikus

hatások. Így intenzív drift hatás várható melynek következményeként a populációk variabilitását alacsony szintűnek várnánk. A dolgozatom eredményei ezzel ellentétben magas szintű variabilitást mutattak mindhárom faj esetében, tehát nem a drift tűnt a variabilitás szintjét befolyásoló elsődleges tényezőnek. Két további lehetséges tényező hatását elemeztem (általános ökológiai jellemzők eltérései, különös tekintettel a tápnövény hasznosítás spektrumának nagyságára; vizsgált populációk helyzete a faj areáján belül) oly módon, hogy a 3 *Mellicta* faj variabilitását a Melitaeini tribusz 4 további fajának (*Euphydryas maturna*, *E. aurinia*, *Melitaea phoebe* és *M. ornata*) enzimpolimorfizmus adataival hasonlítottam össze. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált fajok variabilitásának mintázatát a centrális–marginális hipotézis magyarázza meg a legteljesebben.

A morfológiai jelek változatossága sok vizsgálatban tükrözte a genetikai variabilitás szintjét és szerkezetét. Meglepő módon a Levene-változók százalékos értékei azt sugallták, hogy az ivarszerveken mért jelek variabilitása magasabb, mint a szárnyjellegé. Ez az eredmény váratlan, hiszen a szárnyak köztudottan ki vannak téve a környezeti tényezők hatásainak, míg az ivarszervek morfológiája feltehetően sokkal jobban behatárolt.

A *M. athalia* fenotípusos variabilitásának vizsgálata során a különböző analízisek arra világítottak rá, hogy sem a szárny, sem pedig az ivarszerv jelek variabilitásában nincs egyértelmű, szignifikáns különbség a fenotípusos variancia mértékében a hierarchia felső szintjén. Ugyanakkor a

két jellegcsoport esetében ellentétes tendenciát tapasztaltam a variabilitás mértékében a Kárpát-medence keleti, illetve nyugati területének populációi között. Míg a szárnyakon mért jellegek varianciája párhuzamos tendenciákat mutat a genetikai varianciával, addig az ivarszervek jellegeinél ellentétes trend volt megfigyelhető.

### **3.4. A genetikai és fenotípusos variabilitás szintje és struktúrája közötti korreláció a *M. athalia* populációiban**

A genetikai és a fenotípusos variabilitás szintje közötti korrelációs vizsgálat eredményei első megközelítésben azt mutatták, hogy a genetikai és morfológiai variabilitás között nincs szoros kapcsolat sem a szárnyak, sem pedig az ivarszerv jellegeit tekintve. A részletesebb elemzés azonban arra világított rá, hogy a szárnyjellegek két típusának (méret+alak és mintázat) variabilitása között nincs korreláció. Így ezt a két jellegcsoportot külön kezelve a vizsgálati eredmények azt tükrözték, hogy a kevésbé variábilis szárnyméret és alak jobban jelzi a genetikai variabilitás szintjét, mint a szárny mintázata, melyről számottevő mértékű plaszticitást tételezhetünk fel. Az a tény, hogy a méretet és alakot meghatározó jellegek fenotípusos varianciája alacsonyabb szintű, mint a mintázatot jellemzőké, valamint hogy a szárnyméret varianciája szignifikáns korrelációban van az enzimpolimorfizmus mértékével azt sugallja, hogy ezeknek a jellegeknek a fenotípusos varianciáját nagyrészt genetikai faktorok határozzák meg.

A genetikai és a fenotípusos differenciálódás mértékének összehasonlítása során végzett Mantel teszt eredményei azt mutatták, hogy

a szárny jellegeit tekintve szoros korreláció van a differenciálódás ezen két szintje között. Ugyanakkor érdekes, hogy a variabilitás szintjéhez hasonlóan a differenciálódás mértékében sem tapasztaltam korrelációt a genitália jellegei és az enzimpolimorfizmus között. Ráadásul a két morfometriai jellegcsoport (szárny-, és genitália jellegek) differenciálódása sem korrelált egymással. A korreláció hiánya arra utal, hogy eltérő környezeti tényezők hatnak a két morfológiai jellegcsoport fenotípusos variációjára.

#### **4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

1. A vizsgált három *Melitaea*-faj enzimpolimorfizmus vizsgálata során három Evolúciósan Szignifikáns Egységet (ESU-t) különítettem el a *Mellicta* subgenuson belül a három fajnak megfelelően. A *M. athalia* két fenológiai típusa között nem volt kimutatható különbség, azaz nem tekinthetők genetikailag önálló csoportnak. Ugyanakkor a *M. athalia* populációk genetikailag nagymértékben differenciálódtak.

2. A *M. athalia* populációk genetikai valamint morfometriai vizsgálata a populációk regionális differenciálódására világítottak rá. A genetikai struktúra azonban összetettebbnek bizonyult, mivel a földrajzi régiók a Kárpát-medence keleti-, illetve nyugati zónájának megfelelően csoportosíthatók voltak.

3. A *Mellicta* subgenuson belül megvizsgált három faj esetében magas szintű enzimpolimorfizmust tapasztaltam. Más *Melitaeini* fajokkal történő

összehasonlításban a jelenség magyarázatára a centrális–marginális hipotézist találtam a legteljesebbnek.

4. A *M. athalia* esetében sem a szárny, sem pedig az ivarszerv jellegek variabilitásában nem volt kimutatható egyértelmű, szignifikáns különbség a fenotípusos variancia mértékében a hierarchia felső szintjén (keleti,- ill. nyugati Kárpát –medence/fenológiai alakok).

5 A szárnyméret és alak varianciája szignifikáns korrelációban van az enzimpolimorfizmus mértékével, ami azt sugallja, hogy ezeknek a jellegeknek a fenotípusos varianciáját nagyrészt genetikai faktorok határozzák meg.

6. A genetikai és a fenotípusos differenciálódás mértékének összehasonlítása során a szárny jellegeit tekintve szoros korreláció van a differenciálódás ezen két szintje között.

7. A genitália jellegei és az enzimpolimorfizmus között sem a variabilitás szintjében, sem pedig a differenciálódás mértékében nem tapasztaltam korrelációt. Ráadásul a két morfometriai jellegcsoport (szárny- és genitáliajellegek) differenciálódása sem korrelált egymással. A korreláció hiánya arra utal, hogy eltérő környezeti tényezők hatnak a két morfológiai jellegcsoport fenotípusos varianciájára.

## 1. INTRODUCTION

It is widely accepted that due to growing anthropogenic influences natural habitats have become critically restricted and fragmented, which in turn has resulted in declining and isolated populations of certain species. These processes contribute to the dramatic increase of the number of threatened plant and animal species. As a consequence, results of conservation biological research have become significant in practical nature conservation. An important question in this field is what kind of evolutionary effects are at work in threatened populations and how they influence the level and structure of their genetic variation.

Butterfly species have long been considered as sensitive indicators of fragmented habitats. The quality and isolation of landscape is a critical factor for maintenance of metapopulations. Those species are especially vulnerable that are at the r end of the r-K continuum. Their populations are greatly exposed to stochastic events, since all offspring of a female might be affected by various environmental factors. Due to this special reproductive strategy genetic drift is likely to have a large effect on the genetic composition of their populations. When conservation practice lacks any background information on these processes no effective strategy can be developed because scientific basis is really important in conservation biology. For this reason beside surveys of demography and ecology investigation of genetic and morphometric variation is also necessary.

Species of the *Mellicta* subgenus are of obviously great conservation concern in Europe. *M. aurelia* Nickerl, 1840 and *M. britomartis* Assmann, 1847 are listed as vulnerable or declining in several countries of Europe, Heath Fritillary, *M. athalia* (Rottemburg, 1775) is a priority species of butterfly conservation in England. Moreover species of the *Mellicta* subgenus are often taxonomically difficult.

*Melitaea* species have high enzyme polymorphism (even comparing to other insects), thus they are particularly suitable organisms to investigate population structure in detail. Moreover their morphometric variability is also significant. For this reason studying the two ecotypes of *M. athalia* these two methods seemed to be the most appropriate to analyse the level of variation and the pattern of differentiation.

The most important questions concerning the four main parts of my thesis:

(i) How many genetically differentiated Evolutionary Significant Units can be estimated in the Carpathian basin, considering these three species?

(ii) What trends can be detected in *M. athalia* populations in the Carpathian Basin regarding genetic and morphometric differentiation? What can be the background of this pattern?

(iii) What is the level of genetic and phenotypic variation in the *Mellicta* subgenus in the Carpathian Basin particularly in *M. athalia* populations?

(iv) What is the relationship between the level of genetic and phenotypic variation and differentiation in *M. athalia*?

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Samples**

Samples were collected from six geographic region of the Carpathian Basin. Altogether 22 samples were collected from 17 populations between 1999 and 2009.

### **2.2. Enzyme studies**

Allozyme polymorphism was studied at 15 different loci by vertical polyacrylamide gel electrophoresis (*Got*, *G6pdh*, *αGpdh*, *Hk*, *Idh*, *Mdh*, *Me*, *6Pgdh*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod1*, *Sod2*, *Acon*, *Aox*, *Est*).

### **2.3. Morphometric studies**

Phenotypic variation was analysed by traditional morphometry on the wing and external genitalia of the male *M. athalia* individuals. In total 12 characters on the wing and 11 on the external genitalia were examined.

### **2.4. Statistical analyses**

#### **2.4.1. Enzyme polymorphism**

Genotype and allele frequencies were calculated on the basis of banding patterns. Measures of genetic variation (average number of alleles, proportion of polymorphic loci, average observed heterozygosity) were calculated for each sample. In order to get a more detailed picture on the

level of variation we calculated the number of common and unique alleles and the distribution of alleles with different frequencies for all species.

Genetic differentiation among the populations was first analysed by F-statistics. In this analysis, the between population component ( $F_{ST}$ ) of the total genetic variation was calculated.

An exact test of population differentiation was conducted to test for independence of the allelic composition of the populations.

Distribution of the total genetic variation at various levels of the hierarchy was studied by AMOVA. In this analysis, the distribution of total genetic variation was investigated at different levels of the hierarchy which were set according to the aims.

UPGMA dendrogram was constructed on the basis of Cavalli-Sforza & Edwards chord distances. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates.

Principal component analysis (PCA) was also carried out using the allele frequencies of the samples to show the size of overlap in their genetic composition in a reduced space of variables.

Finally the genetic structure was studied by Bayesian-clustering method where we could estimate the most probable number of genetically differentiated groups (K) and assign the individuals to these groups.

### **2.4.2. Morphometric study**

The phenotypic variation of the samples was characterised by the mean values of Leven's variables. The population averages of these variables were compared using hierarchical ANOVA.

Distribution of the total phenotypic variation at various levels of the hierarchy was studied by hierarchical ANOVA. All characters were analysed separately and then the percentages were averaged over the wing and genital characters independently. In this analysis, the distribution of total phenotypic variation was investigated at different levels of the hierarchy which were set according to the aims.

Two series of principal component analysis PCA were carried out using the sample averages of the characters.

Discriminant analysis was computed to determine the most probable sample the individuals belonged to. This analysis was carried out in three series where populations were grouped into (i) 6 geographic regions; (ii) two ecotypes; (iii) the East or West zones of the Carpathian Basin. All analyses were computed in parallel for wing and genital characters.

### **2.4.3. Enzyme polymorphism and morphometry**

Based on the genetic and morphometric data first the level of genetic and phenotypic variation was compared in *M. athalia* populations. Spearman rank correlation was carried out using different trait and marker pairs.

In the second step, the structure of variation was compared between allozyme and morphometric data. Genetic and morphometric distances were used to estimate the relationships between the trait-marker pairs regarding the level of differentiation. Cavalli-Sforza and Edwards chord distances were calculated on the basis of allele frequency data of the samples. Euclidean distances among the average canonical variables were computed and used as morphometric distances. Correlations between genetic and morphometric distance matrices were estimated by Mantel test.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Evolutionary Significant Units and Conservation Units in the *Mellicta* subgenus**

Three distinct Evolutionary Significant Units (ESUs) were detected within the *Mellicta* subgenus in the Carpathian Basin corresponding to the three species. The results revealed that *M. britomartis* and *M. aurelia* seem to be closely related, while *M. athalia* appears to be a further relative. This result contradicts to those of Wahlberg and his coworkers'.

In their tree, *M. athalia* and *M. britomartis* were closely related, while *M. aurelia* occurred in a neighbouring branch with other related species. Nevertheless, it is important to note that the methods of the two studies were greatly different considering the markers, samples, etc. None of my results supported the differentiation between the two ecotypes of *M. athalia*, that is, they cannot be considered as genetically separated groups. The apparent difference in the life cycle between the mono- and bivoltine ecotypes is probably the consequence of the high phenotypic plasticity of the species and it is probably the consequence of habitat quality. The results also indicated that *M. athalia* populations were highly differentiated from each other.

### **3.2. Patterns of genetic and morphometric differentiation in *Melitaea athalia* in the Carpathian Basin**

When analysing enzyme polymorphism and morphometric data in parallel I was able to describe the pattern of genetic and phenotypic differentiation in *M. athalia*. All genetic analyses suggested a clear regional pattern of differentiation. Moreover, the regions could be sorted into two groups representing the East and West parts of the Carpathian Basin. The two ecotypes of *M. athalia* were not separated in these analyses either implying that there are no genetic differences between them. The outcome of the morphometric studies of wings and genital organs showed a regional pattern of phenotypic differentiation as well. Considering wing characters, the separation between the East and West geographic zones of the Carpathian Basin was less clear than in the study of enzyme polymorphism.

This West-East separation, however, was not detected in the characters measured on the genital structures. Accordingly, the results of my work indicated that the structure of genetic and phenotypic variation exhibited certain similarities in *M. athalia*, as regional pattern of differentiation was detected for both types of variation. The geographic pattern, however, proved to be more complex in the genetic analyses as the regions composed two clear groups corresponding to the East and West geographic zones of the Carpathian Basin. Considering our sampling strategy the presence of a genetic cline cannot be completely ruled out. Nevertheless, the results support the West-East separation of the populations more strongly.

### **3.3. Level of genetic and morphometric variation in the species of *Melicta* subgenus in the Carpathian Basin**

Analysing the level of genetic variation in the *Melicta* subgenus, high enzyme polymorphism was found in all three species. All studied 15 enzyme loci had alternative alleles; moreover most of them were highly polymorphic. The classical parameters of genetic variation were high in all three species, but the *M. athalia* seemed to be the most divers.

Since *Melitaea* species take place at the r side of the r-K continuum, stochastic events affect their populations to a great extent. Thus, genetic drift was expected resulting in low level of variability within their populations. As opposed to my expectations the results indicated an extremely high level of enzyme polymorphism. Looking for the explanation of this high variation the effect of two further possible factors was considered: (i) general ecology of the species especially the range of

host plant utilization; (ii) the site of the studied populations relative to the distribution area of the species. Moreover, the genetic data of the three *Meliticta* species were compared to those of four other species of the Melitaeini tribus (*Euphydryas maturna*, *E. aurinia*, *Melitaea phoebe* and *M. ornata*). The results showed that the pattern of genetic variation in the seven species was best explained by the central-marginal hypothesis.

In the analysis of phenotypic variation first we compared the different morphometric characters. Surprisingly, the Levene-variables expressed as percentages of trait averages suggested that the variation of characters of external genitalia were higher than those of the wing traits. This result was unexpected, as it is generally known that wing traits are more affected by environmental factors, while the morphology of external genitalia is more determined by genetic factors.

In many surveys, the genetic structure of populations was reflected in the variability of morphological characters. Thus, we contrasted the phenotypic and genetic variation in the *M. athalia* populations studied. Both types of variation exhibited a geographic pattern; that is a more or less expressed regional differentiation was observed in the analysis of enzyme polymorphism and morphometric traits of the wings and external genitalia as well. Few significant differences were found in the phenotypic variation of the characters of the wings and genitalia between either the two ecotypes or the two zones of the Carpathian Basin. Nevertheless a tendency was found for higher variation in the populations of the East zone of the Carpathian Basin for several traits of the wings. This tendency was in accordance with that observed for enzyme polymorphism. In contrast, the

traits of the genital organs showed an opposite tendency; i.e. populations of the West zone of the Carpathian Basin seemed to be more variable than those of the East one.

### **3.4. Correlations between genetic and phenotypic variation and differentiation in *M. athalia***

Testing the correlation between the level of phenotypic and genetic variation at first I did not detect significant relationship between them neither for the traits of external genitalia nor for the wing characters. In a more detailed analysis, however, I found that the two types of wing traits (size+shape and pattern) are not correlated with each other. Accordingly, I handled the two types of wing characters separately in all further analyses. The results of these new analyses indicated that variation in the size and shape of the wings which are less variable and less influenced by environmental factors is significantly correlated to the level of enzyme polymorphism. That is, phenotypic variation of these characters is a better indicator of genetic variation than that of wing pattern which is assumed to be more plastic. These results suggested that the phenotypic variance of size and shape of wings was mainly determined by genetic factors. Nevertheless, the level of morphometric variation of the traits of genitalia was not correlated either to the amount of enzyme polymorphism or to that of phenotypic variation in the size and shape of the wings.

I have used a series of Mantel tests to compare the level of genetic and morphometric differentiation among the *M. athalia* populations. The results indicated a relatively strong correlation between phenotypic differentiation

estimated on the basis of the size and shape characters of the wings and genetic differentiation characterised by enzyme polymorphism. No correlation was found, however, between the level of genetic and phenotypic differentiation when the traits of external genitalia were used in the analyses. Moreover, phenotypic differentiation was not correlated either between the two types of morphometric traits. The lack of correlation between wing traits and those of the genitalia implies that different environmental factors influence them.

#### **4. NEW RESULTS AND CONCLUSION**

1. Three distinct Evolutionary Significant Units (ESUs) were detected within the *Mellicta* subgenus in the Carpathian Basin corresponding to the three species. No differentiation was detected between the two ecotypes of *M. athalia*, that is, they cannot be considered as genetically separated groups. At the same time *M. athalia* populations were highly differentiated from each other.

2. Parallel analyses of genetic and morphometric variation suggested a clear regional differentiation between *M. athalia* populations. Moreover regional pattern seemed to be more complex genetically, as regions composed two geographic zones corresponding to the East and West parts of the Carpathian Basin.

3. Analysing the level of genetic variation in the *Mellicta* subgenus, high enzyme polymorphism was found in all three species. In comparison with

other species of the Melitaeini tribus, the central-marginal hypothesis seemed to be the best explanation of it.

4. No clear differences were observed in the level of morphometric variation either for the wing characters or for genital traits on the highest level of the hierarchy (East and West Carpathian Basin/ecotypes).

5. Phenotypic variation of the size and shape of the wings is significantly correlated to the level of enzyme polymorphism. These results suggested that the phenotypic variance of these traits was probably determined by genetic factors to a great extent.

6. Strong correlation was detected between phenotypic differentiation estimated on the basis of the wing traits and genetic differentiation characterised by enzyme polymorphism.

7. In the case of external genitalia phenotypic differentiation was not correlated to the structure of genetic variation. Moreover, phenotypic differentiation was not correlated either between the two types of morphometric traits (wing and external genitalia). The lack of correlation between wing traits and those of the genitalia implies that different environmental factors influence them.

# BÁTORI EDIT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK JEGYZÉKE

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKLÁCIÓK

### Cikkek:

- Bátori, E.,** Pecsénye, K., Bereczki, J. & Varga, Z. (2012) Patterns of genetic and taxonomic differentiation in three *Melitaea* (subg. *Mellicta*) species (Lepidoptera, Nymphalidae, Nymphalinae). *Journal of Insect Conservation*, **16**:647-656 (IF: 1,688)
- Bátori, E.,** Pecsénye, K., Tóth, J.P. & Varga, Z. (2012) Patterns of genetic and morphometric differentiation in *Melitaea (Mellicta) athalia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **107 (2)**: 398-413 (IF:2,193)

### Előadások (nemzetközi):

- Bátori, E.,** Pecsénye, K., Bereczki, J. & Varga, Z. (2009) Patterns of genetic and taxonomic differentiation in three species of the *Mellicta* subgenus. ConGen Workshop, Debrecen.

### Poszter (nemzetközi):

- Bátori, E.,** Pecsénye, K., Tóth, J.P. & Varga, Z. (2012) Patterns of genetic and morphometric differentiation in *Melitaea (Mellicta) athalia* (Lepidoptera: Nymphalidae). ConGress Workshop, Debrecen.
- Bátori, E.,** Pecsénye, K., Tóth, J.P. & Varga, Z. (2012) Genetic variation in *Melitaeini* butterflies in the Carpathian Basin. CLIMIT, final meeting, Halle.

## EGYÉB PUBLIKÁCIÓK:

### Tudományos diákköri dolgozat:

**Juhász, E.**, (2007) Morfometriai vizsgálatok a díszes tarkalepke – *Euphydryas maturna* (Linnaeus, 1758) hazai populációiban. OTDK, Debrecen.

### Cikkek:

Berezcki, J., Tóth, J.P., Tóth, A., **Bátori, E.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. (2011) The genetic structure of phenologically differentiated Large Blue (*Maculinea arion*) populations (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Carpathian basin. *European Journal of Entomology*, **108**: 519-527 (IF: 1,061)

Hollós, A., Pecsénye, K., Berezcki, J., **Bátori, E.**, Rákósy, L. & Varga, Z. (2012) Pattern of genetic and morphometric differentiation in *Maculinea nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Carpathian Basin. *Acta Zoologica Hungarica*, **58**(1):87-103 (IF: 0,564)

### Előadások (nemzetközi):

Pecsénye, K., Berezcki, J., Tóth, A., Meglécz, E., Peregovits, L., **Juhász, E.** & Varga, Z. (2007) Patterns of genetic and taxonomic differentiation in selected butterfly species. Fauna Pannonica, Kecskemét. Abstract: pp. 53.

Pecsénye, K., Berezcki, J., Tóth, A., Meglécz, E., Peregovits, L., **Juhász, E.** & Varga, Z. (2007) Genetic differentiation among the Hungarian populations of *Euphydryas maturna* and *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae). Fauna Pannonica, Kecskemét. Abstract: pp. 64.

Pecsénye, K., Berezcki, J., Tóth, A., Meglécz, E., Peregovits, L., **Juhász, E.** & Varga, Z. (2009) Genetic differentiation among the Hungarian populations of *Euphydryas maturna* and *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae). ConGen Workshop, Debrecen.

Pecsénye K., **Bátori E.**, Craioveanu C., Rákósy L., & Varga Z. (2012). Patterns of genetic and morphometric differentiation in *Maculinea nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae) in eastern Central Europe. ConGress Workshop, Debrecen. Abstract: pp. 27.

### **Előadások (magyar):**

- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tóth, A., **Juhász, E.** & Varga, Z. (2008) Lepke populációk genetikai struktúrájának vizsgálata: természetvédelmi vonatkozások. V. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Nyíregyháza. Absztrakt: pp. 18.
- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tóth, J.P., **Bátori, E.**, Hollós, A. (2010) *Maculinea* a populációgenetika szemszögéből. A Magyar Rovartani Társaság 784. Ülése, Budapest.

### **Poszter (nemzetközi):**

- Tóth, J.P., Bereczki, J., **Bátori E.**, Szabó, S. & Varga, Z. (2012) Host plant utilization ability in two closely related *Melitaea* species. CLIMIT final meeting, Halle.

### **Könyvfejezetek:**

- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tóth, A., Meglécz, E., Peregovits, L., **Juhász, E.** & Varga, Z. (2007) A populációstruktúra és a genetikai variabilitás kapcsolata védett nappalilepke-fajainknál. In: Forró, L. & Ronkay, L. (szerk.) *A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása*. Magyar Természetudományi Múzeum, Budapest, pp. 241-260.