

DE-TTK



1949

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

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Bátori Edit

Témavezetők: Dr. Pecsénye Katalin
Dr. Varga Zoltán

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2013

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács **Juhász-Nagy Pál** Doktori Iskola **Biodiverzitás** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2013. április. 04.

.....
Bátori Edit

Tanúsítom, hogy Bátori Edit doktorjelölt 2008-2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biodiverzitás** programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2013. április. 04.

.....
Dr. Pecsénye Katalin
egyetemi docens

Tanúsítom, hogy Bátori Edit doktorjelölt 2008-2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biodiverzitás** programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2013. április. 04.

.....
Prof. Dr. Varga Zoltán
professzor emeritusz

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

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

Írta: Bátori Edit okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
(Biodiverzitás programja) keretében

Témavezető: Dr. Pecsénye Katalin, Dr. Varga Zoltán

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Pócsi István
tagok: Dr. Péntzes Zsolt
Dr. Rácz István

A doktori szigorlat időpontja: 2012. szeptember 12.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Gyűjtőhelyek:

Toh: Tohonya-völgy

Ter: Teresztenye

Szh: Szőlőhegy

Det: Dénes-töbör

Ver: Csákvár

Val: Válaszút (Răscruți)

Srd: Sárd (Sardu)

Lon: Lónyai erdő

Boc: Bockereki erdő

Fül: Füleld

Kh: Kaszonyi-hegy

FH: Fényi erdő (határszél)

FO: Fényi erdő (Ömböly)

Api: Apátistvánfalva

Kv: Kétvölgy

KS: Szomoróc

Het: Hetefejércse

Cluj: Kolozsvár (Cluj-Napoca)

Földrajzi régiók:

Órs: Órség

Vér: Vértes

Nyír: Nyírség

Ber: Beregi-sík

Erd: Erdély

Fajok:

M. ath. 1: egy generációs *M. athalia*

M. ath. 2: két generációs *M. athalia*

M. brito.: *M. britomartis*

M. aur.: *M. aurelia*.

Enzimek:

Got: glutamát-oxálacetát-transzamináz

G6pdh: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz

α Gpdh: α -glicerofoszfát-dehidrogenáz

Hk: hexokináz

Idh: izocitrát-dehidrogenáz

Mdh: malát-dehidrogenáz

Me: malik enzim

6Pgdh: 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz

Pgi: foszfo-glükóz-izomeráz

Pgm: foszfo-glüko-mutáz

Sod1: szuperoxid-dizmutáz-1

Sod2: szuperoxid-dizmutáz-2

Acon: akonitáz

Aox: aldehyd-oxidáz

Est: észteráz

Szárnyjellegek:

eh: elülső szárny hossza

eosh: elülső szárny oldalsó szegély hossza

β : elülső szárny csúcsi szöge

hsh: hátsó szárny hossza

hhsh: hátsó szárny hátsó szegély hossza

γ : a hátsó szárny alapi szöge

sfa, sfb: a negyedik sapkafoltra illesztett háromszög két oldalának hossza

sfc, sfd: az ötödik sapkafoltra illesztett háromszög két oldalának hossza

u, t: a negyedik és ötödik sapkafoltra illesztett háromszögek két oldala által közbezárt szög

Ivarszervjellegek

a: a saccus centrális bemetszésének hossza

b: az uncus hossza

c: az uncus szélessége

d: a harpe belső ívének hossza

e: a harpe külső ívének hossza

f: a harpe magassága

h: a processus posterior alapi szélessége

i: a processus posterior belső oldalának hossza

j: a processus posterior legnagyobb csúcsának hossza az alaptól számítva

k: a processus posterior külső oldalának hossza

m: a harpe görbületének a mértéke

Variancia komponensek:

CsK: a csoportok közötti variancia komponens

CsP: a populációk között a csoporton belüli variancia komponens

PK: populációk közötti variancia komponens

PB: populációkon belül az egyedek közötti variancia komponens

FK: a két fenológiai típus közötti variancia komponens

FR: a két fenológiai típuson belül a régiók közötti variancia komponens

RB: a régiókon belüli variancia komponens

ZK: a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence közötti variancia komponens

ZR: a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencén belül a régiók közötti variancia komponens

Populációgenetikai paraméterek:

N: lokuszonkénti átlagos mintaszám

n_A: lokuszonkénti átlagos allélszám

P: polimorf lokuszok aránya

H: átlagos heterozigóta gyakoriság

F_{IS}: a mintákon belüli varianciát jellemző index

F_{ST}: fixációs (a minták közötti varianciát jellemző) index

n: differenciáló lokuszok száma

Távolságmátrixok:

Gen: Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok mátrixa

Szt: a szárnyjellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa

Iv: az ivarszerv jellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa

Szma: a szárnyméret és alak jellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa

Sap: a sapkafolt jellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa

Variabilitást jellemző rangok:

Gen: a genetikai variabilitást jellemző rangok

Szt: a szárnyjellegek variabilitását jellemző rangok az összes jellegre vonatkozóan

Iv: az ivarszerv jellegek variabilitását jellemző rangok

Szma: a szárnyméret és alak jellegeinek variabilitását jellemző rangok

Sap: a sapkafolt jellegeinek variabilitását jellemző rangok

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	15
2.1. Mikroevolúciós folyamatok és azok hatása a populációkban, populációrendszerekben	15
2.2. A variabilitás és a differenciálódás vizsgálata természetes populációkban.....	18
2.2.1. Enzimpolimorfizmus	18
2.2.2. Morfometria.....	21
2.3. A <i>Melitaea</i> (subg. <i>Mellicta</i>) fajok ökológiai jellegzetességei	23
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
3.1. Gyűjtőhelyek	26
3.2. A minták előkészítése és feldolgozása	27
3.3. Enzimpolimorfizmus vizsgálatok.....	27
3.4. Morfometriai vizsgálatok	28
3.4.1. Szárnymorfometria	28
3.4.2. Ivarszerv morfometria	29
3.5. Statisztikai analízisek	31
3.5.1. Enzimpolimorfizmus	31
3.5.2. Morfometria.....	33
3.5.3. Enzimpolimorfizmus és morfometria.....	34
4. A GENETIKAI DIFFERENCIÁLÓDÁS MINTÁZATA, EVOLÚCIÓSAN SZIGNIFIKÁNS ÉS KONZERVÁCIÓBIOLÓGIAI EGYSÉGEK A <i>MELLECTA</i> SUBGENUSON BELÜL	36
4.1. Bevezetés.....	36
4.2. Eredmények	37
4.3. Eredmények megvitatása.....	44
5. GENETIKAI ÉS MORFOMETRIAI DIFFERENCIÁLÓDÁS A <i>M. ATHALIA</i> KÁRPÁT-MEDENCEI POPULÁCIÓIBAN	47
5.1. Bevezetés.....	47
5.2. Eredmények.....	49
5.2.1. Az enzimpolimorfizmus vizsgálat eredményei	49
5.2.2. A morfometriai vizsgálatok eredményei	56
5.3. Eredmények megvitatása.....	63
6. A GENETIKAI ÉS A FENOTÍPUSOS VARIABILITÁS SZINTJE A <i>MELLECTA</i> SUBGENUS FAJAINAK KÁRPÁT-MEDENCEI POPULÁCIÓIBAN.....	66
6.1. Bevezetés.....	66
6.2. Eredmények	68

6.2.1.	A genetikai variabilitás szintje a <i>Mellicta</i> subgenusban a három vizsgált fajt összehasonlítva	68
6.2.2.	A <i>M. athalia</i> genetikai variabilitása	70
6.2.3.	A <i>M. athalia</i> fenotípusos variabilitása.....	74
6.2.3.1.	A szárny jellegeinek variabilitása.....	75
6.2.3.2.	A hímivarszerv jellegeinek variabilitása	79
6.3.	Eredmények megvitatása.....	82
7.	A GENETIKAI ÉS A FENOTÍPUSOS VARIABILITÁS SZINTJE ÉS STRUKTÚRÁJA KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ A <i>M. ATHALIA</i> POPULÁCIÓIBAN.....	91
7.1.	Bevezetés.....	91
7.2.	Eredmények.....	95
7.2.1.	A genetikai és fenotípusos variabilitás szintjének kapcsolata.....	95
7.2.2.	A genetikai és a fenotípusos differenciálódás kapcsolata	98
7.3.	Az eredmények megvitatása.....	103
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	107
9.	SUMMARY	112
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	117
11.	IRODALOM.....	118
12.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	137
	FÜGGELÉK.....	137

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi évtizedekben egyre intenzívebben jelentkező antropogén hatások a természetes életterek beszűkülését, feldarabolódását, degradációját, bizonyos fajok népességeinek egyedszámcsökkenését, a populációk fragmentálódását és izolációját eredményezték (Opdam 1988; Diamond 1989; Settele és mtsai. 1996; Thomas 2000; Ricketts 2001; Ries és Debinski 2001; Fahrig 2003; Bergmann és mtsai. 2004; Binzerhöfer és mtsai. 2005; Van Swaay és mtsai. 2006). Ezek a folyamatok különösen élesen jelentkeztek a hagyományos használattal kialakított és fenntartott élőhelyeken, amilyenek a hegy- és dombvidéki kaszálórétek, fás legelők, legelőerdők, kaszált szórványgyümölcsösök, amelyek korábban az élővilág jelentős gazdagságát őrizték. Az intenzívebbé váló tájhasználat, valamint a természetközeli élőhelyek zsugorodása nagymértékben hozzájárult a veszélyeztetett növény- és állatfajok számának drasztikus növekedéséhez (IUCN 2008), így a gyakorlati természetvédelem számára kiemelkedő jelentőségűvé váltak a konzervációbiológiai kutatások. Ezek elsősorban a veszélyeztetett fajok populációira irányulnak, melyek rendszeres tanulmányozása révén képet kaphatunk egy közösség, vagy annak bizonyos részeinek diverzitásáról (Erhardt 1985; Noss 1990; Simberloff 1998 a, b; Fleishmann és mtsai. 2005).

A nappali lepkék (Lepidoptera: Papilionoidea) a fragmentált élőhelyek érzékeny indikátorainak bizonyultak (Erhardt 1985; Murphy és Wilcox 1986; Erhardt és Thomas 1991; Launer és Murphy 1994; New 1997; Steffan-Dewenter és Tschartnke 2000; Weibull és mtsai. 2000; Shreeve és mtsai. 2001; Thomas 2005). Metapopulációik fennmaradása szempontjából az élőhely minősége és izolációjának foka igen fontos tényezők, különös tekintettel az imágó előtti egyedfejlődési stádiumokra, mivel a peték és a bábok rögzítettek, a hernyók pedig kis mobilitásúak (Porter 1992; Fartmann 2004). A kedvezőtlen időjárás, táplálékhiány, vagy az élőhely pusztulásakor

ezek nem tudnak elmenekülni, ráadásul az r-K kontinuum r-hez közelebbi végén lévő lepkefajok esetében a sztochasztikus eseményekből fakadó káros hatások egy nőstény csaknem összes utódát egyszerre érintik. Így ezekben az esetekben, a populációkban a véletlen hatások felerősödnek. Minthogy a különböző jelenségek háttérében 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 populációk diverzitásának vizsgálatában a genetikai markerek fejlődésével egyre inkább központi szerepet kapott az „Evolúciósan Jelentős Egység” (Evolutionary Significant Unit, ESU) fogalma, melyet először Ryder (1986) vezetett be. Az elmúlt évtizedekben az ESU fogalma sokat változott (Crandall 2000), eredetileg genetikailag és adaptívan differenciálódott populációkkal azonosították (Ryder, 1986). Később a reprodukív izoláció révén különvált populációcsoportokat tekintették ESU-nak (Waples, 1991). Ezt követően Moritz (1994) reciprok monofiletikus egységként értelmezte a fogalmat, azaz a különböző ESU-k más mtDNS haplotípusokat tartalmaznak és a nukleáris markerek tekintetében is jelentősen eltérő frekvencia-eloszlást mutatnak. Manapság a Crandall (2000) által definiált forma az elfogadott, aki hangsúlyozta a genetikai mellett az ökológiai elkülönülés/egyediség fontosságát a különböző ESU-k esetében, továbbá rávilágított arra a problémára is, hogy a genetikai és ökológiai differenciálódás folytonos, míg az ESU dichotómikus kategória (ESU vagy sem). Ez a megközelítés a mai napig általános a konzervációgenetikai kutatásokban (Stefanni és Thorley 2003; Avise 2005; Lozier és mtsai. 2008; Peacock és mtsai. 2010; Paplinska és mtsai. 2011). Egy másik fontos konzervációbiológiai egységnek tekinthető az ökológiailag vagy demográfiailag elkülönült populációk egységét alkotó „Funkcionális Konzervációs Egység” (Functional Conservation Unit, FCU)

(Maes és mtsai. 2004; Allendorf és Luikart 2007), melyet általában az ESU-n belül különítenek el. Ezek az egységek olyan populációkat reprezentálnak, amelyek fontosak az ESU-k hosszú távú megőrzése szempontjából (Hughes és mtsai. 1997; Vila és mtsai. 2006). Ennek a kifejezésnek a használata azonban nem teljesen egyértelmű, ugyanis a demográfiai függetlenség nem feltétlenül von maga után genetikai differenciálódást.

A konzervációbiológusok sok esetben a taxonómusokra hagyatkoznak, hogy meghatározzák a különböző konzervációs egységeket. A taxonómiai osztályozás azonban főként morfológiai karaktereken alapszik. A taxonok pusztán morfológiai alapon történő elkülönítése viszont félrevezető lehet (Schmitt és mtsai. 2005), akár a magas szintű intraspecifikus változatosság, akár a közel rokon fajok hasonló megjelenése, úgynevezett „rejtett fajok” („cryptic species”) megléte miatt (pl. *Leptidea* sp.: Dincă és mtsai. 2011 a, vagy *Erebia* sp.: Haubrich és Schmitt 2007). Ezért a morfológiai illetve genetikai információk együttes figyelembevétele lehet a megoldás az esetleges tévedések elkerülésére. Így a morfológiai és genetikai variancia párhuzamos vizsgálata segíthet a variabilitás, valamint a differenciálódás szintjének illetve mintázatának feltárásában, és ezzel a megfelelő konzervációbiológiai egységek meghatározásában.

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 (Warren 1987 a, b, c; Hodgson mtsai. 2009). Emellett a *Mellicta* subgenus még taxonómiai szempontból is viszonylag bonyolult csoportnak tekinthető (lásd 2.3 fejezet).

Kutatásom egyik célja a *Mellicta* subgenus fajainak (*Melitaea athalia*, *Melitaea britomartis*, *Melitaea aurelia*) Kárpát-medencei populációiból származó egyedek részletes genetikai analízise volt, hogy feltárjam a genetikai variabilitás szintjét és szerkezetét a subgenus fajai között és azokon belül. Annak megállapítása is célom volt, hogy milyen mértékű az elkülönülés a *M. athalia* két fenológiai típusa között. Továbbá célul tűztem ki, hogy meghatározzam a genetikailag differenciálódott evolúciósan jelentős egységek (ESU) számát a *Mellicta* subgenuson belül a Kárpát-medencében. Vizsgálataim eredményeként komplex képet szerettem volna kapni a genetikai variabilitás mértékéről és szerkezetéről.

Ezen eredményeimre alapozva célul tűztem ki továbbá a Kárpát-medencei *Melitaea*-fajok populációiban a fajon belüli genetikai, és morfometriai variabilitás párhuzamos elemzését.

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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Mikroevolúciós folyamatok és azok hatása a populációkban, populációrendszerekben

A konzervációbiológiai kutatások egyik fontos vizsgálati területe, hogy az egyes fajok populációiban milyen evolúciós erők hatnak, és ezek milyen módon befolyásolják a populációk genetikai struktúráját, a variabilitás mértékét illetve annak szerkezetét (Frankham és mtsai. 2002; Allendorf és Luikart 2007). A genetikai diverzitás képezi ugyanis a változó környezethez való alkalmazkodás alapját, azaz ez határozza meg egy adott populáció evolúciós potenciálját (Hedrick 1985; Ridley 1996; Stearns és Hoekstra 2000; Futuyma 2005).

A különböző evolúciós erők hatását egy populáción belül vizsgálva megállapítható, hogy a genetikai változás intenzitása szempontjából a szelekció és a genetikai sodródás (drift) hatása kiemelkedő jelentőségű. Mindkettő igen jelentős és viszonylag gyors változásokat eredményez egy populációban, melyek hosszú távon természetesen a fenotípusos megjelenést is befolyásolják (Hedrick 1985; Hartl és Clark 1989; Pecsénye és mtsai. 2006). A fent említett folyamatok hatásának különösen a kis, izolált populációk vannak kitéve, mert bennük jelentős genetikai változások mehetnek végbe.

A genetikai sodródás véletlenszerű folyamatok összessége, melyeknek a kis populációkban való felerősödése hosszú távon csökkenti a populációk variabilitását. A folyamat a ritka allélok elvesztését és a gyakoriak fixálódását eredményezi (Frankham és mtsai. 2002; Allendorf és Luikart 2007). Emellett a kis populációkban fellépő beltenyésztés is erodálja a genetikai variabilitást azáltal, hogy a genotípus gyakoriságok eltolódnak a fokozódó homozigótaság irányába (Hedrick 1985; Maynard Smith 1989).

A genetikai sodródás és a beltenyésztés tehát összefonódik és bizonyos értelemben felerősítik egymás hatását, így a kis populációk fennmaradását veszélyeztetik (Lande és Barrowclough 1987; Maynard Smith 1989).

A genetikai sodródás nemcsak a populációméret csökkenése miatt fokozódhat, hanem egy adott faj életmenetéből adódóan is lehet nagy mértékű. Például igaz ez azokra a tipikusan r-stratégista tarkalepke fajokra (Lepidoptera: Nymphalidae: Nymphalinae), ahol a nőstények 1-2 nagy csomóba rakják le jelentős mennyiségű (2-300) petéiket. Ráadásul az első lárvastádiumokban a hernyók együtt, közös szövedékben (hernyófészkekben) fejlődnek. Ebből adódóan a sztochasztikus események káros hatásai egy nőstény szinte összes utódát egyszerre érinthetik, azaz a populációban a véletlenek hatása felerősödik (Weidemann 1995; Pecsénye és mtsai. 2007 b).

Egy másik igen fontos evolúciós erő a szelekció, amely a környezet és a populáció közötti kölcsönhatás eredménye. A szelekció során a környezet tulajdonképpen differenciálisan hat a populáció feno- illetve genotípusaira, aminek következménye lehet a populáció egyre fokozódó adaptációja (Hedrick 1985; Ridley 1996; Stearns and Hoekstra 2000; Futuyma 2005). Ennek következtében az egyes feno- ill. genotípusok viabilitása és/vagy fertilitása eltérő lesz, azaz megváltozik a rátermettséjük. A szelekció hatása annál intenzívebb, minél nagyobb különbségek vannak az egyes feno- ill. genotípusok rátermettségekben az adott környezetben (Hedrick 1985; Maynard Smith 1989; Hartl 1998). A folyamat hatására a populáció genetikai összetétele úgy változik meg, hogy az adott közösség közben egyre jobban alkalmazkodik a környezetéhez.

A fajok azonban a természetben – az esetek túlnyomó többségében – nem egyetlen populációként, hanem populációrendszereket alkotva vannak jelen. A sztochasztikus folyamatok a populációrendszerekben a rendszer tagjainak egyre nagyobb mértékű differenciálódását eredményezik (Wright 1978; Hedrick 1985; Hartl 1998).

Ha a populációk eltérő környezetben élnek, akkor különböző irányú szelekciós hatásoknak vannak kitéve, melyek eredményeképpen a populációk genetikai összetétele különbözővé válik, így a szelekció is vezethet differenciálódáshoz. Azonban a populációrendszerekben ezzel egyidejűleg a populációk közötti migráció következtében fellépő génáramlással is számolni kell, amely minél erősebb, annál inkább ellensúlyozza a kapcsolatban álló populációk közötti differenciálódást (Wright 1978; Lowe és mtsai. 2004). Egy populációrendszerben tehát végeredményben a genetikai differenciálódás és a migráció eredményeként fellépő génáramlás az a két hatás, amely kialakítja a genetikai variancia mintázatát (Hedrick 1985; Frankham és mtsai. 2002; Beebe és Rowe 2004; Allendorf és Luikart 2007).

A varianciának földrajzi mintázata abban az esetben alakulhat ki, ha a közeli populációk között a génáramlás hatása erősebb, mint a távoli populációk között (Peterson és Denno 1998; Gorrochotegui-Escalante és mtsai. 2000; Pogson és mtsai. 2001; Garnier és mtsai. 2004; Watts és mtsai. 2004). Ha azonban a differenciálódás nagyon magas szintű, akkor ezt még a közeli populációk között sem tudja ellensúlyozni a migráció. Ilyenkor tehát nem alakul ki a differenciálódás földrajzi mitázata (Bereczki és mtsai. 2005; Pecsénye és mtsai. 2005, 2006, 2007). Magas szintű differenciálódás alakulhat ki egy populációrendszerben például akkor, ha a sztochasztikus hatások erőteljesek. A variabilitásnak azonban akkor sem lesz földrajzi mintázata, ha az adott faj diszperziós képessége kiváló, és így igen hatékony a génáramlás a populációrendszerben (Janson 1987; Bohonak 1999; Habel és mtsai. 2010).

A genetikai, ezen keresztül pedig a fenotípusos variabilitás, ill. differenciálódás kialakításában alapvetően a fent említett evolúciós erők játszanak szerepet. Kutatásaimban tehát ezeket a hatásokat kell figyelembe venni az általam vizsgált lepkefajok genetikai, valamint morfológiai elemzése során.

2.2. A variabilitás és a differenciálódás vizsgálata természetes populációkban

Természetes populációkban a genetikai diverzitás különböző szinteken jelentkezhet: (i) morfológiai szintű variabilitás; (ii) kromoszómális polimorfizmus; (iii) enzimpolimorfizmus; (iv) DNS-szintű variabilitás.

2.2.1. Enzimpolimorfizmus

A genetikai variancia tanulmányozására munkám során az enzimpolimorfizmus vizsgálatát alkalmaztam. Az ugyanazon lokuszon előforduló allélok által kódolt enzimfehérjék változatai (alloenzimek) elektroforézis alkalmazásával választhatók el. (Richardson és mtsai. 1986; Murphy és mtsai. 1990; May 1992). 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 (Murphy és mtsai. 1990; Avis 1994; Leberg 1996). A gélelektroforézist követően a vizsgált lokuszok által meghatározott allélikus enzimváltozatok specifikus eljárások révén megfesthetők, így a géntermékek közvetlenül vizsgálhatók (Harris és Hopkinson 1976; Murphy és mtsai. 1990). Mivel az alloenzimek kodomináns öröklődést mutatnak, a különböző genotípusok elkülöníthetők. 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 (Schmitt és Seitz 2001; Bereczki és mtsai. 2005; Schmitt és mtsai. 2006 a), másrészt különböző statisztikai módszerek megfelelő alkalmazásával a differenciálódás mértékét és a variabilitás szerkezetét is elemezhetjük (például különböző lepkefajokban: *Lycaenidae*: Aagaard és mtsai. 2002; *Melanargia galathea*:

Schmitt és mtsai. 2005, 2006a, b; *Boloria aquilonaris*: Vandewoestijne és mtsai. 2004; *Maculinea alcon*: Bereczki és mtsai. 2005, 2006; *Erebia medusa*: Schmitt és Müller 2007; Hesperiidae: Louy és mtsai. 2007; *Aricia artaxerxes*: Pecsénye és mtsai. 2007; *Coenonympha pamphilus*: Besold és mtsai. 2008; *Erebia euryale*: Schmitt és Haubrich 2008).

Az enzimpolimorfizmus vizsgálatának előnyei és hátrányai is vannak. A módszer egyik előnye, hogy nagy mennyiségű adat áll a rendelkezésünkre különböző állatcsoportokra vonatkozóan (pl. nappali lepkék: Schmitt 1999; Schmitt és Seitz 2001, 2002; Aagaard és mtsai. 2002; Schmitt és mtsai. 2002; 2003; Schmitt és Hewit 2004; Bereczki és mtsai. 2011; Schmitt és Zimmermann 2012; békák: Grobler és mtsai. 2003; halak: Bargelloni és mtsai. 2005; emlősök: Hartl és mtsai. 1993, 2005; Estonba és mtsai. 2006). Továbbá, igen széleskörű az a statisztikai módszertár, amelynek segítségével részletesen tanulmányozható a populációk struktúrája (lásd 3.5 fejezet). Egy másik fontos előny a módszer olcsósága, amely lehetővé teszi nagyszámú enzimplokuszok, valamint nagy egyedszámú minták vizsgálatát. Ráadásul a módszer a lokális populációk finom szerkezetének elemzése mellett nagy földrajzi léptékben is alkalmazható a variabilitás szerkezetének és a differenciálódás mértékének vizsgálatára (Habel és mtsai. 2005; Schmitt és mtsai. 2006 a, b; Schmitt és Haubrich 2008; Schmitt és Zimmermann 2012).

A módszer hátrányai közé tartozik, hogy a kis testű élőlények (pl. rovarok) esetében a mintavételezés destruktív, ami különösen egyes veszélyeztetett fajok esetében rendkívül nagy odafigyelést kíván (Avis 1994; Leberg 1996; Lowe és mtsai. 2004). Bár a rovarpopulációkban, nagy szaporaságuknak köszönhetően, a mintavétel meghatározott keretek között a populációk veszélyeztetése nélkül is megvalósítható. Ezen felül a rovarok jelentős hányada nem átfedő generációkkal rendelkezik, ami lehetővé teszi, hogy a mintavételezést az adott faj peterakási időszaka után végezzük

(Meglécz és mtsai. 1997; Berezki és mtsai. 2005, 2006). Egy másik nehézség a begyűjtést követő mintatárolás, mivel az enzimek aktivitásának megőrzése érdekében a minták mélyhűtéséről gondoskodni kell, hiszen az enzimek esetleges denaturálódása működésképtelenséget eredményez. Az enzimpolimorfizmus vizsgálatának egy további korlátja, hogy a DNS szintjén meglévő teljes diverzitásnak mindössze 22%-a mutatható ki az enzimek elektroforetikus vizsgálatával. Egyrészt a pontmutációk 32%-a szinonim kodont eredményez, másrészt az aminosav cserék csak akkor mutathatók ki enzimpolimorfizmus vizsgálat segítségével, ha az a fehérje töltésváltozásával jár együtt (Nei 1987; Lowe és mtsai. 2004). Mindezek mellett további kérdés, hogy vajon a genom reprezentatív mintájának tekinthető-e a vizsgált kb. 15-25 enzimlokusz. Bár erre a kérdésre megnyugtató választ csak az SNP microarray vizsgálatok széleskörű elterjedése után kapunk, a különböző fajok eredményeinek összehasonlíthatóságát biztosítja az a tény, hogy az enzimpolimorfizmus vizsgálatokban alkalmazott lokuszok esetében nagyok az átfedések, ugyanis nagyrészt a citoplazmában található, alapanyagcsere enzimek vizsgálata történik (Richardson és mtsai. 1989).

Az enzimlokuszok variabilitása a DNS-szintű változatossághoz képest kisebb mértékű, az alacsony variabilitás pedig kevés információt hordoz. Az emlősök körében az enzimpolimorfizmus gyakran igen alacsony szintű, különösen a nagytestű fajoknál (Nevo és mtsai. 1984; Hoelzel és mtsai. 2002). Egyes veszélyeztetett fajok esetében szinte egyetlen vizsgált lokusz sem volt polimorf (Eriksson és mtsai. 1976; Sage és Wolf 1986; Hartl és Reimoser 1988). Ilyen esetekben más molekuláris markerek, például a mikroszatellitek használata jobb eredményekhez vezethet (pl. Felidae: Newman és mtsai. 1985; *Lasiorhinus krefftii*: Taylor és mtsai. 1994; *Microtus oeconomus*: Leijts és mtsai. 1999).

Ugyanakkor a rovarok, de különösen a lepkék esetében igen magas szintű variabilitást tapasztalunk az enzimpolimorfizmus vizsgálata révén is (Schmitt 1999; Néve és mtsai. 2000; Schmitt és mtsai. 2000, 2005, 2006 a, b; Aagaard és mtsai. 2002; Vandewoestijne és Baguette 2002; Cassel és Tammaru 2003; Joyce és Pullin 2003; Habel és mtsai. 2005; Bereczki és mtsai. 2005, 2006; Hill és mtsai. 2006; Louy és mtsai. 2007; Pecsénye és mtsai. 2007 a, b; Schmitt és Müller 2007). Ráadásul, a lepkék esetében a mikroszatellit lokuszok primereinek kidolgozása nehézségekbe ütközik. A mikroszatellittek alapszekvenciái ugyanis számtalan kópiában fordulnak elő a genomban, így lokusz-specifikus kimutatásuk megfelelő primerek segítségével történik. A specifikus primerek tervezésének alpját a mikroszatelliteket körülvevő egyedi szekvenciák képezik. A lepkék esetében azonban, ezekben az egyedi szekvenciákban magas szintű a homoplázia és ezért a megfelelő, lokusz specifikus primerek tervezése meglehetősen alacsony hatékonyságú (Néve és Meglécz 2000; Zhang 2004; Meglécz és mtsai. 2004; Sinama és mtsai. 2011).

2.2.2. Morfometria

A morfológiai szintű variabilitást és differenciálódást hagyományos morfometria segítségével vizsgáltam a *M. athalia* lepkeszárnyakon és a hím ivarszerveken. A módszer előnye, hogy a jellegek tanulmányozása rendkívül egyszerű eszközöket igényel. A morfológiai jellegek vizsgálata több szempontból is alapvető jelentőségű. Minden jelleg meghatározásában több gén vesz részt, ezért azt mondhatjuk, hogy az élőlények genomjának igen nagy hányadát olyan gének alkotják, amelyek valamilyen morfológiai jelleg kialakításában vesznek részt (Falconer 1981; Wright 1978). A genomban lezajló mutációk ezért nagy valószínűséggel ezekben a génekben halmozódnak fel, vagyis a genetikai variabilitás nagy hányada várhatóan a morfológiai jellegeket meghatározó géneken jelentkezik (Wright 1968; Lande 1981; Lande és Barrowclough 1987). Ebből adódóan a genetikai variabilitás

gyakran visszatükröződik a morfológiai változatosságban (pl. *Carabus soleri*: Garnier és mtsai. 2005). Ugyanakkor ismeretesek olyan eredmények is, amikor a morfológiai jellegek egyértelmű differenciálódást tükröztek, azonban a molekuláris markerek nem mutattak ki ilyen struktúrát (pl. Lycaenidae: Nice és Shapiro 1999).

Ha tehát a természetes populációk variabilitását valamint differenciálódását szeretnénk felmérni, akkor a genetikai vizsgálatok mellett elengedhetetlen a morfológiai jellegek elemzése. Másik fontos jellemző, hogy ezek a jellegek sok esetben közvetlenül kapcsolódnak egy adott élőlény rátermettségéhez azáltal, hogy befolyásolják annak életképességét, vagy szaporodóképességét, tehát a morfológiai jellegek folyamatosan ki vannak téve a szelekció hatásának (Ridley 1996; Stearns és Hoekstra 2000; Frankham és mtsai. 2002; Futuyma 2005).

A morfológiai jellegekre azonban jellemző, hogy több-kevesebb fenotípusos plaszticitást mutatnak (nem kizárólag genetikai faktorok határozzák meg őket), mivel a környezeti faktorok igen erősen befolyásolhatják egy állat külső megjelenését. Ugyanakkor egy adott faj fenotípusos plaszticitásának a mértéke testrészfüggő lehet. Például a nappali lepkéknél a szárnyak színezetét és alakját a környezeti tényezők erősen befolyásolják (Shapiro 1976; Brakefield és mtsai. 1996; Brakefield és French 1999). Az ivarszervek esetében azonban más a helyzet, ugyanis ezek nagy különbségeket mutathatnak a testvérfajok között és a különböző környezeti faktorok kevésbé vannak rájuk hatással (Cesaroni és mtsai. 1994; Dapporto és mtsai. 2009), azaz kisebb a fenotípusos plaszticitásuk. A morfológiai jellegek variabilitásának elemzésében további nehézséget okozhat, hogy az adatok nem vethetők össze közvetlenül a molekuláris variabilitást jellemző paraméterekkel. Több lehetőség is van azonban arra, hogy a variabilitás különböző szintjeinek vizsgálata során kapott eredmények összehasonlíthatóak legyenek. Ebben elsősorban az segít, hogy mind az enzimpolimorfizmus, mind pedig a morfometriai vizsgálatok adatainak

feldolgozására a statisztikai módszerek széles skálája áll napjainkban rendelkezésre (Excoffier mtsai. 1992; Weir 1996; Schneider mtsai. 2000; R Development Core Team 2008; Hammer mtsai. 2006; SPSS Inc. 1999), így könnyen kiválaszthatóak azok a módszerek, melyek alkalmasak a genetikai és a morfológiai variancia szerkezetének összehasonlítására.

2.3. A *Melitaea* (subg. *Mellicta*) fajok ökológiai jellegzetességei

A *Melitaea* genus *Mellicta* subgenusába tartozó tarkalepke fajok populációi Európa egyes részein hanyatlóban vannak, vagy ritkák, így konzervációbiológiai jelentőségük igen nagy. 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) a konzervációbiológia egyik központi lepkefajaként ismert Angliában (Warren 1987 a, b, c; Hodgson mtsai. 2009). A *Mellicta* subgenus taxonómiai szempontból viszonylag bonyolult csoportnak tekinthető, egyrészt a fajok külső jellegeinek nagymértékű variabilitása, másrészt rejtett alfajok, esetleg fajok feltételezett jelenléte miatt (Schadewald 1988; Weidemann 1988; Ebert és Rennwald 1991; Tolman és Lewington 1998; Settele mtsai. 1999; Achtelik 2006). Ráadásul a subgenus fajainak élőhely igénye nagyon hasonló, bizonyos élőhelyeken együtt (szüntopikusan) fordulnak elő (2. függelék). Életciklusukat tekintve igen fontos különbség az egyes fajok között a voltinizmus, valamint a tápnövény hasznosítás. Míg a *M. britomartis* és a *M. aurelia* Magyarországon évente egy nemzedékű, addig a *M. athalia* esetében múzeumi gyűjtésekből származó adatok alapján két fenológiai típust lehet elkülöníteni. Az egyik típusnak egy generációja figyelhető meg évente (monovoltin), míg a másikkak kettő (bivoltin). Az egy generációs típus a

száraz illetve félszáraz réteken, irtásokon, erdőszegélyeken jelenik meg, míg a két generációs típus inkább a nedvesebb rétekre, kaszálókra jellemző. Ebből adódóan Magyarországon a két fenológiai típus elterjedése eltérő. Míg az egy generációs típus inkább a Dunántúli- és az Északi-középhegységben fordul elő addig a két generációs alak főleg az Alföld északkeleti területein, továbbá a Dunántúl nyugati és déli részein figyelhető meg. Emellett azonban az is lehetséges, hogy bizonyos években az egy generációs populációknak is megjelenhet egy részleges második nemzedéke. Az eddigi megfigyelések szerint (Weidemann 1988; Ebert & Rennwald 1991; Varga Z. korábbi, publikálatlan nevelési kísérletei) az egy- vagy kétnemzedékűség azon múlik, hogy a hernyók nyár derekán (általában július második felében) átnyaralnak-e, illetve az esztiváció folyamatosan átmegy-e a hibernációba, ahogyan ez az obligát egy nemzedékű *Melitaeini*-fajoknál (esetünkben *M. aurelia*, *M. britomartis*; illetve a részletesebben vizsgált *M. cinxia*-nál is történik). Nedvesebb élőhely és hosszabb tenyészidő esetén azonban lehetőség van subitan fejlődésre, ahogy ez a DNY-dunántúli és északkelet-alföldi nedves réti élőhelyeken látható.

A *Melitaea*-fajok többsége tulajdonképpen iridoid-glikozid speciaslistáknak tekinthető, ugyanis tápnövényeik szekunder metabolit tartalma a lepkék számára sokkal fontosabb faktor a tápnövényválasztásban, mint az, hogy az adott tápnövény milyen genusba, vagy családba tartozik. A tápnövényhasznosításuk evolúciójában tehát a tápnövény-kémia egy sokkal konzervatívabb jelleg, mint a tápnövény-taxonómia (Wahlberg 2001). A *Melitaea*-fajok tápnövényei általában különböző görvélyfűfélék (*Scrophulariaceae*) és útifűfélék (*Plantaginaceae*) (Wahlberg 1998; Wahlberg 2000; Wahlberg és Zimmermann 2000). A *M. britomartis* hernyója elsősorban *Veronica* fajokat fogyaszt (főleg *V. teucrium*) bár irodalmi adat van a *Rhinanthus minor*-ra vonatkozóan is, míg a *M. aurelia* elsősorban *Plantago* fajokkal táplálkozik, de irodalmi adatok szerint a *Melampyrum*

fajokat is elfogyasztja (Urbahn 1952; Weidemann 1988; Ebert és Rennwald 1991). A *M. athalia* hernyói ezzel szemben erősebben polifágok, *Veronica*, *Melampyrum*, *Rhinanthus* valamint *Euphrasia* fajok mellett egyes *Digitalis* fajokat is fogyasztanak (Warren 1987 a), ráadásul még *Plantago lanceolata*-n és *P. media*-n is megfigyelték hernyóit (2. függelék). A vizsgált három fajt és azok élőhelyi sajátosságait bemutató fotókat az 1. függelék tartalmazza.



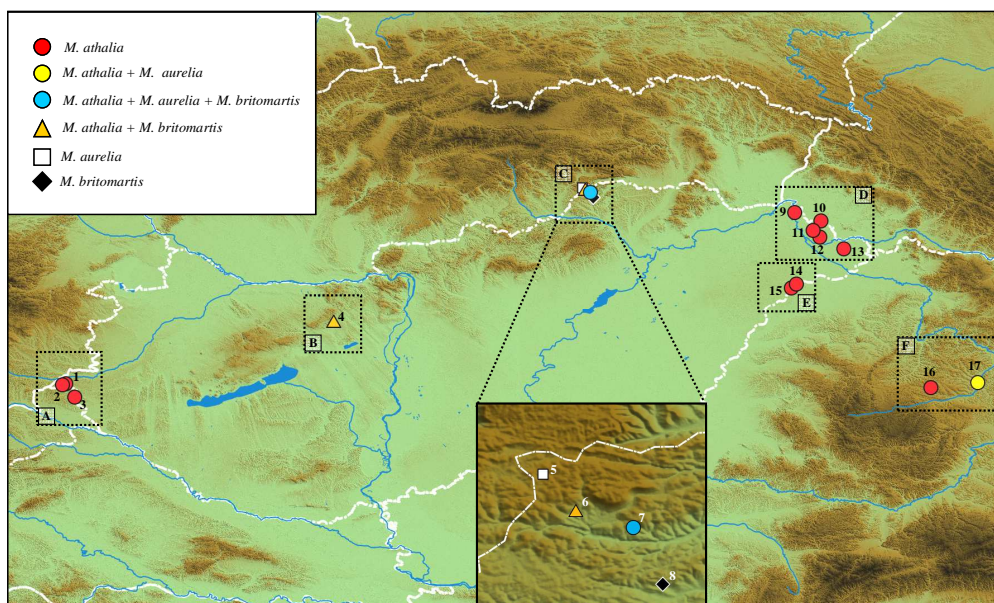
1. ábra: A *Melitaea*-fajok életciklusa.

A *Melitaea*-fajok nőtényei általában a tápnövény leveleinek a fonákára néhány nagy csomóban rakják le a petéiket (Urbahn 1952; Weidemann 1988; Ebert és Rennwald 1991; Wahlberg 2000). Egyes esetekben azonban (pl. *M. athalia*) azt is megfigyelték, hogy a nőtények nem a tápnövényre, hanem annak közelébe a talajra petéznak (Urbahn 1952; Warren 1987 a). A fajok fejlődési ciklusa (1. ábra) hasonló, bár előfordulhatnak kisebb különbségek. A *M. athalia* lárvák viselkedése például kis mértékben eltér más *Melitaea*-fajokétól (*M. aurelia*, *M. britomartis*) mivel azok hernyói már a diapauza előtt szétszédnek, egyedül táplálkoznak és egyedileg esztiválnak ill. hibernálnak (Warren 1987 a). Ezzel szemben a *M. britomartis* és a *M. aurelia* hernyói a hernyófészkekben együtt maradva táplálkoznak és hibernálnak. Az életciklusból adódóan a *Melitaea*-fajoknál egy nőtény összes utóda egyszerre van kitéve a különböző környezeti faktorok (pl. mikroklimatikus tényezők megváltozása, predáció, parazitizmus) hatásának.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Gyűjtőhelyek

Vizsgálataimhoz a Kárpát-medence 6 régiójának 17 gyűjtőhelyéről származó, 1999 és 2009 között gyűjtött 22 mintát használtam fel (2. ábra, 3., 9. függelék).



2. ábra: Gyűjtőhelyek. **1:** Kétvölgy; **2:** Apátistvánfalva; **3:** Szomoróc; **4:** Csákvár; **5:** Dénes-töbör; **6:** Tohonya-völgy; **7:** Szőlőhegy; **8:** Terezsténye; **9:** Lónyai erdő; **10:** Kaszonyi-hegy; **11:** Bockereki erdő; **12:** Hetefejércse; **13:** Fülesd; **14:** Fényi erdő (határszél); **15:** Fényi erdő (Ömböly); **16:** Sárd (Sardu); **17:** Válaszút (Răscruți); **A:** Őrség; **B:** Vértes; **C:** Aggteleki karszt; **D:** Nyírség; **E:** Bereg; **F:** Erdély.

A *M. athalia* minták egy- és két generációs fenológiai típusba történő besorolása négy tényező figyelembevételére alapult: (i) az adott minta gyűjtési időpontja (ii) múzeumi adatok, (iii), terepi megfigyelések, (iv) klimatikus adottságok.

3.2. A minták előkészítése és feldolgozása

A vizsgálatokhoz szükséges egyedek befogása lepkehálóval történt általában a rajzási időszak végén, a peterakási időszak után. Elsősorban hímeket gyűjtöttünk, melyeket még élő állapotban folyékony nitrogénbe helyeztünk. A mintákat feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk (a fagyasztásra az enzimek működőképességének megóvása érdekében volt szükség). A morfometriai vizsgálatokhoz a szárnyakat és a külső hímvarszervet (a potroh utolsó szelvényeit), a genetikai vizsgálatokhoz pedig a tort és a potroh megmaradt szelvényeit használtam fel.

3.3. Enzimpolimorfizmus vizsgálatok

Poliakrilamid gélelektroforézis segítségével 15 különböző enzimlokuszt vizsgáltam meg. Ezek közül 12-t a torból [glutamát-oxálacetát-transzamináz (*Got*), glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (*G6pdh*), α -glicerofoszfát-dehidrogenáz (*α Gpdh*), hexokináz (*Hk*), izocitrát-dehidrogenáz (*Idh*), malát-dehidrogenáz (*Mdh*), malik enzim (*Me*), 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz (*6Pgdh*), foszfo-glükóz-izomeráz (*Pgi*), foszfo-glüko-mutáz (*Pgm*), szuperoxid-dizmutáz-1 (*Sod1*), szuperoxid-dizmutáz-2 (*Sod2*)], 3-at pedig a potrohból [akonitáz (*Acon*), aldehid-oxidáz (*Aox*), észteráz (*Est*)] készített homogenizátumokból mutattam ki.

A tor és a potroh homogenizálásához $350\text{-}400\text{ }\mu\text{l}$ /egyed homogenizáló oldatot (4. függelék) használtam fel. Az elkészített mintákat 10 000-es fordulatszámra, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 10 percig centrifugáltam, majd a felülúszót tiszta Eppendorf-csővekbe pipetázva a műveletet megismételtem. A homogenizátumokat a vizsgálat további menetének megfelelően osztottam szét.

A homogenizátumokat az adott enzim kimutatásához szükséges mennyiségben vittem fel a géltre, amelyet elektroforézis pufferrel feltöltött cellába helyeztem, majd egyenáramú elektromos erőterben, a feszültséget állandó értéken tartva, a fehérjemolekulákat töltésük, valamint méretük alapján szétválasztottam. Az általam használt pufferrendszereket az 5. függelék tartalmazza. Az alloenzimeket az elektroforézist követően enzimspecifikus festési eljárásokkal tettem láthatóvá (6. függelék). A megfigyelt enzimmintázatok alapján (7. függelék) azonosítottam az egyedek genotípusát, majd lokuszonként és populációnként genotípus- és allélgyakoriságokat számoltam. Ezt követően statisztikai programok segítségével további elemzéseket végeztem (lásd. 3.5. fejezet).

3.4. Morfometriai vizsgálatok

A morfometriai elemzésekhez csak a hím egyedek szárnyát, illetve ivarszervét használtam fel annak érdekében, hogy elkerüljem a hím és nőstény egyedek közötti szárnyméret-, ill. alakbeli különbségből adódó torzítást. Így a mintaszám, valamint az egyedszámok kissé módosultak a morfometriai vizsgálatokban (9. függelék).

3.4.1. Szárnymorfometria

A hím lepkék szárnyait a megfelelő síkban való rögzítés érdekében széles cellulux szalagra ragasztottam föl, majd téglalap alakú fóliadarabbal fedtem le. A digitalizált fotókon kalibráció után összesen 12 jelleget mértem le az Image J 1.36 program segítségével (Kizic és Borovac 2001) (3. ábra). A lemért hossz valamint szögméretek mellett az elülső szárny negyedik és ötödik sapkafoltjának jellegeit is vizsgáltam. Ez utóbbiakat azért tartottam fontosnak mivel a *M. aurelia* és *M. britomartis* között e foltok nagysága,

egymáshoz viszonyított mérete, taxonómiai elkülönítő bélyeg (Issekutz és Kovács 1954).



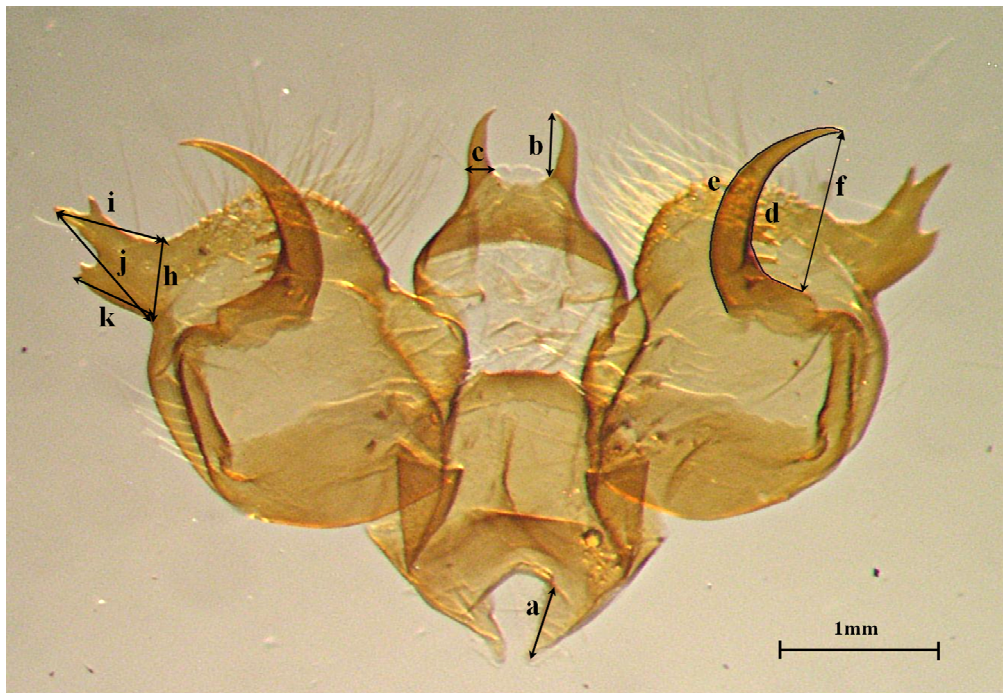
3. ábra: A szárnyon mért jelek. **eh**: elülső szárny hossza; **eosh**: elülső szárny oldalsó szegély hossza; **β**: elülső szárny csúcsi szöge; **hsh**: hátsó szárny hossza; **hhsh**: hátsó szárny oldalsó szegély hossza; **γ**: a hátsó szárny alapi szöge; **sfa**, **sfb**: a negyedik sapkafoltra illesztett háromszög oldalainak hossza; **sfc**, **sfd**: az ötödik sapkafoltra illesztett háromszög oldalainak hossza; **u**, **t**: a két sapkafoltra illesztett háromszög két oldala által közbezárt szög. (az ábrán egy *M. athalia* egyed szárnya látható)

3.4.2. Ivarszerv morfológia

A külső hímivarszerv preparálását Robinson (1976) módszerét módosítva végeztem el. Első lépésben a már korábban eltávolított potrohvégeket 15%-os kálium-hidroxid oldatban áztattam 12 órán át, majd közvetlenül preparálás előtt 30 percig melegítettem 75 °C-on, hogy a szövetek felpuhuljanak és azokat maradéktalanul el lehessen távolítani a külső hímivarszervről.

A testszövetektől megtisztított szklerotizált struktúrát óvatosan szétterítve 96%-os etanolban dehidratáltam, majd tárgylemezen rögzítettem Euparal beágyazó anyag segítségével. Az így kapott preparátumokon digitalizálás után 10 különböző jelleget (távolságot) mértem le (4. ábra).

A mért értékek közül a d és f jellegeket felhasználva egy indexet is számoltam ($m = d / [(f * \pi)/2]$), amely a harpe görbületének mértékét adja meg. Ha $m \leq 1$ akkor kevésbé, ha $m \geq 1$ akkor erősen hajlott a harpe.



4. ábra: A külső hímivarszerven mért jellegek. **a:** a saccus centrális bemetszésének hossza; **b:** az uncus hossza; **c:** az uncus szélessége; **d:** a harpe belső ívének hossza; **e:** a harpe külső ívének hossza; **f:** a harpe magassága; **h:** a processus posterior alapi szélessége; **i:** a processus posterior belső oldalának hossza; **j:** a processus posterior legnagyobb csúcsának hossza az alaptól számítva; **k:** a processus posterior külső oldalának hossza. (az ábrán egy *M. athalia* egyed külső hímivarszerve látható)

Ezt követően statisztikai programok segítségével (lásd. 3.5. fejezet) különböző elemzéseket végeztem külön-külön a szárny és az ivarszervek esetében kapott adathalmazra. A vizsgálatban szereplő morfometriai bélyegeket egy előzetes analízis (próbamérés) eredményei alapján választottam ki, amelyben minden jelleg többszöri lemérése után megvizsgáltam a mérés ismételhetőségét, vagyis a mérési hiba relatív nagyságát. A későbbiekben csak azokat a jellegeket használtam fel, melyeknek mérési hibája 10% alattinak bizonyult.

3.5. Statisztikai analízisek

3.5.1. 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 (Pecsenye és mtsai. 2007 a).

Első lépésben a genetikai variancia szerkezetét F-statisztika segítségével (Wright 1978; Weir 1996) elemeztem, melynek során meghatároztam a populációk közötti varianciakomponenst jellemző fixációs indexet (F_{ST}). Az analíziseket az FSTAT 1.2 programcsomag segítségével hajtottam végre (Goudet 1995).

A populációk differenciálódásának megállapítására Fisher-féle egzakt tesztet végeztem, melyhez a GENEPOP 1.2 programot alkalmaztam (Raymond és Rousset 1995 a, b).

Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA) segítségével (Excoffier és mtsai. 1992; Weir 1996) megvizsgáltam a teljes genetikai variancia megoszlását a hierarchia különböző szintjein. Ennek során a teljes genetikai varianciát különböző komponensekre osztottam fel az egyes vizsgálatok célkitűzéseinek megfelelően. Az analízist az Arlequin 2.00 programcsomag (Schneider és mtsai. 2000) segítségével végeztem el.

Az allélfrekvencia adatok alapján a populációk között Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokat (Cavalli-Sforza és Edwards 1967) számoltam ki, majd a távolságmátrix alapján UPGMA dendrogrammot szerkesztettem (Sneath és Sokal 1973). A fa minden elágazására ún. *bootstrap* értékeket (Felsenstein 1985) kalkuláltam (1000 ismétléssel), amelyek megadják az egyes elágazások valószínűségét az ismétlések százalékában kifejezve, a visszatevéses mintavételezés során előállított alternatív fák elemzése révén. Ez a módszer kiküszöböli a változók kiválasztásában jelentkező szubjektív elemeket, így alkalmas a stabil klaszterek kimutatására. A fenti analízist a PAST 1.56 program (Hammer és mtsai. 2006) segítségével hajtottam végre.

A populációk allélgyakoriságai alapján főkomponens analízist (PCA) végeztem, hogy megvizsgáljam, milyen mértékben különülnek el az egyes populációk a változók redukált terében. Az új változók közül először a legnagyobb varianciahányadot lefedő komponenst kerestem meg, majd ezt követően a megmaradó varianciát legjobban magyarázó másodikat és így tovább. A főkomponens analízis segítségével egyúttal azokat a jelleget is meghatároztam, amelyek a teljes genetikai variancia legnagyobb hányadát magyarázzák. Az analízist a PAST 1.56 programmal (Hammer és mtsai. 2006) végeztem el.

A populációk genetikai struktúráját az ún. Bayes-féle hierarchikus klaszterezési módszerrel (Pritchard és mt. 2000) is analizáltam. Ennek segítségével meghatároztam a genetikai klaszterek legvalószínűbb számát (K) a mintákban és megállapítottam a megoszlásukat az egyedekben. A K értékek tartományát minden analízisben a vizsgált minták száma alapján határoztam meg. A futtatásokat minden K értékre hatszor végeztem el, 100000 „burnin” és 200000 „running length” beállítással, „admixture model”-t alkalmazva. Az elemzést a Structure 2.3.2 program (Pritchard 2004) alkalmazásával végeztem el, majd az így kapott adatokat a Structure harvester (Earl és vonHoldt 2011) segítségével elemeztem.

3.5.2. *Morfometria*

A morfometriai elemzéseket a szárny és a hímvivarszerv méréseiből kapott adathalmazokon külön-külön végeztem el.

A populációk fenotípusos variabilitásának a mértékét a Levene-féle változók (Manly 1986) segítségével elemeztem, amely tulajdonképpen az egyes jellegek populációs átlaga, és az egyedeken mért értékek különbségének az abszolút értéke. A teszt során a populációk Levene-féle változóinak átlagát hasonlítottam össze hierarchikus ANOVA alkalmazásával. Az elemzéseket az R 2.12.1 (R Developmental Core Team 2008) programmal hajtottam végre.

A teljes fenotípusos variancia megoszlását hierarchikus ANOVA segítségével elemeztem az R 2.12.1 programmal (R Developmental Core Team 2008). A totális fenotípusos varianciát különböző komponensekre bontottam, a hierarchia szinteknek megfelelően. Két párhuzamos analízist végeztem el mind a szárnyak, mind pedig az ivarszervek esetében, amelyre azért volt szükség, mert arra voltam kíváncsi, hogy milyen trend érvényesül a

hierarchia legfelső szintjén. Az egyik esetben a legfelső szintnek a *M. athalia* két fenológiai típusát tekintettem, másik esetben pedig a két földrajzi zónát ahonnan a minták származtak (keleti-, vagy nyugati Kárpát-medence). A hierarchia ezt követő szintjei azonosak voltak a kétféle analízis esetén: régiók között az adott csoporton belüli, populációk között a régióon belüli és populációkon belüli variancia. A vizsgálat során azt elemeztem, hogy a teljes fenotípusos variancia hány százaléka jelenik meg a hierarchia egyes szintjein.

A populációk jellegátlagait felhasználva főkomponens analízist (PCA) végeztem a szárny és a genitália adataira külön-külön a PAST 1.56 program (Hammer és mtsai. 2006) segítségével. Ebben a vizsgálatban a populációk elkülönülését vizsgáltam meg egy redukált faktortérben.

Végül a mérési alapadatokat felhasználva diszkriminancia analízissel meghatároztam azokat a populációcsoportokat (földrajzi régiók és zónák, valamint fenológiai alakok), amelyekből a legvalószínűbb az egyes egyedek származása. A többi elemzéshez hasonlóan, a diszkriminancia analízist is párhuzamosan végeztem a szárny és a genitália adatokra. Az analízist az SPSS 10.0 programcsomag (SPSS INC. 1999) segítségével végeztem el.

3.5.3. *Enzopolimorfizmus és morfometria*

A genetikai valamint morfometriai eredményeket felhasználva összehasonlítást végeztem a *M. athalia* populációkban tapasztalt morfológiai (szárny és ivarszerv) és genetikai (enzopolimorfizmus) variabilitást illetően. A vizsgálat során különböző jelleg/marker párokat alakítottam ki (lásd 7.1 fejezet), amelyek közötti összefüggés vizsgálatára Spearman-féle rangkorrelációt hajtottam végre (Précsényi 1995). Az analízist az SPSS 10.0 programcsomag (SPSS INC, 1999) segítségével végeztem.

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 (Hollós és mtsai. 2012). A távolságmátrixokat felhasználva Mantel tesztet hajtottam végre (Mantel és Valand 1970; Mantel 1976) a GenAlex6 program (Peakal és Smouse 2006) segítségével.

4. A GENETIKAI DIFFERENCIÁLÓDÁS MINTÁZATA, EVOLÚCIÓSAN SZIGNIFIKÁNS ÉS KONZERVÁCIÓBIOLÓGIAI EGYSÉGEK A *MELLECTA* SUBGENUSON BELÜL

4.1. Bevezetés

A különböző szintű konzervációbiológiai egységek meghatározása kiemelkedő jelentőségű a fajok populációinak hosszú távú megőrzése szempontjából (Hughes és mtsai. 1997; Hobbs és Mooney 1998). Az egyik ilyen vitatott egység a konzervációbiológiában az Evolúciósan Szignifikáns Egység (ESU) (Allendorf és Luikart 2007). Az ESU-k meghatározásánál zavaró lehet a taxonómiai bizonytalanság, mivel a különböző taxonokat (rokon fajokat, alfajokat, rasszokat) sok esetben külső morfológiai jellegekre alapozva különítik el (pl. szárnymintázat vagy színezet). További probléma, hogy bizonyos taxonok nem mutatnak filogeográfiai minázatot (Zink 2004), vagy egy fajon belül inkább genetikailag különülnek el az egyes taxonok, mint morfológiailag (Schmitt és mtsai. 2007; Hammouti és mtsai. 2010). Az ESU-k meghatározását tehát nehezíti, hogy az intraspecifikus egységek sok faj esetében nincsenek pontosan tisztázva, ugyanis ezek meghatározása sokkal bonyolultabb, mint a fajok elkülönítése (Waples 1991).

Munkám első szakaszában céloom az volt, hogy az enzimpolimorfizmus eredményeit felhasználva elemezzem a három vizsgált *Melitaea*-faj, valamint a *M. athalia* két fenológiai típusa közötti elkülönülés mértékét és egyúttal megállapítsam a subgenus genetikailag differenciálódott, Evolúciósan Szignifikáns Egységeinek (ESU-k) számát a Kárpát-medencében.

Az enzimpolimorfizmus vizsgálatokhoz a Kárpát-medencéből 1999-2009 között gyűjtött mintákat használtam fel. A mintahelyeket, a földrajzi régiók

szerinti beosztást, valamint az egyes gyűjtőhelyekről származó egyedek számát a 3. függelék tartalmazza.

4.2. Eredmények

A genetikai variabilitás struktúráját F-statisztika segítségével, illetve a populációk differenciálódásának egzakt tesztjével elemeztem. Amikor a három fajhoz tartozó összes populációt együtt analizáltam, mind az F-statisztika mind pedig az egzakt teszt eredményei azt mutatták, hogy a *Melitaea*-fajok populációi nagymértékben differenciálódtak. (1. táblázat, M. tot.). Ráadásul a 15 vizsgált enzimlokusz közül 13 szignifikánsan különbözött mindkét analízis esetében.

	F_{ST}	n	Egzakt teszt	n
M.ath.1	0,039*	4	***	5
M.ath.2	0,052*	8	***	7
M. ath.	0,045*	11	***	12
M. brito.	0,019*	3	***	4
M. aur.	0,003	0	ns	0
M. tot.	0,269*	13	***	13

1. táblázat: Az F-statisztika eredményei és a populációk differenciálódásának egzakt tesztje. F_{ST} : fixációs index; n: a differenciáló lokuszok száma; szignifikanciaszintek: *: 0,05; **: 0,01;***: 0,001

M. ath. 1: egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*; **M. ath.:** összes *M. athalia* minta; **M. brito.:** *M. britomartis*; **M. aur.:** *M. aurelia*; **M. tot.:** a három fajból származó összes minta.

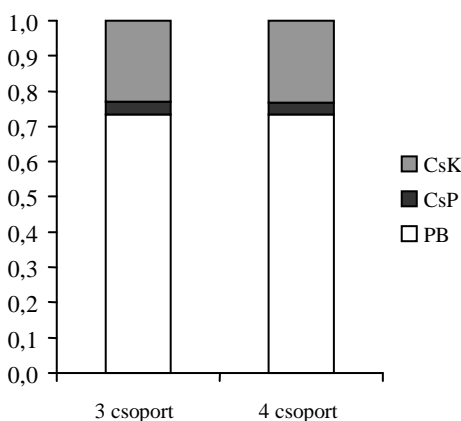
Annak érdekében, hogy össze lehessen hasonlítani a fajokon belüli differenciálódás mértékét, az F-statisztikát és az egzakt tesztet szűkített adathalmazzal is elvégeztem, a különböző fajokra külön-külön. Ebben az esetben jelentősen alacsonyabb szintű differenciálódást tapasztaltam. A populációk közötti varianciát jellemző index (F_{ST}) ugyanis a fajokon belül sokkal kisebbnek adódott, mint a három faj együttes analízise esetében (a fajok között) (1. táblázat). A vizsgálat arra is rávilágított, hogy a *M. athalia* populációk sokkal jobban differenciálódtak, mint a másik két faj populációi (1. táblázat, *M. ath.*), mitöbb, a *M. aurelia* populációi egyik analízisben sem mutattak szignifikáns elkülönülést.

A vizsgálat során arra is kíváncsi voltam, hogy vajon a *M. athalia* két fenológiai típusa között milyen a differenciálódás mértéke. Ezért az F-statisztikát és az egzakt tesztet kétféle módon is elvégeztem a *M. athalia* mintákra: (a) a két fenológiai típus mintáit külön-külön analizáltam; (b) a mintákat fenológiai típusuk alapján összevontam. Az eredmények azt mutatták, hogy a fenológiai típusok elkülönülése igen alacsony szintű volt. A fenológiai típusok mintáit külön-külön elemezve a differenciálódás hasonló mértékű volt, mint az összes *M. athalia* minta esetében (1. táblázat: *M.ath.1* és *M.ath.2*). A fenológiai típusok összevont mintáit analizálva az F_{ST} minden korábbi *M. athalia* értéknél jelentősen alacsonyabbnak mutatkozott ($F_{ST}=0,007^*$).

Eredményeimet minél több módon szerettem volna alátámasztani, ezért molekuláris varianciaanalízist (AMOVA) is végeztem, melynek során a teljes genetikai varianciát komponensekre bontottam és azt vizsgáltam, hogy ezek hogyan oszlanak meg a különböző hierarchia szinteken: populációcsoportok között, populációcsoportokon belül és populációkon belül. Az analízist kétféle módon hajtottam végre. Az egyik esetben 3 populációcsoportot különítettem el a három fajnak megfelelően, míg a másik esetben a

M. athalia két fenológiai típusát két külön kategóriának tekintetem, azaz 4 populációcsoportom volt.

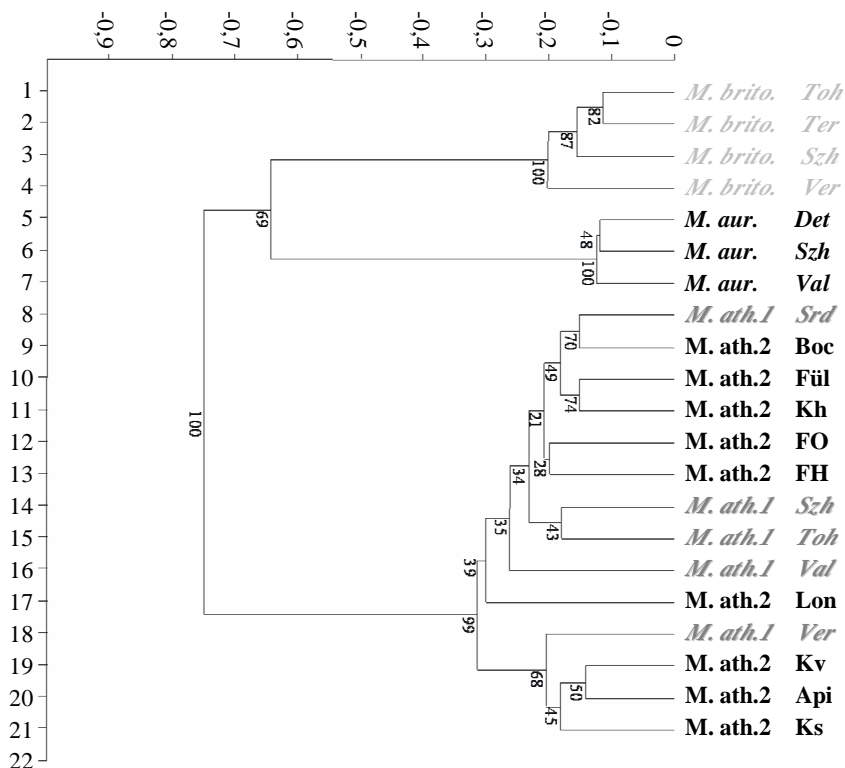
A várakozásnak megfelelően a teljes genetikai variancia legnagyobb hányada a populációkon belül, kisebb hányada (<27%) pedig a populációk között volt megfigyelhető (5. ábra). Ezt az utóbbi komponenst tovább bontva a populációk közötti variancia legnagyobb hányadát mindkét esetben a csoportok közötti variancia magyarázta (~23%). Nem mutatkozott azonban különbség a populációk közötti varianciakomponens megoszlásában a két (3 csoport és 4 csoport) analízis esetén (5. ábra). Ez azt jelenti, hogy a genetikai differenciálódás szintje nagyon magas a három faj között. Ugyanakkor a *M. athalia* populációk két fenológiai típusra osztása már nem fokozta tovább a differenciálódás mértékét a populációcsoportok között.



5. ábra: Az AMOVA eredményei. **3 csoport:** a három populációcsoportot a három faj alkotja; **4 csoport:** a négy populációcsoportot a *M. britomartis*, a *M. aurelia* és az egy illetve két generációs *M. athalia* alkotja; **CsK:** a csoportok közötti variancia komponens; **CsP:** a populációk között a csoporton belüli variancia komponens; **PB:** a populációkon belüli variancia komponens.

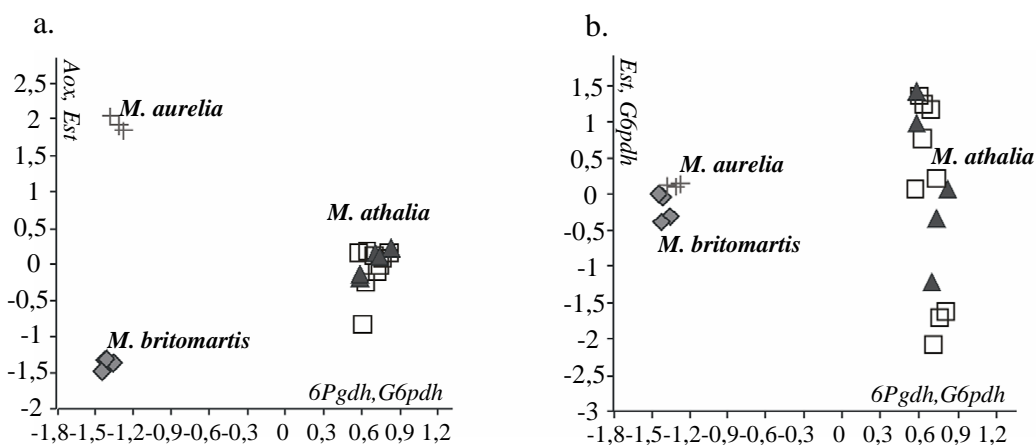
A továbbiakban az allélfrekvencia adatok alapján számított Cavalli-Sforza és Edwards húrtávolságokon alapuló UPGMA dendrogramot szerkesztettem (6. ábra). Az ábrán jól látható, hogy a három faj populációi három külön ágban helyezkednek el, vagyis jól elkülönülnek egymástól.

A magas *bootstrap* érték azt támasztja alá, hogy a *M. athalia* tökéletesen elkülönül a másik két fajtól. Ugyanakkor a *M. aurelia* és a *M. britomartis* közötti elválást sokkal alacsonyabb *bootstrap* érték támogatta (69). Megfigyelhető továbbá az is, hogy a *M. athalia* két fenológiai típusához tartozó minták nem alkotnak két külön csoportot a dendrogramon, ami ismét alátámasztja a két típus között lévő genetikai differenciálódás hiányát.



6. ábra: A Cavalli-Sforza és Edwards féle hűrtávolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogram. **Toh:** Tohonya-völgy; **Ter:** Teresztenye; **Szh:** Szőlőhegy; **Det:** Dénes-töbör; **Ver:** Csákvár; **Val:** Válaszút (Räscruci); **Srd:** Sárd (Sardu); **Lon:** Lónyai erdő; **Boc:** Bockereki erdő; **Fül:** Fülesd; **Kh:** Kaszonyi-hegy; **FH:** Fényi erdő (határszél); **FO:** Fényi erdő (Ömböly); **Api:** Apátistvánfalva; **Kv:** Kétvölgy; **KS:** Szomoróc; **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*, **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*, **M. brito.:** *M. britomartis*, **M. aur.:** *M. aurelia*.

Az allélgyakoriságok alapján főkomponens analízist (PCA) hajtottam végre (7. ábra), melynek során arra voltam kíváncsi, hogy: (a) milyen mértékű az elkülönülés a fajok, illetve a *M. athalia* két fenológiai típusa között a változók (enzimlokuszok) által meghatározott redukált faktortérben; (b) mely enzimlokuszok magyarázzák a genetikai variancia legnagyobb hányadát.



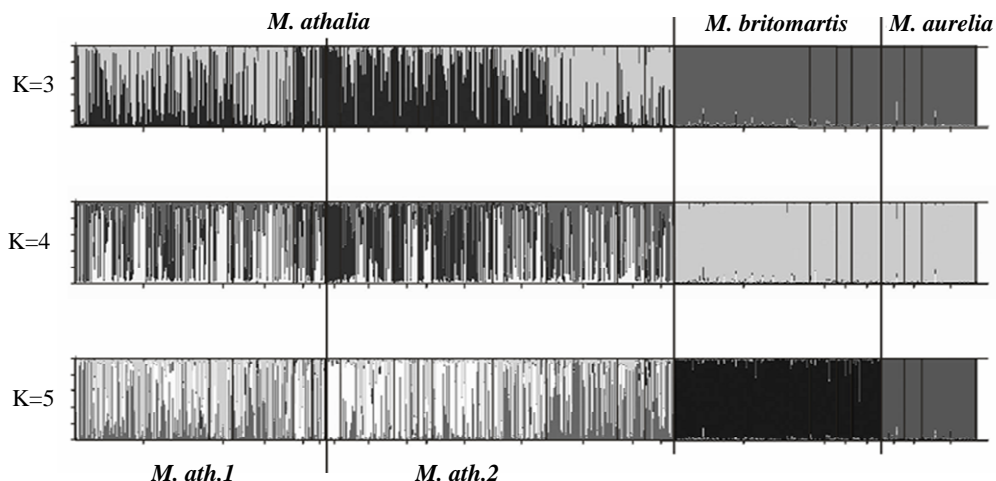
7. ábra: A főkomponens analízis eredményei. Minden pont egy mintát reprezentál a változók redukált terében. ▲: egy generációs *M. athalia* minták; □: két generációs *M. athalia* minták. A tengelyeket meghatározó enzimlokuszokat azok rövidítése jelzi.

a.: 1. és 2. tengely.

b.: 1. és 3. tengely.

A főkomponens analízis eredményei teljesen alátámasztják az eddigi eredményeket. A populációkat reprezentáló pontok a három fajnak megfelelően, külön pontfelhőt alkotnak a változók redukált terében (7a., b. ábra). A *M. athalia* populációk az első tengely mentén különülnek el a másik két faj populációitól, míg a *M. britomartis* és a *M. aurelia* populációi a második tengely mentén válnak szét egymástól (7a. ábra). Az első két tengely a teljes genetikai variancia igen magas hányadát (84,6%-át) magyarázza meg (8. függelék). A *M. athalia* populációit reprezentáló pontok a harmadik (*Est*

és *G6pdh* enzimlokuszok által meghatározott) tengely mentén szóródnak, azaz igen erősen differenciálódnak egymástól, de a populációk nem csoportosulnak két külön pontfelhőben a két fenológiai típusnak megfelelően (7b. ábra), amely ismét a közöttük lévő genetikai differenciálódás hiányára utal.



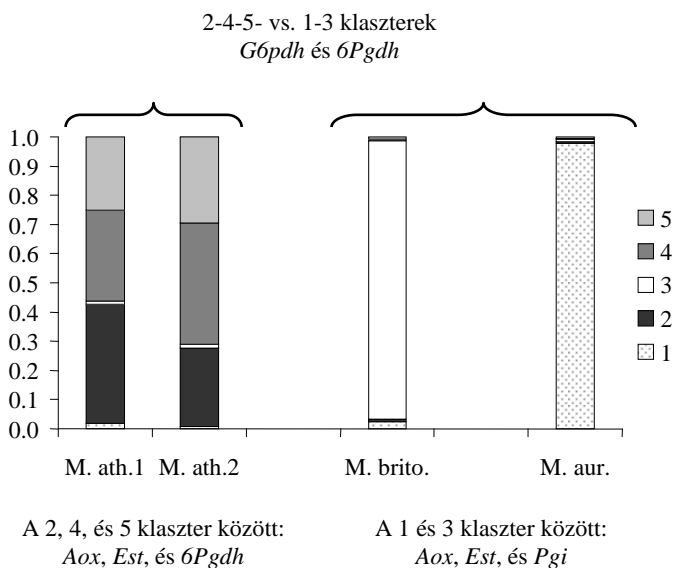
8. ábra: A Bayes-féle hierarchikus klaszterezés eredménye. Az oszlopok az egyes klaszterek megoszlását reprezentálják a vizsgált egyedekben. **K:** a genetikai klaszterek száma (a szürke különböző árnyalatai jelölik a különböző klasztereket). **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*.

A *Melitaea*-populációk genetikai struktúrájának vizsgálata során a következő lépésben meghatároztam a genetikai klaszterek legvalószínűbb számát (**K**) a subgenuson belül. A **K** értékét 1 és 21 között vizsgáltam, mivel összesen 21 minta szerepelt az analízisben. A Structure program futtatása során minden vizsgált **K** értékre 6-szor végeztem el az analízist és a kapott eredmények alapján megállapítottam a **K** legvalószínűbb értékét. A variáciát és a valószínűséget összehasonlítva arra az eredményre jutottam, hogy 5 genetikai klasztert lehet elkülöníteni a vizsgált *Melitaea*-fajokban, ugyanis **K=5** esetben párosult az egyik legnagyobb valószínűségi érték ($\ln(\text{PD})=-15513$) egy viszonylag alacsony variációval ($\text{var}[\ln(\text{PD})]=826,1$). Továbbá

a *M. britomartis* és a *M. aurelia* egyedei csak $K=5$ esetében alkottak külön-külön genetikai klasztert, alacsonyabb K érték esetében az utóbbi két faj egy genetikai klaszterbe tartozott, miközben a többi klaszter a *M. athalia* populációkban jelent meg (8. ábra). Ebből arra lehet következtetni, hogy a *M. athalia* populációk genetikai variabilitása magas, hiszen $K=3$ esetében kettő, míg $K=4$ és $K=5$ esetében a klaszterekből egyaránt három a fajon belül található. A statisztikai eredmények azt mutatták, hogy a *M. aurelia* populációi esetében az egyes klaszter, míg a *M. britomartis* populációit nézve a hármas klaszter dominál (9. ábra).

Ebben a vizsgálatban is kíváncsi voltam arra, hogy miként változik meg a struktúra, ha a *M. athalia* két fenológiai típusát külön kategóriákként kezelem, azaz ha négy csoportot alakítok ki az elemzésben. Ez az analízis arra világított rá, hogy a három klaszter (2, 4, és 5) egyenlő arányban oszlott meg a *M. athalia* két fenológiai típusában, vagyis a két alak a klaszterek eloszlásában sem különbözött egymástól (9. ábra).

A vizsgálat során azt is megállapítottam, hogy mely enzimlokuszok azok, amelyek a fő különbségeket eredményezik a különböző klaszterek között. A 2-4-5 klaszter csoport (*M. athalia* klaszterei), valamint az 1 és 3 klaszterek (*M. britomartis* és *M. aurelia* klaszterei) között a fő különbség a *G6pdh* és a *6Pgdh* enzimlokuszok esetében mutatkozott meg (9. ábra). Ez az eredmény összecseng a főkomponens analízis eredményeivel, ugyanis a *M. athalia* populációk a másik két faj populációitól az első tengely mentén különültek el, melyet ugyanez a két enzimlokusz határozott meg. Az egyes és a hármas klaszter (*M. britomartis* valamint a *M. aurelia* klaszterei) közötti fő különbség az *Aox*, *Est* és *Pgi* enzimlokuszok esetében mutatkozott meg. A PCA-ban ezek határozták meg a második tengelyt, melynek mentén a *M. britomartis* és a *M. aurelia* populációi jól elkülönültek egymástól, két külön pontfelhőt alkotva.



9. ábra: A különböző genetikai klaszterek megoszlása a három *Melitaea*-faj és a *M. athalia* két fenológiai típusa között K=5 esetében (a szürke különböző árnyalatai jelölik az öt különböző klasztert). **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*; **M. brito.:** *M. britomartis*; **M. aur.:** *M. aurelia*. A 2-4-5 valamint az 1-3 klaszterek csoportjai között a *G6pdh* és a *6pgdh* enzimlokuszokban mutatkozott különbség. A 2, 4, és 5 klaszter között az *Aox*, *Est*, és *6Pgdh* enzimlokuszok esetében, míg az 1 és 3 klaszter között az *Aox*, *Est* és *Pgi* tekintetében mutatkozott eltérés.

4.3. Eredmények megvitatása

A vizsgálat során az volt a célom, hogy meghatározzam az Evolúciósan Szignifikáns Egységek (ESU-k) számát a *Mellicta* subgenuson belül a Kárpát-medencében. Az elvégzett összes analízis arra világított rá, hogy a három vizsgált *Melitaea*-faj populációi egyértelműen elkülönülnek egymástól. A fajoknak megfelelően három külön ág jelenik meg a dendrogramon, valamint három jól elkülönült pontfelhőt lehet megfigyelni a főkomponens analízisben. Az F-statisztika valamint az egzakt teszt eredményei szintén alátámasztották a három faj elkülönülését. A populációk együttes elemzése során az F_{ST} érték a *Melitaea*-populációk igen

nagymértékű differenciálódását jelezte, míg a fajokon belül alacsonyabb szintű differenciálódás mutatkozott.

A *M. athalia* két fenológiai típusa között ezzel szemben egyik analízisben sem tapasztaltam elkülönülést. Az F_{ST} értékek és az egzakt teszt eredményei alapján a két típus igen hasonlóknak bizonyult. Bár a *M. athalia* populációk a főkomponens analízisben a hármastengely mentén szóródtak, a két fenológiai típus nem különült el egymástól ebben az analízisben sem (a populációkat reprezentáló pontok nem csoportosultak két külön pontfelhőbe a fenológiai típusoknak megfelelően). Továbbá az egy illetve két generációs *M. athalia* populációk a dendrogramon sem klasztereződtek két külön csoportba a fenológiai típusoknak megfelelően. Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a *Mellicta* subgenuson belül 3 Evolúciósan Szignifikáns Egység különíthető el a három fajnak megfelelően.

Eredményeim alapján a *M. britomartis* és a *M. aurelia* relatíve közeli, míg az *M. athalia* viszonylag távolabbi rokonnak bizonyult. A Bayes-féle hierarchikus klaszterezési módszerrel végzett vizsgálat során 5 klasztert azonosítottam. Kevesebb klaszter feltételezése esetén a *M. britomartis* és a *M. aurelia* egyedek ugyanahoz a klaszterhez tartoztak. Továbbá a *M. britomartis* és a *M. aurelia* dendrogramon való szétválását nem támasztotta alá olyan magas *bootstrap* érték, mint a *M. athalia* elkülönülését. Ez ellentmondásban van Wahlberg és mtsai. eredményeivel (Wahlberg és Zimmermann 2000; Wahlberg 2001; Leneuve és mtsai. 2009), akik munkájában a *M. athalia* és a *M. britomartis* mutatkozott közelebbi rokonnak. A két eredmény ellentmondásának alapja valószínűleg a vizsgálat során alkalmazott módszerek, valamint a kérdésfeltevés különbözősége. Wahlberg és mtsai. két mitokondriális (COI és 16S), valamint két nukleáris gént (elongációs faktor-1a és wingless factor) tanulmányoztak, hogy feltárják a filogenetikai rokonsági kapcsolatokat a Melitaeini tribuszba tartozó lepkefajok között. Eltérő volt továbbá a felhasznált egyedek száma is.

Wahlberg és mtsai. ugyanis a tribusz összes faját vizsgálták, de fajonként csak egy-egy egyedet használtak fel. Ezzel szemben, az én vizsgálataim három *Melitaea*-faj genetikai szerkezetének elemzésére koncentrálnak és ennek megfelelően azoknak számos populációját elemeztem a differenciálódásuk mértéke, valamint a variabilitás szintjének megállapítása céljából. A két munka eredményei közötti ellentmondás arra világít rá, hogy a valós filogenetikai kapcsolatokat ebben a diverz *Mellicta* subgenusban csakis olyan módon lehet feltárni, hogy minden lehetséges taxonból számos egyedet vonunk be az analízisekbe, melyek eltérő földrajzi területről származnak.

Bár a *M. athalia* két fenológiai típusa nem különült el egyik analízisben sem, populációik nagyobb differenciálódást mutattak ($F_{ST}=0,045$), mint a másik két faj populációi (*M. britomartis* $F_{ST}=0,019$; *M. aurelia* $F_{ST}=0,003$). Továbbá a PCA-ban a *M. athalia* populációit reprezentáló pontok a 3. tengely mentén jelentősen szóródtak, illetve a Bayes-féle hierarchikus klaszterezés során is nagymértékű fajon belüli differenciálódásra derült fény. Ebből adódóan, további kérdések merültek fel a *M. athalia* populációk differenciálódásának trendjével kapcsolatban.

Eredményeim azt valószínűsítik, hogy a *M. athalia* fenológiai elkülönülése élőhelyi sajátosságokon alapszik. A két generációs ökotípus a nedves, meleg síkvidéki réteket kedveli, ahol a nyári aszályt a jó vízellátottság kompenzálhatja, emellett viszonylag hosszú a vegetációs periódus (Nyugat-Magyarország, Északkelet-Magyarország, Szatmár-Beregi síkság és Nyírség). Így a lárvális fejlődés esztivációs periódus nélkül mehet végbe, és egy nyár végi második generáció is kifejlődhet. Ezzel ellentétben, a szárazabb élőhelyeken a lárvák nyár közepén esztiválnak, így csak egy generáció fejlődik ki egy évben (esetleg előfordulhat részleges második generáció is). Ebből a plaszticitásból adódóan nem meglepő, hogy a fenológiai különbség nem párosul genetikai differenciálódással.

5. GENETIKAI ÉS MORFOMETRIAI DIFFERENCIÁLÓDÁS A *M. ATHALIA* KÁRPÁT-MEDENCEI POPULÁCIÓIBAN

5.1. Bevezetés

Ahogy azt már az 1. fejezetben említettem, a morfológiai valamint genetikai információk együttes figyelembevétele igen fontos a variabilitás és a differenciálódás szintjeinek, mintázatának megfelelő feltárásában. Mind a genetikai, mind pedig a morfometriai variabilitás széles körben tanulmányozott a természetes populációkban. Sok esetben külön-külön (morfometria: Wynhoff 2001; Fordyce és mtsai. 2002; Prieto és mtsai. 2009; Dapporto és mtsai. 2009; Tóth és Varga 2011; genetika: Aagaard és mtsai. 2002; Schmitt és mtsai. 2003; Bereczki és mtsai. 2005; Pecsénye mtsai. 2007 a, b), de együttes elemzésükre is van példa (Garnier és mtsai. 2005; Fiorentino és mtsai. 2008; Francoy és mtsai. 2009; Suwanvijitr és mtsai. 2010; Dincă és mtsai. 2011b; Hollós és mtsai. 2012). Ez utóbbi munkákban a genetikai és a morfometriai eredmények összehasonlítására helyezik a hangsúlyt. Fontos azonban annak a vizsgálata is, hogy van-e valamilyen kapcsolat a genetikai, a morfometriai és az ökológiai (pl. fenológiai, vagy esetleg a tápnövény szerinti) differenciálódás között.

A genetikai és az ökológiai differenciálódás közötti korreláció nem mindig egyértelmű a rovarok esetében. A növényevő fajoknál például egy jelentős ökológiai tényező a tápnövény. Több szerző is foglalkozott a generalista jelleg, illetve a tápnövény specializáció genetikai következményeivel (Via 1999; Berlocher és Feder 2002; Stireman és mtsai. 2005). Számos esetben tapasztaltak differenciálódást olyan populációk között, amelyek más tápnövényt hasznosítanak (pl. *Timema cristinae*: Nosil és mtsai. 2002; *Zeiraphera diniana*: Emelianov és mtsai. 2004; Apidae: Packer mtsai. 2005). Ugyanakkor ennek az ellenkezője is ismert:

pl. „*pneumonanthae*” és „*cruciata*” ökotípus a *Maculinea alcon* esetében (Als és mtsai. 2004; Bereczki és mtsai. 2006). Egy másik fontos tényező a rovarok ökológiájában a fenológia, bár csupán néhány tanulmány foglalkozik a fenológiai különbségek genetikai struktúrára gyakorolt hatásával (Marcon és mtsai. 1999; Coates és mtsai. 2004; Santos és mtsai. 2007). Mivel a *M. athalia*-nak két fenológiai típusa ismert a Kárpát-medencében (egy generációs, ill. két generációs típus), érdekesnek találtam megvizsgálni a fenológiai differenciálódás és a genetikai struktúra kapcsolatát. Emellett izgalmas kérdés, hogy lehet-e párhuzamot vonni a genetikai és a morfológiai differenciálódás között.

A korábbi eredmények arra utaltak, hogy miközben a *M. athalia* populációk között igen magas a genetikai differenciálódás, a két fenológiai típus nem különül el egymástól. Mivel a különböző habitatokban eltérő szelekciós viszonyok uralkodhatnak, valamint a faj történetében lezajló kolonizációs folyamatok eredményeként eltérő leszármazási vonalak népesíthetik be a különböző földrajzi régiókat, ezért alternatív hipotézisként felmerülhet, hogy a *M. athalia* populációk jelentős mértékű differenciálódásának hátterében egyfajta földrajzi mintázat áll.

A fentiek alapján arra voltam kíváncsi a vizsgálataim során, hogy vajon milyen trendek érvényesülnek a *M. athalia* populációk differenciálódását tekintve a Kárpát-medencében. Továbbá arra is szerettem volna fényt deríteni, hogy lehet-e valamilyen párhuzamot vonni a genetikai- és a fenotípusos differenciálódás között.

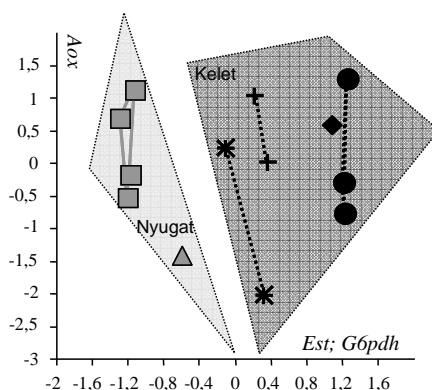
Az enzimpolimorfizmus valamint a morfometriai vizsgálatokban a Kárpát-medencében 1999 és 2009 között gyűjtött *M. athalia* mintákat dolgoztam fel. A morfometriai elemzésekhez csak a hím egyedeket használtam, így a mintaszám valamint az egyedszámok kissé módosultak a korábbi genetikai vizsgálathoz képest. A párhuzamos vizsgálat

kivitelezhetősége érdekében az enzimpolimorfizmus adatokból kiválogattam azokat a mintákat, amelyek a morfometriai vizsgálatokban is szerepelnek, és csak ezeket használtam fel az elemzésben. A feldolgozott minták gyűjtőhelyeit a régiós besorolásokkal valamint az egyedszámokkal a 9. függelékben foglaltam össze.

5.2. Eredmények

5.2.1. Az enzimpolimorfizmus vizsgálat eredményei

Az *M. athalia* populációk allélfrekvencia adatai alapján első lépésben **főkomponens analízist** (PCA) végeztem (10. ábra). Mivel a korábbi vizsgálat eredményei nem mutatták ki a két fenológiai típus elkülönülését, ugyanakkor a *M. athalia* populációk között igen magas szintű volt a differenciálódás, ésszerűnek tartottam megvizsgálni a genetikai variancia földrajzi mintázatát.



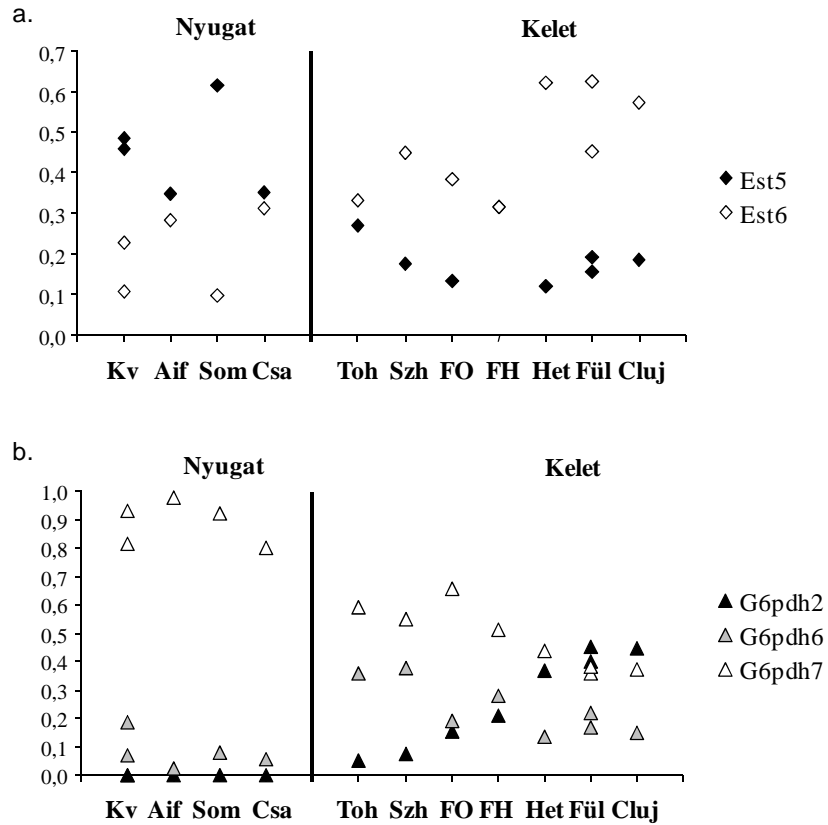
10. ábra: A genetikai adatokon végzett főkomponens analízis eredményei. Minden pont egy *M. athalia* populációt reprezentál a változók redukált terében. ■: Órség régió populációi; ▲: Vértés régió populációja (Csákvár); *: Aggteleki karszt régió populációi; +: Nyírség régió populációi; ●: Bereg régió populációi; ◆: Erdély régió populációja (Kolozsvár mellől). Az 1. és 2. tengelyt meghatározó enzimlokuszokat azok rövidítése jelzi.

Az analízis egyértelmű genetikai differenciálódást mutatott ki a földrajzi régiók szintjén, amely a Beregi-sík és az Őrség régiók között volt a legkifejezettebb. Továbbá az is jól látható, hogy a 6 régió populációi két csoportba sorolhatók a Kárpát-medence két területének (keleti, ill. nyugati) megfelelően (10. ábra). Az első két tengelyt három enzimlokusz (1. tengely: *Est*, *G6pdh*; 2. tengely: *Aox*) határozza meg, amelyek a teljes genetikai variancia 63,5%-át magyarázzák (10. függelék).

Mivel a legnagyobb különbség a Kárpát-medence két területe között az *Est* és a *G6pdh* lokuszokon mutatkozott, összehasonlítottam a leggyakoribb allélok frekvenciáit a Kárpát-medence keleti és nyugati populációi között ezen a két lokuszon (11. ábra). Az *Est* lokusz esetében (11a. ábra) a nyugati populációkban a ötös allél frekvenciája (átlag: 0,45) míg a keleti populációkban a hatos allél (átlag: 0,47) volt a magasabb.

A legnyilvánvalóbb különbség azonban a *G6pdh* lokuszon mutatkozott a medence két része között (11b. ábra). A nyugati populációkban a hetes számú allél igen magas frekvenciája (átlag: 0,89) volt a jellemző. A keleti populációkban viszont a kettes, hatos és hetes allél egyaránt jelen volt ezen a lokuszon, sőt a kettes allél kizárólag csak a keleti populációkban jelent meg.

Harmadik lépésben az allélfrekvencia adatok alapján számított Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokon alapuló **UPGMA dendrogramot** szerkesztettem (12. ábra). A regionális differenciálódás itt is jellemző volt, sőt a keleti-, és nyugati Kárpát-medence populációi egyértelműen elkülönültek egymástól, amit magas *bootstrap* érték is alátámasztott (12. ábra).



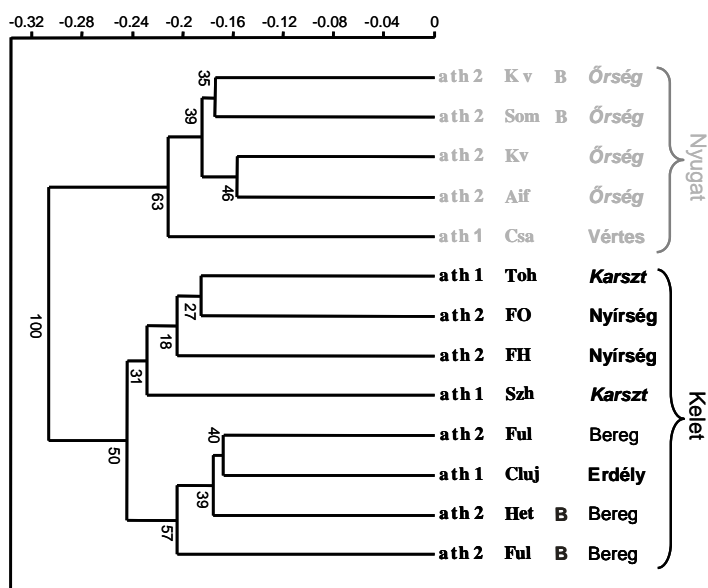
11. ábra: A leggyakoribb allélok frekvenciájának a megoszlása azon a két enzimlokuszon, melyek a genetikai variancia legnagyobb hányadát magyarázták meg a PCA-ban.

Kv: Kétvölgy; **Aif:** Apátistvánfalva; **Som:** Szomoróc; **Csa:** Csákvár; **Toh:** Tohonya-völgy; **Szh:** Szőlőhegy; **FO:** Fényi erdő (Ömböly); **FH:** Fényi erdő (határszél); **Het:** Hetefejércse; **Fül:** Fülesd; **Cuj:** Kolozsvár (Cluj-Napoca)

A Kétvölgy (Kv), Hetefejércse (Het) és Fülesd (Ful) populációkban első és második generációból gyűjtött minták is szerepeltek.

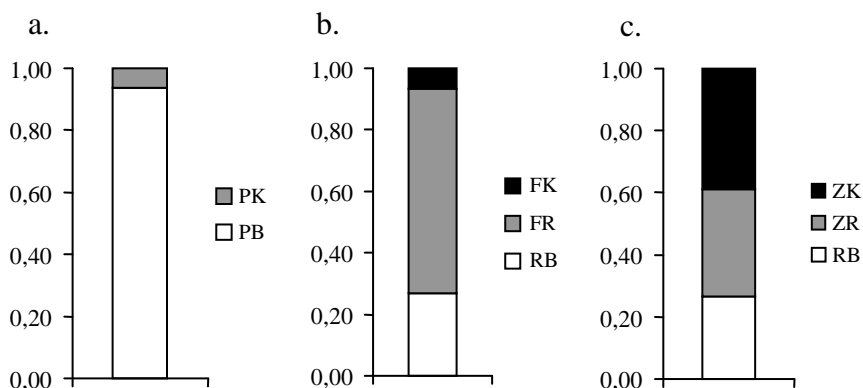
a.: Az *Est* lokusz alléljainak megoszlása a mintákban.

b.: A *G6pdh* lokusz alléljainak megoszlása a mintákban.



12. ábra: A Cavalli-Sforza és Edwards féle hűrtávolságok alapján szerkesztett UPGMA dendrogram. **Kv:** Kétvölgy; **Aif:** Apátistvánfalva; **Som:** Szomoróc; **Csa:** Csákvár; **Toh:** Tohonya-völgy; **Szh:** Szőlőhegy; **FO:** Fényi erdő (Ömböly); **FH:** Fényi erdő (határszél); **Het:** Hetefejércse; **Fül:** Fülestd; **Cuj:** Kolozsvár (Cluj-Napoca). **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*, **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*. **B:** második generációból gyűjtött minta.

A továbbiakban **molekuláris varianciaanalízis** (AMOVA) segítségével vizsgáltam a teljes genetikai variancia megoszlását (13. ábra) a hierarchia különböző szintjein. Az adatok elemzése során kétféle hierarchiát használtam: a populációkat régiókba rendeztem, majd a régiókat a fenológiai típusuknak illetve a származási területüknek megfelelően (keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence) is csoportosítottam. A kétféle hierarchia tehát a legfelső szinten különbözött: az első esetben a fenológiai típusok közötti varianciát, míg második esetben a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence közötti varianciát határoztam meg. Az alsóbb hierarchia szintek mindkét analízisben megegyeztek: régiók között a csoporton belül, régióon belül a populációk között, populáción belül az egyedek között (13. ábra).



13. ábra: Az AMOVA eredményei.

Variancia komponensek: **PK**: populációk közötti; **PB**: populációkon belül az egyedek közötti; **FK**: a két fenológiai típus közötti; **FR**: a két fenológiai típuson belül a régiók közötti; **RB**: a régiókon belüli; **ZK**: a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence közötti; **ZR**: a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencén belül a régiók közötti; **RB**: a régiókon belüli.

a.: A teljes genetikai variancia megoszlása a populációk között és populációkon belül.

b.: A populációk közötti variancia megoszlása (1. analízis): a hierarchia legfelső szintje a *M. athalia* két fenológiai típusa.

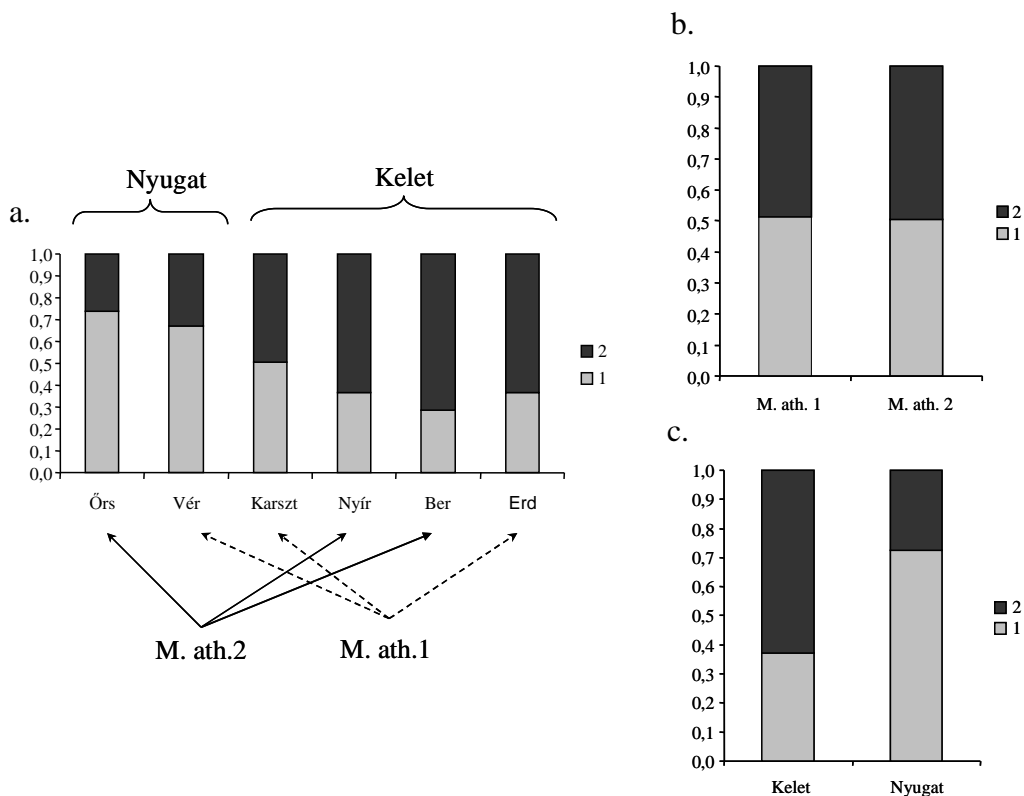
c.: A populációk közötti variancia megoszlása (2. analízis): a hierarchia legfelső szintje a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence.

Az adatokat két lépésben elemeztem. A teljes genetikai variációt először a populációk közötti illetve az azokon belüli (egyedek közötti) variancia komponensekre bontottam (13a. ábra). Mint az várható volt, a variancia legnagyobb hányadát a populációkon belüli komponens magyarázta, míg a populációk között lévő különbség viszonylag alacsony (6%) volt. A második lépésben ez utóbbi komponenst vizsgáltam tovább, vagyis elemeztem a variancia megoszlását a kétféle hierarchia esetében, ahol a régiókat a fenológiai típusok szerint, vagy a Kárpát-medence területei szerint (keleti és nyugati) csoportosítottam.

A variancia megoszlása mind a két hierarchia esetében a *M. athalia* populációk egyértelmű regionális differenciálódását tükrözi, mivel a teljes populációk közötti variáciának csak viszonylag kis hányada (26,7%) mutatkozott meg a régiókon belül (13b., c. ábra, RB). Mivel a továbbiakban

arra voltam kíváncsi, hogy a régiók milyen módon csoportosíthatók, ezért összehasonlítottam a kétféle hierarchia legfelsőbb szintjét magyarázó variancia hányadokat. Abban az analízisben, ahol a hierarchia legfelső szintjének a *M. athalia* két fenológiai típusát tekintetem, a teljes populációk közötti genetikai varianciának csupán kis hányada (FK: 6,6%) mutatkozott ezen a szinten (13b. ábra). A másik analízisben azonban, amikor a hierarchia csúcsa a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence volt, a teljes populációk közötti varianciának viszonylag nagy hányada (ZK: 39%) volt megfigyelhető ezen a szinten (13c. ábra). Ez az eredmény szintén azt támasztja alá, hogy nincs differenciálódás a *M. athalia* két fenológiai típusa között, viszont a faj populációi a keleti-, és nyugati Kárpát-medencének megfelelően elkülönülnek egymástól.

A genetikai adatok elemzésének utolsó lépéseként a *M. athalia* populációk genetikai struktúráját a **Bayes-féle hierarchikus klaszterezési módszer** alkalmazásával vizsgáltam meg. A Structure program segítségével kapott eredményeket elemezve meghatároztam a valószínűsíthető genetikai klaszterek (K) számát a fajon belül. A K valószínűsíthető értékét 1 és 13 között tételeztem fel, mivel összesen 13 *M. athalia* minta szerepelt az analízisben. Minden egyes feltételezett K érték esetében 6-szor végeztem el az analízist, majd a ΔK értékét felhasználva meghatároztam a genetikai csoportok számát. A ΔK tulajdonképpen a standardizált valószínűség változását írja le a K értékek növekedésével (Evanno és mtsai. 2005). A görbét megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy a valószínűség növekménye a K=2 esetén a legmagasabb, ezért a *M. athalia* populációk esetében ez tekinthető a legvalószínűbb K értéknek.



14. ábra: A Bayes-féle hierarchikus klaszterezés eredménye. **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*; **Örs:** Órség régió; **Vér:** Vértes régió; **Nyír:** Nyírség régió; **Ber:** Bereg régió; **Erd:** Erdély régió. Fekete és szürke jelöli a különböző klasztereket (1, 2).

a.: A két genetikai klaszter megoszlása a különböző földrajzi régiók között.

b.: A két genetikai klaszter megoszlása a *M. athalia* két fenológiai típusa között.

c.: A két genetikai klaszter megoszlása kelet és nyugat között.

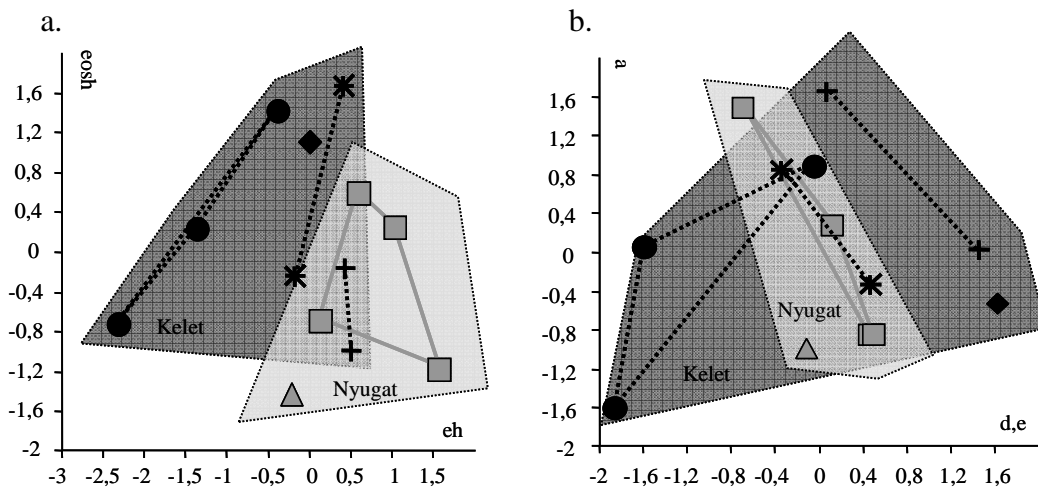
Annak érdekében, hogy megvizsgáljam a 6 földrajzi régió lehetséges csoportosításának a módját, összehasonlítottam a két klaszter megoszlását az egyes régiókban. A vizsgálat nagymértékű heterogenitást mutatott ki a két klaszter földrajzi megoszlását illetően (14a. ábra). A régiókat fenológiai típusuknak megfelelően csoportosítva nem tapasztaltam szignifikáns különbséget ($F_{1,11}=0,02$; $P=0,9$) a két genetikai klaszter megoszlásában a *M. athalia* egy és két generációs típusa között (14b. ábra). Ezzel ellentétben, amikor a földrajzi régiókat a Kárpát-medence keleti illetve nyugati

területeinek megfelelően csoportosítottam (14c. ábra) a klaszterek megoszlása szignifikánsan különbözött a két terület között ($F_{1,11}=50,7$; $P=<0,0001$). A Kárpát-medence keleti részéről származó populációkban a kettes klaszter dominált (62,8%), míg a nyugati részről származókban az egyes (72,4%). Az egyes és a kettes klaszterek közötti fő különbség az *Est* és *G6pdh* enzimlokuszok esetén mutatkozott meg, mely két lokusz a PCA-ban az első tengely meghatározója volt és allélfrekvenciájuk megoszlása is különbözött a két terület között.

Összességében tehát a Bayes-féle hierarchikus klaszterezési módszerrel elvégzett vizsgálat is alátámasztotta a *M. athalia* populációk földrajzi differenciálódását a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően.

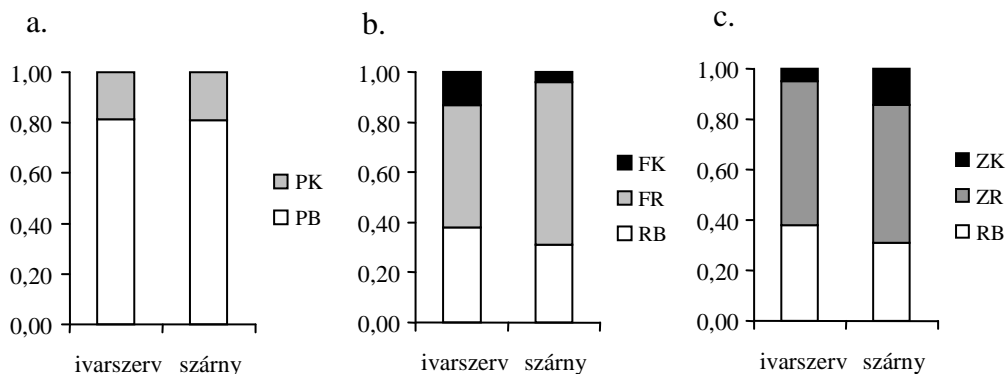
5.2.2. A morfometriai vizsgálatok eredményei

A morfometriai adatok elemzésének első lépéseként mindkét adathalmazra (szárny és hímvivarszerv) külön-külön **főkomponens analízist** (PCA) végeztem. Az eredmények kissé eltérnek az enzimpolimorfizmus vizsgálatok során kapottaktól. A szárnyjellegek esetében a genetikai eredményekhez hasonlóan egyértelmű regionális differenciálódás mutatkozott (15a. ábra). Az elkülönülés itt is az Őrség és a Bereg régió között a legkifejezettebb, melyeknek populációi az első tengely mentén alkotnak két jól elkülönülő pontfelhőt. Ez a tengely a teljes variancia 92,1%-át magyarázza és kialakításában az elülső szárny hossza (eh) játssza a legnagyobb szerepet. A keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence populációi két többé-kevésbé átfedő pontfelhőt alkotnak a változók redukált terében, amely arra utal, hogy közöttük csak részleges az elkülönülés (15a. ábra).



15. ábra: A morfometriai adatokon végzett főkomponens analízis eredményei. (A faktortér tengelyeit meghatározó variancia százalékos megoszlását a 11. és 12. függelék tartalmazza.) Minden pont egy *M. athalia* populációt reprezentál a változók redukált terében. ■: Őrség régió populációi; ▲: Vértés régió populációja (Csákvár); *: Aggteleki karszt régió populációi; +: Nyírség régió populációi; ●: Bereg régió populációi; ◆: Erdély régió populációja (Kolozsvár mellől). A tengelyeket meghatározó jellegek: szárny – **eh**: az elülső szárny hossza; **eosh**: az elülső szárny oldalsó szegély hossza; genitália – **a**: a saccus centrális bemetszésének hossza; **d**: a harpe belső ívének hossza; **e**: a harpe külső ívének hossza.
a.: szárny.
b.: hímvivarszrev.

A földrajzi differenciálódás az ivarszerven mért jellegek tekintetében kevésbé kifejezett (15b. ábra). Bár a Nyírség és a Bereg régió egyértelműen elkülönül az első tengely mentén (amely a teljes fenotípusos variancia 70,0%-át magyarázza és a meghatározásában a harpe jellegei dominálnak), a többi régió populációi jelentősen átfedő pontfelhőt alkotnak. Mitöbb, a nyugati Kárpát-medence populációi teljesen beleágyazódnak a keleti Kárpát-medence pontfelhőjébe (15b. ábra), vagyis a hímvivarszerven mért jellegek alapján nem mutatható ki a *M. athalia* populációk kelet-nyugat szerinti földrajzi elkülönülése.



16. ábra: Az ANOVA eredményei.

Variancia komponensek: **PK:** populációk közötti; **PB:** populációkon belül az egyedek közötti; **FK:** a két fenológiai típus közötti; **FR:** a két fenológiai típuson belül a régiók közötti; **RB:** a régiókon belüli; **ZK:** a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence közötti; **ZR:** a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencén belül a régiók közötti; **RB:** a régiókon belüli.

a.: A teljes fenotípusos variancia megoszlása a populációk között és a populációkon belül.

b.: A populációk közötti variancia megoszlása (1. analízis), ahol a hierarchia legfelső szintje a *M. athalia* két fenológiai típusa.

c.: A populációk közötti variancia megoszlása (2. analízis), ahol a hierarchia legfelső szintje a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence.

A morfometriai adatok elemzésének következő lépéseként **hierarchikus varianciaanalízist** (ANOVA) hajtottam végre annak érdekében, hogy megvizsgáljam a teljes fenotípusos variancia megoszlását a hierarchia különböző szintjein. A genetikai eredményekkel való összehasonlítás érdekében a hierarchia szintek az ott leírtakhoz hasonlóak voltak: az első analízis sorozatban a legfelső szintnek a fenológiai típusokat, míg másodikban a Kárpát-medence keleti-, ill. nyugati területét tekintettem mindkét morfometriai jelleg-együttes esetében (szárny és hímvivarszerv). Az alsóbb hierarchia szintek, a genetikai vizsgálatokhoz hasonlóan, azonosak voltak a két analízis sorozatban mind a két morfometriai jelleg együttes adatainak elemzése során (16. ábra).

Az eredmények értékelése két lépésben történt. Először a teljes fenotípusos varianciát bontottam két komponensere (populációk közötti és populációkon belüli komponens) mind a szárnyakon mind pedig az

ivarszerveken mért jellegek esetében. A populációk közötti variancia hányad mindkét jellegcsoport esetében magasabb (19%) volt, mint a genetikai vizsgálat során (6%) (16a. ábra). A következő lépésben ez utóbbi komponenst bontottam tovább mind a két hierarchiában, a szárny és a genitália jellegeinek elemzésénél egyaránt. A fenotípusos variancia regionális mintázata mindkét jellegcsoport esetében nyilvánvaló volt, mivel a teljes populációk közötti varianciának viszonylag magas (ivarszerv: 49%, 57%; szárny: 65%, 55%) hányada mutatkozott a csoportokon (fenológiai típusok, vagy a Kárpát-medence területei) belül, a régiók között (16b., c. ábra, FR, ZR). Az ivarszerven mért jellegek esetében a hierarcia legmagasabb szintjén (azaz a régiócsoportok között), több mint kétszer akkora variancia hányad mutatkozott amikor a régiókat fenológiai típusuk alapján csoportosítottam, mint amikor az osztályozás alapja a régiók kelet-nyugati elhelyezkedése volt (16b., c. ábra, ivarszerv, FK, ZK). Ugyanakkor a szárnyak jellegeinek vizsgálata során éppen ellentétes tendenciát tapasztaltam. A régiók kelet-nyugat szerinti csoportosítása nagyobb hányadát magyarázta a populációk közötti varianciának, mint a fenológiai típusuk szerinti osztályozás (16b., c. ábra, szárny, ZK, FK). Ezt az eltérést a két jellegcsoport között azonban elhanyagolhatónak tekinthetjük, hiszen a régió csoportok közötti variancia komponensek minden analízisben nagyon alacsony hányadát képezték a teljes fenotípusos varianciának. A fenológiai típusok közötti variancia komponens például 2,5% volt a genitálián mért jellegek esetében, míg a kelet-nyugat Kárpát-medence közötti komponens 2,7%-nak adódott a szárny jellegeit tekintve (16b., c. ábra). Az ANOVA eredményei tehát nem támasztották alá sem a két fenológiai típus, sem pedig a keleti- ill. nyugati Kárpát-medencei *M. athalia* populációk elkülönülését.

Végül **diszkriminancia analízist** végeztem mindkét morfometriai adathalmazra három-három lépésben. A vizsgálatokban azt határoztam meg, hogy az egyes egyedek milyen valószínűséggel sorolhatók be (i) a 6 földrajzi

régióba, (ii) a két fenológiai típusba, valamint (iii) a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelő területekbe.

Az első analízisben a földrajzi régiók szerint végeztem el az osztályozást. Mindkét morfológiai jellegcsoport esetében 3 diszkriminancia függvény bizonyult szignifikánsnak az ötből, bár csak az első függvény Wilks' λ értéke utalt a régiók jó elkülönülésére (13. függelék). Az első tengely a szárny jellegek analízisében a teljes differenciálódásnak a 80,8%-át, míg a genitálián mért jellegek esetében csupán a 47,6%-át magyarázta meg. Ennek a tengelynek a meghatározásában a szárnyjellegek közül az elülső szárny hossza (eh) és a hátsó szárny hátsó szegély hossza (hhsh), míg az ivarszerv jellegei közül a harpe külső ívének a hossza (e) ill. az uncus hossza (b) voltak a meghatározók. Összevetve a különböző földrajzi régiókba helyesen besorolt egyedek arányát a két morfometriai jellegcsoporton végzett analízisben megállapítottam, hogy az eredmények hasonlóak voltak.

Az egyedek korrekt besorolásának az aránya a megfelelő földrajzi régióba a Bereg (szárny: 85,7%; ivarszerv: 70,3%) és a Nyírség régiók esetében (szárny: 67,5% ; ivarszerv: 58,2%) volt a legmagasabb mind a két jellegcsoportnál (2. táblázat). Az erdélyi régió esetében viszont igen alacsony volt a helyes besorolások aránya (25% és 0% a szárnyakat és az ivarszerveket illetően), ami valószínűleg a kis egyedszámnak tudható be (2. táblázat, 9. függelék).

A diszkriminancia analízis második lépésében a *M. athalia* két fenológiai típusa közötti különbséget elemeztem a szárnyon és az ivarszerven mért jellegekre külön-külön. Bár a két fenológiai típus között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott mindkét jellegcsoport esetében (szárny: $\chi^2=37,65$; $df=12$; $P=0,0002$ és ivarszerv: $\chi^2=70,96$; $df=11$; $P<0,0001$), a Wilks' λ értékek nagyon magasak voltak (szárny: 0,873; ivarszerv: 0,892). Ez arra utalt, hogy a diszkriminancia függvények alapján az egyedek besorolása a két fenológiai típusba mind a szárny mind pedig a genitália jellegek alapján alacsony hatékonyságú. A szárnyjellegek közül a második sapkafolt egyik

jellege (sfd) és az elülső szárny csúcsi szöge (β) játszik fontos szerepet a két fenológiai típus elkülönítésében. Az ivarszerv jellegei közül az uncus szélessége (c) valamint hossza (b) volt a meghatározó ebben a vonatkozásban. Az egyedek besorolása a két fenológiai típusba meglehetősen aszimmetrikus eredményre vezetett mind a két jellegcsoport elemzése során (3a. táblázat). A két generációs *M. athalia* egyedeit nagyon sikeresen lehetett besorolni a nekik megfelelő fenológiai típusba mind a szárnyon (92,4%), mind pedig az ivarszerven (93,9%) mért jellegek alapján. Ezzel szemben az egy generációs fenológiai típus egyedeinek korrekt osztályozása meglehetősen alacsony szintű volt, mindössze 24,0% a szárny jellegek illetve 40,6% az ivarszerv jellegei alapján (3a. táblázat).

	Nyírség	Bereg	Karszt	Erdély	Vértes	Őrség	Össz.
Szárny							
Nyírség	54	5	4	1	2	14	80
Bereg	2	54	6	0	0	1	63
Karszt	11	2	21	1	2	12	49
Erdély	6	0	3	3	0	0	12
Őrség	24	2	13	1	0	27	67
Vértes	4	0	1	0	6	3	14
Genitália							
Nyírség	39	8	4	2	3	11	67
Bereg	8	52	1	0	1	12	74
Karst	10	2	22	0	0	10	44
Erdély	5	1	2	0	1	1	10
Vértes	2	3	3	0	2	5	15
Őrség	9	20	8	1	2	32	72

2. táblázat: A vizsgált egyedek földrajzi régiók szerinti besorolása a szárnyon és az ivarszerveken mért jellegek alapján.

Harmadik lépésben a keleti-, és nyugati Kárpát-medence közötti elkülönülést (3b. táblázat) vizsgáltam párhuzamosan a szárnyon és az ivarszerven mért jellegek alapján. A diszkriminancia függvény statisztikailag

szignifikáns különbséget mutatott a két földrajzi terület között is mind a szárny ($\chi^2=46,07$; $df=12$; $P<0,0001$) mind pedig az ivarszerv ($\chi^2=31,31$; $df=11$; $P=0,001$) jellegeinek vizsgálata során. Ugyanakkor a Wilks'λ értékek ebben az elemzésben is magasak voltak (szárny: 0,847; ivarszerv: 0,892), vagyis a diszkriminancia függvények alapján az egyedek besorolása a két földrajzi területhez alacsony hatékonyságú. A szárny jellegei közül ezt a diszkriminancia függvényt is az elülső szárny hossza (eh) ill. a hátsó szárny hátsó szegély hossza (hhsh) határozta meg, míg az ivarszerv esetében a függvény kialakításában a processus posterior belső oldalának hossza (i) és az uncus szélessége (c) volt a legjelentősebb. A függvények alapján megpróbáltam az egyedeket besorolni a származásuknak megfelelő földrajzi zónába (keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence). Ebben az analízisben is aszimmetrikus eredményt kaptam mind a két morfometriai jellegcsoport elemzése során (3b. táblázat). A keleti Kárpát-medencéből származó egyedek besorolásának sikere kiugróan magas volt (94%) mind a két jellegcsoport elemzése során. Ezzel ellentétben a nyugati Kárpát-medencei egyedek korrekt besorolása meglehetősen rossz hatékonyságú volt: 26% a szárny, illetve 23% az ivarszerv jellegei alapján.

a.	szárny			genitália		
	monovoltin	bivoltin	össz.	monovoltin	bivoltin	össz.
monovoltin	18	57	75	28	41	69
bivoltin	16	194	210	13	200	213
b.	kelet	nyugat	össz.	kelet	nyugat	össz.
kelet	192	12	204	184	11	195
nyugat	60	21	81	67	20	87

3. táblázat: A vizsgált egyedek besorolása a szárnyon és az ivarszerveken mért jellegek alapján.

a.: Az egyedek besorolása a két fenológiai típusnak megfelelően.

b.: Az egyedek besorolása a Kárpát-medence két területének megfelelően.

5.3. Eredmények megvitatása

A *M. athalia* taxonómiája erősen vitatott (Guillaumin és Descimon 1976; Ahtelik 2006; Descimon és Mallet 2010), esetleges rejtett fajok jelenléte sem kizárt (Schadewald 1988; Tolman és Lewington 1998; Leneuve és mtsai. 2009; Kudrna és mtsai. 2011). Ezért a fő célom az volt, hogy megvizsgáljam a *M. athalia* populációk differenciálódási mintázatát a Kárpát-medencében, és felfedjem annak lehetséges hátterét.

A genetikai és a morfometriai adatok párhuzamos elemzése rávilágít ugyan a *M. athalia* populációk genetikai struktúrájának alapvető jellemzőire, a kép azonban még közel sem teljes. Minden genetikai analízisben kimutattam a populációk regionális differenciálódását, ráadásul a régiók két genetikailag jól elkülönülő csoportot alkottak a kelet és nyugat Kárpát-medencének megfelelően. A főkomponens analízisben (PCA) a populációk két teljesen elkülönülő pontfelhőbe csoportosultak és a Bayes-féle hierarchikus klaszterezés által valószínűsíthető két genetikai klaszter megoszlása is a földrajzi régiók kelet-nyugat elkülönülését támasztja alá. Ezen felül az AMOVA-ban a populációk közötti különbséget magyarázó varianciakomponens jelentős hányadát a kelet-nyugat közötti különbség tette ki. Érdeemes megjegyezni azt is, hogy ezen analízisek egyikében sem volt kimutatható genetikai differenciálódás a *M. athalia* két fenológiai típusa között.

A mintavételi stratégiából adódóan ugyan nem zárható ki, hogy a *M. athalia* populációk genetikai struktúrája egy klinnel jellemezhető, az eredmények azonban sokkal erősebben támasztják alá a differenciálódás földrajzi mintázatát, azaz a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medence populációinak elkülönülését. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a Vértes hegység, amely körülbelül fele távolságban található a keleti (Bereg, Nyírség és

Karszt) és a nyugati (Őrség) régiók között, egyértelműen a nyugati populációk genetikai struktúráját mutatja (lásd. 10. és 11. ábra).

A statisztikai analízisek eredményei tehát azt tükrözik, hogy a *M. athalia* populációk genetikai és morfometriai differenciálódásának alapstruktúrája a regionális mintázat. Ugyanakkor a genetikai differenciálódás szerkezete bonyolultabb, hiszen a régiók tovább csoportosíthatók és földrajzi elhelyezkedésük alapján besorolhatók a Kárpát-medence keleti vagy nyugati területeibe. Azt a jelenséget, hogy a genetikai differenciálódás mintázata egy kelet-nyugati elkülönülést mutat más Kárpát-medencei lepkefajok (*Parnassius mnemosyne*, *Polyommatus coridon*, *Euphydryas aurinia*, *Erebia medusa*, *Melanargia galathea*) esetében is kimutatták (Habel és mtsai. 2005; Schmitt és mtsai. 2006 a, b; Schmitt és mtsai. 2007; Gratton és mtsai. 2008; Habel és mtsai. 2011; Schmitt és Zimmermann 2012). Ezeknek a fajoknak az életmenete, reprodukív stratégiája és élőhelyigénye igen eltérő. Feltehető tehát, hogy a hasonló genetikai struktúra háttérben hasonló történeti folyamatok állnak (jégkorszaki refugiumok és/vagy jégkorszak utáni kolonizációs útvonalak). Ebből adódóan ez a differenciálódási mintázat további, eddig nem vizsgált fajoknál is megjelenhet, amely lényegében azt tükrözi, hogy a faj a Kárpát-medencében nem egy folytonos genetikai összetételű populációrendszer.

A morfometriai analízisek eredményei azonban csak részben tűntek koherensnek a genetikai eredményekkel. A fenotípusos variancia, a genetikai varianciához hasonlóan, regionális mintázatot mutatott. Mindkét morfológiai jellegcsoport elemzésében regionális differenciálódást tapasztaltam. A hierarchikus ANOVA és a főkomponens analízis (PCA) eredményei egyaránt jól tükrözik a régiók közötti elkülönülést. A fenotípusos variancia viszonylag nagy hányada jelent meg a régiók között és a populációk az első tengely mentén jól elváltak a földrajzi régióknak megfelelően. A diszkriminancia analízis eredményei is alátámasztották ezt a mintázatot, hiszen az első

függvény nemcsak szignifikáns volt, hanem az egyedek osztályozásában is hatékonyak mutatkoztak. Ugyanakkor sem a szárny, sem pedig az ivarszerv adatainak elemzése során nem tapasztaltam világos elkülönülést a hierarchia legfelsőbb szintjein (keleti/nyugati földrajzi területek vagy, monovoltin/bivoltin fenológiai típus). A fenológiai különbség tehát nem párosult fenotípusos differenciálódással sem a *M. athalia* esetében. A két fenológiai típusba, valamint a Kárpát-medence két részébe történő besorolás esetében tapasztalt aszimmetria valószínűleg a diszkrimináló jellegek variabilitásának eltéréseiből adódhat.

Az 5. fejezetben taglalt vizsgálati eredmények arra is rávilágítottak, hogy a *M. athalia* két fenológiai típusa sem genetikailag, sem pedig fenotípusosan nem különült el egymástól. Warren (1987) kimutatta, hogy a környezeti tényezők (napsütötte órák száma, hőmérséklet, páratartalom stb.) jelentős hatással vannak a *M. athalia* lárváinak a fejlődésére. Ez alapján tehát feltehető, hogy a vizsgált fajban az egy illetve két generációs fenológiai alakok a faj nagymértékű fenotípusos plaszticitásnak a következményei.

6. A GENETIKAI ÉS A FENOTÍPUSOS VARIABILITÁS SZINTJE A *MELICTA* SUBGENUS FAJAINAK KÁRPÁT-MEDENCEI POPULÁCIÓIBAN

6.1. Bevezetés

A *Mellicta* subgenus egy taxonómiailag viszonylag bonyolult csoportnak tekinthető, részben külső jellegeik nagymértékű variabilitása, részben pedig rejtett fajok és alfajok jelenléte miatt (Schadewald 1988; Ehbort és Rennwald 1991; Tolman és Lewington 1998, Settele 1999; Achtelik 2006; Leneuve 2009). Bár a subgenus fajainak életmenete és szaporodási stratégiája hasonló, tápnövény hasznosításuk, voltinizmusuk valamint lárvális viselkedésük kismértékben eltérő (lásd 2.3. fejezet, 2. függelék). Ezek az ökológiai különbségek hatással lehetnek a fajok variabilitásának szintjére és szerkezetére. A szaporodási stratégia általános hasonlósága mellett azonban kisebb különbségek is megfigyelhetők a három *Melitaea*-faj között hernyóik viselkedését tekintve. A *M. athalia* hernyók már nyáron, az esztiváció előtt szétszélednek és külön-külön kezdik meg a diapauzát (Warren 1987 a). A *M. britomartis* és a *M. aurelia* hernyói viszont csak tavasszal, a közös esztiváció és hibernáció után kezdenek önállóan táplálkozni (Tolman és Lewington 1998). Amennyiben a sztochasztikus hatások függenek a hernyók közös táplálkozásának hosszától és diapauzájától, akkor a drift intenzitása eltérő lehet a három fajnál. Érdekes tehát megvizsgálni, hogy van-e a genetikai variancia szintjében különbség a *Melitaea*-fajok között. Ugyanakkor a *Melitaea*-fajok tápnövény-specifitása is eltérő. Ha a vizsgált fajokat tekintve felállítunk egy skálát, akkor azon a három faj közül a *M. aurelia* tekinthető a leginkább tápnövény specialistának, ugyanis hernyóik elsődlegesen különböző *Plantago* fajokkal táplálkoznak (Urbahn 1952; Lepidopteren Arbeitsgruppe 1987; Ehbort és Rennwald 1991; Tolman 1997).

A *M. britomartis* tápnövénytáplálékspektruma szintén meglehetősen szűk, mert hernyója csak bizonyos *Veronica* fajokat preferál, bár *Plantago* fajokat is fogyaszt (Urbahn 1952; Lepidopteren Arbeitsgruppe 1987; Ehbort és Rennwald 1991; Tolman 1997). Ugyanakkor a vizsgált fajok vonatkozásában a *M. athalia* széles tápnövény preferenciával jellemezhető, mert hernyója a *Plantago* és *Veronica* fajokon kívül fogyasztja a *Melampyrum* és *Pedicularis* fajokat is (Urbahn 1952; Lepidopteren Arbeitsgruppe 1987; Ehbort és Rennwald 1991; Tolman 1997). A specialista és generalista táplálkozás (jelen esetben a szűkebb illetve tágabb táplálékspektrum) közötti különbség szintén befolyásolhatja a genetikai variabilitás mértékét.

Vizsgálatom első részében tehát arra kerestem a választ, hogy a *Melitaea*-fajok esetében milyen szintű a genetikai variabilitás, valamint hogy az említett életmódbeli különbségek milyen módon befolyásolhatják azt. Mivel a fent említett három faj közül a *M. athalia* két fenológiai típussal rendelkezik (lásd 2.3 fejezet), a második lépésben megvizsgáltam, hogy milyen trend érvényesül a genetikai és a fenotípusos variabilitás mértékében a *M. athalia* populációkban. Azt kerestem, hogy vannak-e különbségek a két fenológiai típus, vagy a különböző földrajzi régiók, valamint – a korábbi eredmények fényében – a Kárpát-medence keleti és nyugati területei között a genetikai és morfológiai variabilitás mértékében.

Vizsgálataimhoz a Kárpát-medence 6 földrajzi régiójából 1999 és 2009 között gyűjtött mintákat használtam fel (2. ábra). Mivel egy adott gyűjtőhelyről több évben is volt mintavétel ezért a 16 gyűjtőhelyről összesen 21 minta állt a rendelkezésemre (3. függelék). A morfológiai variabilitás elemzéséhez ebben az esetben is csak a hím egyedeket használtam fel annak érdekében, hogy elkerüljem a hím és a nőstény egyedek közötti szárnyméret-ill. alakbeli különbségekből adódó torzítást.

Így a mintaszám valamint az egyedszámok kissé különböztek a genetikai és morfometriai vizsgálatokban. A morfometriához felhasznált mintákat az egyedszámukkal valamint régiós besorolásukkal együtt a 9. függelék tartalmazza.

6.2. Eredmények

6.2.1. A genetikai variabilitás szintje a *Mellicta* subgenusban a három vizsgált fajt összehasonlítva

	N	n_A	H	P	F_{IS}
M. ath.	36,6	3,79	0,241	0,767	0,239
M. brito.	44,1	3,62	0,193	0,717	0,212
M. aur.	27,2	3,24	0,167	0,756	0,143
M. tot.	36,7	3,68	0,221	0,756	0,220

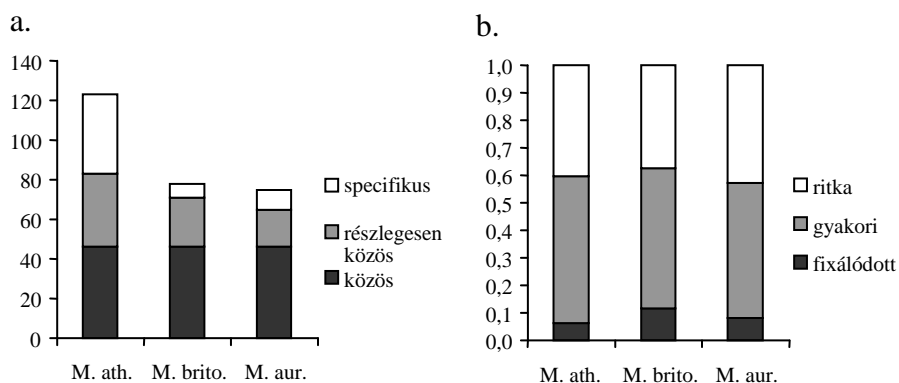
4. táblázat: Az enzimpolimorfizmus paraméterei. **N:** átlagos mintaszám; **n_A:** lokuszonkénti átlagos allélszám; **H:** átlagos heterozigóta gyakoriság; **P:** polimorf lokuszok aránya; **F_{IS}:** a heterozigóta hiányt jellemző index. **M. ath.:** *M. athalia*; **M. brito.:** *M. britomartis*; **M. aur.:** *M. aurelia*; **M. tot.:** a három fajból származó összes minta.

Az általam vizsgált 15 különböző enzimlokusz mindegyike rendelkezett alternatív allélokkal egy vagy több mintában, sőt a legtöbbjük erősen polimorfnak bizonyult. Tehát mindhárom megvizsgált faj mintáiban magas szintű enzimpolimorfizmus volt tapasztalható (4. táblázat). A lokuszonkénti átlagos allélszám (n_A), a polimorf lokuszok aránya (P), valamint az átlagos heterozigótaság (H) mindhárom faj esetében magasnak adódott.

A három faj polimorfizmusának mutatóit összehasonlítva, a *M. athalia* populációk voltak a legvariábilisabbak. Az átlagos heterozigóta gyakoriság (H) szignifikánsan magasabb volt (permutációs teszt, $p \leq 0,0005$)

a *M. athalia* mindkét fenológiai típusában, mint a másik két fajban (4. táblázat). A lokuszonkénti átlagos allélszám szignifikánsan kisebb volt (permutációs teszt, $p \leq 0,0005$) a *M. aurelia* mintákban, mint a másik két fajban. A polimorf lokuszok aránya (P) azonban mindhárom faj esetében hasonlóan adódott. A mintákon belüli varianciát jellemző index (F_{IS}) minden minta esetében szignifikáns heterozigóta hiányt tükrözött (4. táblázat).

A három faj teljes allélkészletének feltérképezése érdekében fajonként megállapítottam az összállélszámot és összehasonlítottam a különböző gyakorisággal előforduló allélok megoszlását. Három kategóriát különítettem el: (i) ritka allél ($0 < p < 0,05$); (ii) gyakori allél ($0,05 < p < 1$); (iii) fixálódott allél ($p = 1$). Ezek mellett meghatároztam a különböző allélok előfordulását a három fajban. Ebben az esetben is három kategóriát hoztam létre: (i) specifikus allél (csak az adott fajban fordult elő); (ii) részlegesen közös allél (több mint egy fajban jelent meg); (iii) közös allél (mind a három fajban megjelent).



17. ábra: A *Melitaea*-fajok genetikai variabilitása.

a.: A három vizsgált faj allélkészlete. **Specifikus:** speciális allélok száma; **részlegesen közös:** részlegesen közös allélok száma, amelyek több mint egy fajban jelentek meg; **közös:** mind a három fajban megjelent allélok száma.

b.: A különböző gyakoriságú allélok megoszlása a három vizsgált faj esetében.

Ritka: $p < 0,05$; **gyakori:** $0,05 < p < 1$; **fixálódott:** $p = 1$.

A fajok allélkészletét megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy a *M. athalia* számottevően több alléllal rendelkezik, mint a másik két faj, ami elsősorban a specifikus allélok magas számának köszönhető (17a. ábra). Az allélok megoszlása alapján megállapítható, hogy mindhárom faj esetében igen magas a ritka allélok aránya (~40%), míg a fixálódott allélok kis hányadot képviselnek (< 12%) (17b. ábra).

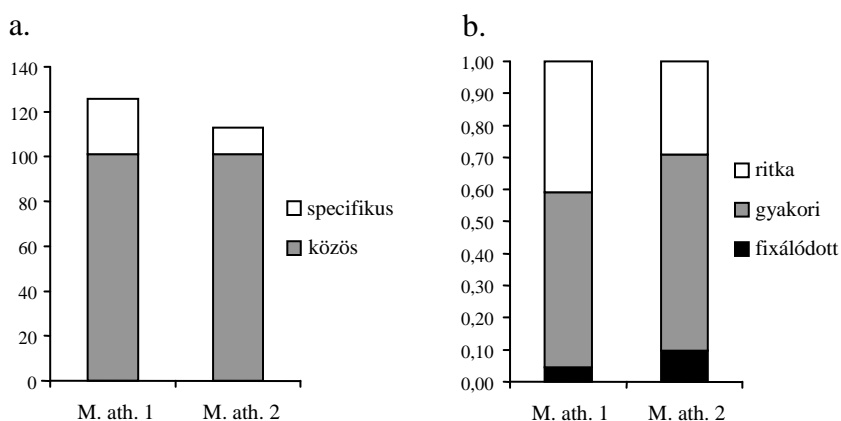
6.2.2. A *M. athalia* genetikai variabilitása

A *M. athalia* enzimpolimorfizmusát három lépésben elemeztem. Először a két fenológiai típus populációit vontam össze és összehasonlítottam az enzimpolimorfizmus paramétereit a két típus között (5. táblázat: *M. ath.* 1 és *M. ath.* 2). Érdekes módon ebben az analízisben nem nőtt jelentős mértékben sem az átlagos heterozigótaság, sem pedig a heterozigóta hiány mértéke az összevont „populációkban” (5.táblázat: H és F_{IS}). A két típus polimorfizmusának mutatóit összehasonlítva egyik vizsgált paraméter esetében sem figyeltem meg szignifikáns különbséget, ráadásul ebben az analízisben az összes vizsgált lokusz polimorfnek bizonyult ($P=1$).

	N	n_A	H	P	F_{IS}
M. ath. 1	212,5	7,93	0,252	1,000	0,232
M. ath. 2	299,7	7,00	0,237	1,000	0,306
M. ath. K	276,5	7,73	0,239	1,000	0,297
M. ath. NY	162,7	6,27	0,233	0,933	0,262
M. ath.	256,1	7,47	0,245	1,000	0,269

5. táblázat: Az enzimpolimorfizmus paramétereit a *M. athalia* fenológiai alak, illetve keleti-, és nyugati Kárpát-medence alapján összevont „populációiban”. **N**: átlagos mintaszám; **n_A**: lokuszonkénti átlagos allélszám; **H**: átlagos heterozigóta gyakoriság; **F_{IS}**: a mintákon belüli varianciát jellemző index; **M. ath. 1**: egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2**: két generációs *M. athalia*; **M. ath. K**: keleti Kárpát-medencei *M. athalia*; **M. ath. NY**: nyugati Kárpát-medencei *M. athalia*; **M. ath.**: összes *M. athalia* minta.

Ugyanakkor a *M. athalia* allélkészletét a két fenológiai típusban külön-külön megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy az egy generációs fenológiai típus több alléllal rendelkezik (kb. 5,4%-al), mint a két generációs. Ez tulajdonképpen az egy generációs típus specifikus alléljainak a többletéből adódik (18a. ábra). A különböző gyakoriságú allélok megoszlását vizsgálva azt tapasztaltam, hogy az egy generációs típus variabilitása magasabb szintű, mint a két generációs típusé: a ritka allélok aránya nagyobb (~41%), míg a fixálódott allélok aránya kisebb (4,5%) ebben a fenológiai típusban (18b. ábra).



18. ábra: A *M. athalia* két fenológiai típusának genetikai variabilitása. **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*, **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*.

a.: Az allélok száma. **Specifikus:** speciális allélok száma az adott fenológiai típus esetében; **közös:** mind a két fenológiai típusban megjelent, közös allélok száma.
b.: A különböző gyakoriságú allélok megoszlása a *M. athalia* esetében. **Ritka:** $p < 0,05$; **gyakori:** $0,05 < p < 1$; **fixálódott:** $p = 1$

A továbbiakban a *M. athalia* populációk mintáit a földrajzi régiók alapján vontam össze és összehasonlítottam a genetikai variabilitás mértékét a régiók között. Az eredmények azt mutatták, hogy a mintaszámok jelentős különbsége ellenére a polimorf lokuszok aránya (P – kivéve a Vértes régiót) és az átlagos heterozigóta gyakoriság (H) minden régióban hasonló volt (6. táblázat). Bár az átlagos allélszámokban számottevő különbségek mutatkoztak, ezek szoros korrelációban voltak a mintaszámokkal.

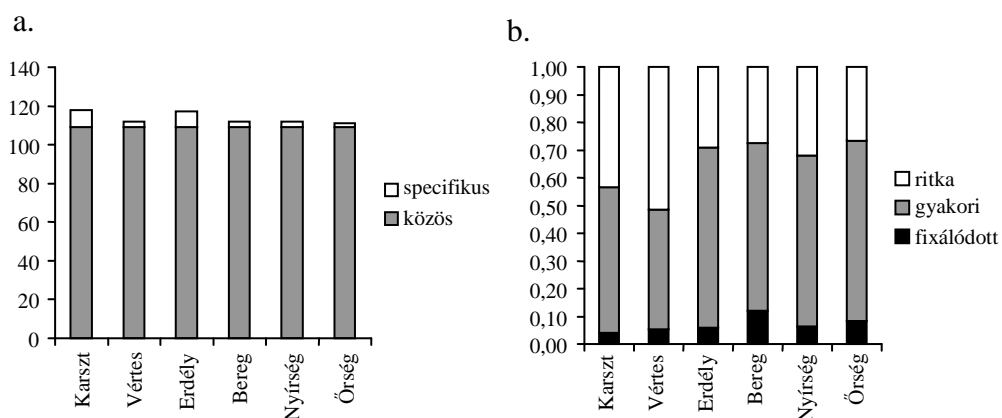
Az egyes földrajzi régiók allélkészletének feltérképezése érdekében régióként külön-külön is megállapítottam az összállélszámot, valamint a speciális és a közös allélok arányát. Összehasonlítottam továbbá a különböző gyakorisággal előforduló allélok megoszlását a régiók összevont populációiban.

	N	n_A	H	P	F_{IS}
Nyírség	97,8	4,933	0,239	1,00	0,313
Bereg	92,8	5,200	0,231	0,87	0,313
Karszt	58,9	4,800	0,249	0,93	0,197
Erdély	27,0	4,400	0,247	0,93	0,260
Őrség	110,9	5,533	0,238	0,93	0,241
Vértes	51,7	4,733	0,221	0,73	0,334

6. táblázat: Az enzimpolimorfizmus paraméterei a hat földrajzi régió összevont „populációjában”. **N:** lokuszonkénti átlagos mintaszám; **n_A:** lokuszonkénti átlagos allélszám; **H:** átlagos heterozigóta gyakoriság; **P:** polimorf lokuszok aránya; **F_{IS}:** a mintákon belüli varianciát jellemző index.

Bár a vizsgált populációk száma régióként különbözött, az összállélszám csak kis mértékben változott az összehasonlításban (19b. ábra). A régiók allélkészlete a karszti (2 populáció) és az erdélyi régióban (2 populáció) kissé magasabb míg, a többi régióban (pl. Bereg: 4, vagy Őrség: 3 populáció) pedig alacsonyabb volt (19a. ábra). Az összállélszámbeli különbséget a speciális allélok kismértékű regionális eltérése okozza.

Eltérést mutatott viszont a vizsgált régiókban a különböző gyakoriságú allélok megoszlása (19b. ábra). A ritka allélok aránya a Vértes valamint az Aggteleki-karszt területéről származó minták esetében volt a legmagasabb (51% és 44%). Ugyanakkor ez a hányad a többi régióban csak kb. 30% volt. Ebből adódóan a fent említett két régióban a gyakori allélok alacsonyabb százalékos arányt képviseltek a többihez képest, kb. 40-50%-os gyakorisággal jelentek meg. A fixálódott allélok megoszlása 4 és 12% között változott, legalacsonyabb a karszti (4%), legmagasabb pedig a beregi régióban (12%) volt (19b. ábra).



19. ábra: A *M. athalia* genetikai variabilitása régiós lebontásban.

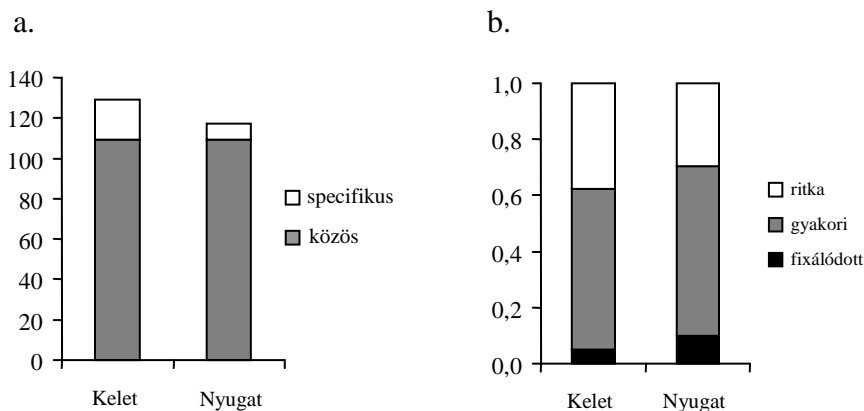
a.: Az allélok száma. **Specifikus:** speciális allélok száma az adott régióban; **közös:** minden régióban megjelent közös allélok száma.

b.: A különböző gyakoriságú allélok megoszlása. **Ritka:** $p < 0,05$; **gyakori:** $0,05 < p < 1$; **fixálódott:** $p = 1$.

Az analízisek utolsó lépésében, a korábbi eredmények fényében kíváncsi voltam, hogy vajon van-e különbség a Kárpát-medence keleti és nyugati területeinek genetikai variabilitásában. Ebben az összehasonlításban a populációkat a keleti-, illetve nyugati Kárpát-medencei elhelyezkedésüknek megfelelően vontam össze.

A két terület leginkább az allélgazdagságában különbözött egymástól. A keleti terület lokuszonkénti átlagos allélszáma (5. táblázat: *M. ath. K*), valamint a teljes allélkészlete (20a. ábra) egyaránt magasabb volt, mint a nyugati területé. Különösen szembeötlő volt a specifikus allélok viszonylag nagy száma a keleti régiókban. Ugyanakkor a keleti területeken a mintaszám is magasabb volt, mint a nyugatiban (5. táblázat: *M. ath. K* kontra *M. ath. NY*).

A különböző gyakoriságú allélok megoszlását összehasonlítva a két csoport között megállapítottam, hogy a keleti területek magasabb szintű variabilitást mutattak, mint a nyugatiak (20. ábra). Egyrészt a ritka allélok nagyobb (38%), másrészt a fixálódott allélok jelentősen alacsonyabb arányban (5%) jelentek meg ezen a földrajzi területen.



20. ábra: A *M. athalia* keleti-, és nyugati Kárpát-medencei területeinek genetikai variabilitása.

a.: Az allélok száma. **Specifikus:** speciális allélok száma az adott földrajzi terület (keleti-, ill. nyugati Kárpát medence) esetében; **közös:** mind a két területen megjelent, közös allélok száma.

b.: A különböző gyakoriságú allélok megoszlása a két földrajzi területen (keleti,- ill. nyugati Kárpát-medence). **Ritka:** $p < 0,05$; **gyakori:** $0,05 < p < 1$; **fixálódott:** $p = 1$.

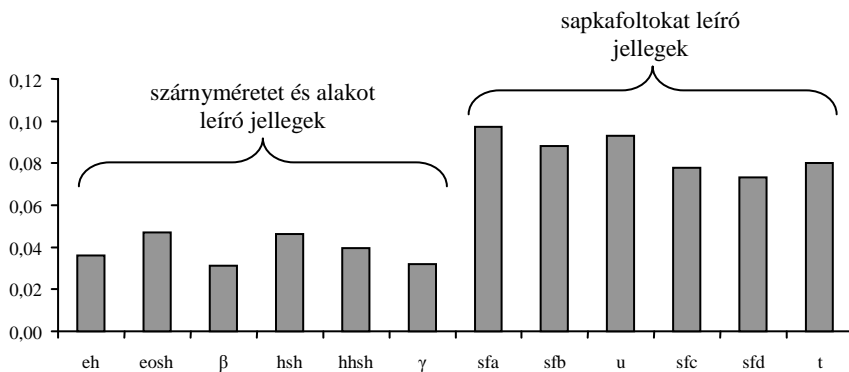
6.2.3. A *M. athalia* fenotípusos variabilitása

A *M. athalia* populációk fenotípusos varianciáját két morfológiai jellegcsoporton vizsgáltam: a szárnyak és az ivarszerv jellegeit elemeztem. Mindkét jellegcsoport esetében az egyes jellegekre számított Levene-féle változókkal jellemeztem a fenotípusos varianciát, amely a populációkra vonatkoztatott jellegátlagok és az egyedeken mért értékek különbségének az abszolút értéke. Ezeket az értékeket a jellegátlagok százalékában is kifejeztem, így össze tudtam hasonlítani a különböző jellegek változatosságát.

A vizsgálat további céljai: (i) a két fenológiai típus varianciájának összehasonlítása, (ii) a különböző földrajzi régiók varianciájának elemzése, továbbá (iii) a keleti-, és nyugati Kárpát-medence populációinak összevetése voltak.

6.2.3.1. A szárny jellegeinek variabilitása

A Levene-féle változókat kétféle módon használtam fel a szárnyon mért jellegek fenotípusos varianciájának jellemzésére. Első lépésben a különböző jellegek variabilitását hasonlítottam össze, amelyhez Levene-féle változóknak a jellegátlagok százalékában kifejezett értékeit használtam fel. Az eredményeket elemezve megállapítottam, hogy a szárny különböző jellegei nem egyformán variábilisak a *M. athalia* populációkban (21. ábra). A méreteket és szögeket leíró jellegek esetében a Levene-féle változók százalékos értékei kisebbek voltak, mint a sapkafoltok jellegeinél. Ez arra utal, hogy az egyedek között relatíve kisebb különbségek figyelhetők meg a szárny méreteiben és alakjában, mint annak mintázatában (21. ábra).



21. ábra: A szárnyjellegek változatosságának összehasonlítása a jellegátlagok százalékában kifejezett Levene-változók segítségével.

A fenotípusos variancia elemzésének második lépésében magukat a Levene-féle változókat hasonlítottam össze a *M. athalia* populációk különböző csoportjai között. A hierarchikus ANOVA során a populációkat földrajzi régiókba csoportosítottam, majd a régiókat a két fenológiai típusba soroltam, illetve a Kárpát-medence nyugati, vagy keleti területéhez rendeltem.

Első lépésben a földrajzi régiók fenotípusos varianciáját hasonlítottam össze. Az eredmények azt mutatták, hogy a régiók fenotípusos variabilitásában nagymértékű a heterogenitás. A Levene-féle változók közötti különbségek a hátsó szárny hátsó szegély hossza (hhsh: $F_{1, 4} = 6,670$; $P < 0,001$) valamint a sapkafolt egyik jellege (sfc: $F_{1, 4} = 2,724$; $P = 0,029$) esetében adódott statisztikailag szignifikánsnak (7. táblázat).

Szárnyjellegek	$F_{1, 4}$	P
eh	0,760	0,552
eosh	0,770	0,545
β	1,599	0,175
hsh	0,531	0,712
hhsh	6,670	<0,001
γ	0,461	0,765
sfa	0,381	0,822
sfb	0,459	0,766
u	1,305	0,268
sfc	2,724	0,029
sfd	2,089	0,082
t	1,723	0,145

7. táblázat: A szárnyjellegek Levene-féle változóira elvégzett hierarchikus ANOVA eredményei: a földrajzi régiók variabilitásában mutatkozó különbségek. $F_{1, 4}$: a régiók szintjére kapott F érték; P: a fenotípusos variancia egyenlőségének valószínűsége a földrajzi régiók között. Vastag betűtípussal jelöltem azokat a jellegeket, amelyeknél szignifikáns eltérés volt kimutatható.

Az utóbbi jelleg (sfc) tekintetében a Vértes és az Erdély régió populációi alacsonyabb variabilitásúnak adódtak a többi régió populációihoz képest. A hátsó szárny hátsó szegély hossza (hhsh) azonban a karszti régió populációiban igen magas szintű variabilitást tükrözött a többihez viszonyítva (15. függelék).

Szárnyjellegek	$F_{1,4}$	P
eh	1,594	0,208
eosh	0,669	0,414
β	0,164	0,686
hsh	0,034	0,854
hhsh	16,799	<0,001
γ	0,934	0,335
sfa	1,698	0,194
sfb	0,769	0,381
u	0,497	0,482
sfc	0,607	0,437
sfd	1,492	0,223
t	0,389	0,533

8. táblázat: A szárnyjellegek Levene-féle változóira elvégzett hierarchikus ANOVA eredményei a hierarchia legfelső szintjén (1): a *M. athalia* két fenológiai típusának variabilitásában mutatkozó különbségek. $F_{1,4}$: a hierarchia legfelső szintjére kapott F érték; P: a fenotípusos variancia egyenlőségének valószínűsége a két fenológiai típus között. Vastag betűtípussal jelöltem azokat a jellegeket, amelyeknél szignifikáns eltérés volt kimutatható.

A továbbiakban a hierarchia legfelső szintjét elemeztem, vagyis a két fenológiai típus populációinak varianciáját hasonlítottam össze. Szignifikáns eltérést tapasztaltam a hátsó szárny hátsó szegély hosszát (hhsh: $F_{1,4}=16,799$; $P<0,001$) tekintve (8. táblázat). Ezen jelleg vonatkozásában az egy generációs fenológiai típus populációi variábilisabbnak mutatkoztak, mint a két generációsoké (14. függelék). Bár a többi jelleg esetében nem mutatkozott szignifikáns eltérés a két fenológiai típus között a Levene-féle változóknak, két további méretet meghatározó jelleg (eosh és hsh) variábilisabbnak mutatkozott az egy generációs alakban (14. függelék). Úgy tűnik tehát, hogy

a két fenológiai típus variabilitásának a különbsége elsősorban a szárnyméretet leíró jellegekben jelentkezett.

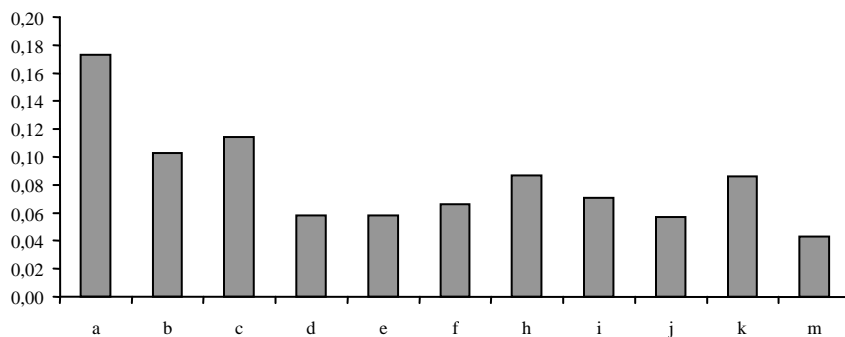
A korábbi vizsgálatok tükrében arra is kíváncsi voltam, hogy van-e különbség a *M. athalia* keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencei populációinak fenotípusos variabilitásában. Az analízis eredményei arra világítottak rá, hogy csupán egy jellegben ($t: F_{1, 4}=4,992; P=0,026$) van szignifikáns különbség a szárnyjellegek varianciájában a két Kárpát-medencei terület között (9. táblázat).

Szárnyjellegek	$F_{1, 4}$	P
eh	0,002	0,967
eosh	0,059	0,809
β	0,070	0,791
hsh	0,038	0,846
hhsh	3,293	0,071
γ	0,017	0,896
sfa	1,729	0,189
sfb	1,719	0,191
u	3,263	0,072
sfc	1,609	0,206
sfd	0,642	0,424
<i>t</i>	4,992	0,026

9. táblázat: A szárnyjellegek Levene-féle változóira elvégzett hierarchikus ANOVA eredményei a hierarchia legfelső szintjén (2): a *M. athalia* keleti-, és nyugati Kárpát-medencei populációinak variabilitásában mutatkozó különbségek. $F_{1, 4}$: a hierarchia legfelső szintjére kapott F érték; **P**: a fenotípusos variancia egyenlőségének valószínűsége a Kárpát-medence két területe között. Vastag betűtípussal jelöltem azokat a jelleget, amelyeknél szignifikáns eltérés volt kimutatható.

A szárny alakját meghatározó szögek kivételével ugyanakkor minden mért jelleg esetében bizonyos mértékű egyirányba mutató különbség volt megfigyelhető a két Kárpát-medencei terület Levene-féle értékei között: a keleti populációk átlaga kicsit nagyobb, míg a nyugatiaké kicsit kisebb volt (16. függelék). A keleti populációk tehát kis mértékben variábilisabbnak tűntek, mint a nyugatiak. Ez a különbség azonban csak a fent említett jelleg (*t*) esetében mutatkozott szignifikánsnak.

6.2.3.2. A hímivarszerv jellegeinek variabilitása



22. ábra: A hímivarszerven mért jellegek változatossága a jellegátlagok százalékában kifejezett Levene-változók segítségével.

A szárnyjellegekhez hasonlóan, a Levene-féle változók elemzése két lépésben zajlott a hímivarszerv jellegeinek esetében is. Első lépésben a Levene-változók átlagát a jellegátlagok százalékában fejeztem ki, így lehetővé vált a különböző jellegek variabilitásának az összehasonlítása. A legtöbb jelleg magasabb szintű variabilitással volt jellemezhető, mint a szárny méreteit leíró jellegek, sőt, a saccus (a) és az uncus (b, c) jellegei relatíve variábilisabbnak tűntek, mint a szárny sapkafoltjának jellegei (22. ábra).

A második lépésben – a szárnyjellegekhez hasonlóan – a genitália jellegeinek elemzése során is magukat a Levene-féle változókat hasonlítottam össze a különböző populációcsoportok között. Ebben az analízis sorozatban is a populációk jelentették a hierarchia alsó szintjét, majd a régiók és végül a fenológiai típusok, illetve a Kárpát-medence nyugati, vagy keleti területei jelentek meg a hierarchia legfelső szintjén.

A különböző földrajzi régiók fenológiai típus szerinti csoportosítása során a régiók között az ivarszervek jellegei közül két esetben (a processus posterior belső oldalának hossza az alaptól számítva és a harpe külső ívének

hossza) tapasztaltam szignifikáns különbséget a variabilitásában (i: $F_{1,4}=2,987$; $P=0,019$, e: $F_{1,4}=3,751$; $P=0,005$) (10. táblázat). A Levene-változó értékeit megvizsgálva mind a két jelleg esetében a Bereg régió populációiban mutatkozott szignifikánsan alacsonyabb variabilitás a többi régió populációihoz képest. Az ivarszerven mért többi jelleg tekintetében nem volt kimutatható különbség a földrajzi régiók fenotípusos variabilitásában (18. függelék).

ivarszervjellegek	$F_{1,4}$	P
a	1,344	0,254
b	1,359	0,248
c	0,637	0,636
d	1,090	0,362
e	2,987	0,019
f	1,632	0,166
h	0,883	0,475
i	3,751	0,005
j	0,781	0,538
k	2,226	0,066
m	0,768	0,547

10. táblázat: Az ivarszervjellegek Levene-féle változóira elvégzett hierarchikus ANOVA eredményei: a földrajzi régiók variabilitásában mutatkozó különbségek. $F_{1,4}$: a régiók szintjére kapott F érték; **P**: a fenotípusos variancia egyenlőségének valószínűsége a földrajzi régiók között. Vastag betűtípussal jelöltem azokat a jellegeket, amelyeknél szignifikáns eltérés volt kimutatható.

Az ivarszerven mért jellegek Levene-féle változói mindössze egy jelleg esetében különböztek szignifikánsan a fenológiai típusok között, ez pedig a harpe magassága volt (f: $F_{1,4}=5,545$; $P=0,019$) (11. táblázat; 17. függelék). A két generációs fenológiai típus ezen jelleg vonatkozásában szignifikánsan alacsonyabb variabilitásúnak mutatkozott az egy generációs típusnál. A többi jelleg esetében azonban nem tapasztaltam szisztematikus különbséget a két fenológiai alak variabilitásában.

ivarszervjellegek	F_{1,4}	P
a	1,109	0,293
b	0,001	0,971
c	0,043	0,836
d	0,280	0,597
e	1,830	0,177
f	5,545	0,019
h	2,392	0,123
i	1,482	0,224
j	0,745	0,389
k	3,019	0,083
m	0,044	0,833

11. táblázat: Az ivarszervjellegek Levene-féle változóira elvégzett hierarchikus ANOVA eredményei a hierarchia legfelső szintjén (1): a *M. athalia* két fenológiai típusának variabilitásában mutatkozó különbségek. **F_{1,4}**: a hierarchia legfelső szintjére kapott F érték; **P**: a fenotípusos variancia egyenlőségének valószínűsége a két fenológiai típus között. Vastag betűtípussal jelöltem azokat a jellegeket, amelyeknél szignifikáns eltérés volt kimutatható.

A korábbi vizsgálatok fényében, a hímivarszerv jellegeinek kapcsán is kíváncsi voltam arra, hogy van-e különbség a *M. athalia* keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencei populációinak fenotípusos variabilitásában. Az analízis eredményei azt mutatták, hogy ugyanazon két jelleg (a processus posterior belső oldalának alaptól számított hossza és a harpe külső ívének hossza) esetében van szignifikáns eltérés (i: $F_{1,4}=9,193$; $P=0,003$, e: $F_{1,4}=4,614$; $P=0,033$) a két terület között, ahogy azt a régiók között is tapasztaltam (12. táblázat). A Levene-változók értékei alapján a keleti populációkban mindkét jellegnek alacsonyabb volt a variabilitása, mint a nyugatiakban (19. függelék). A két szignifikánsan különböző jellegen felül, még a harpe három további jellemzője (d, f és m), valamint a processus posterior egy jellege (k) mutatkozott variábilisabbnak a Kárpát-medence nyugati területének populációiban, mint a keletiekben (19. függelék).

ivarszervjellegek	F_{1,4}	P
a	1,262	0,262
b	0,223	0,637
c	0,769	0,381
d	0,745	0,389
e	4,614	0,033
f	3,197	0,075
h	2,332	0,128
i	9,193	0,003
j	0,015	0,904
k	2,232	0,140
m	2,170	0,142

12. táblázat: Az ivarszervjellegek Levene-féle változóira elvégzett hierarchikus ANOVA eredményei a hierarchia legfelső szintjén (2): a *M. athalia* keleti-, és nyugati Kárpát-medencei populációinak variabilitásában mutatkozó különbségek. **F_{1,4}**: a hierarchia legfelső szintjére kapott F érték; **P**: a fenotípusos variancia egyenlőségének valószínűsége a Kárpát-medence két területe között. Vastag betűtípussal jelöltem azokat a jellegeket, amelyeknél szignifikáns eltérés volt kimutatható.

6.3. Eredmények megvitatása

A megvizsgált három *Melitaea*-faj a várakozásokkal ellentétben igen magas szintű genetikai variabilitást mutatott. Ez különösen a *M. athalia* egy generációs fenológiai típusánál volt kifejezett, ugyanis az enzimpolimorfizmus ennél a fenológiai alaknál mutatkozott a legmagasabbnak. A Melitaeini tribusz más fajainak korábbi vizsgálataiban, a feltevésnek megfelelően, Pecsénye és mtsai. (2006, 2007 c) alacsony mértékű enzimpolimorfizmust tapasztaltak az *Euphydryas maturna*, *E. aurinia*, valamint a *Melitaea ornata* populációkban. Az átlagos allélszám például az *E. maturna* populációkban 1,8, az *E. aurinia* esetében 2,1, míg a *M. ornata* esetében 1,8 volt. Ugyanakkor a *Melitaea phoebe* populációk meglehetősen variábilisnak mutatkoztak az allélszám vonatkozásában, ugyanis

lokuszonként átlagosan 3,0 allélt tartalmaztak. Az allélszámoknak megfelelően alakultak a polimorfizmus többi mutatói is: az *Euphydryas* fajok és a *M. ornata* populációiban mind a polimorf lokuszok aránya, mind pedig az átlagos heterozigótaság meglehetősen alacsony szintű volt. Ezzel szemben a *M. phoebe* populációk a többi paraméter tekintetében is jelentősen varábilisabbnak mutatkoztak, mint a másik három faj.

Bár a Melitaeini tribusz fajainak reprodukzív stratégiája alapvetően hasonló, a fent említett fajok között különbségek vannak a petecsomók számában és méretében, valamint a lárvák közös táplálkozási idejének a hosszában (Warren 1987; Weidemann 1988; Tolman és Lewington 1998; Wahlberg 2000). A skála egyik végén az *E. aurinia* áll, amelynek nőstényei 1-2 nagy csomóba (150-200 pete) rakják petéiket, hernyói pedig még a téli diapauza után is közösen táplálkoznak és csak késő tavasszal, az utolsó stádiumban szélednek szét a fészekből (Wahlberg 2000). A szaporodási stratégia másik szélső értéke a *M. athalia* esetében figyelhető meg, melynek nősténye több, viszonylag kisebb (50-100 pete) csomóba rakja petéit és hernyói még a diapauza előtt szétszélednek a fészekből, így már viszonylag korai lárvastádiumban egyedül táplálkoznak és hibernálnak (Wahlberg 2000). A többi Melitaeini faj esetében a petecsomók mérete közepes, továbbá a hernyók szétszéledésének tekintetében is átmenetet mutatnak az *E. aurinia* és a *M. athalia* között, ugyanis a hernyók diapauzája még közösen a fészekben történik, de kora tavasszal már önállóan táplálkoznak (Urbahn 1952; Weidemann 1988; Ebert és Rennwald 1991; Tolman és Lewington 1998; Wahlberg 2000). Ha tehát a petecsomók mérete és a hernyók közös táplálkozásának a hossza befolyásolja a sztochasztikus hatások intenzitását, akkor ezek a szaporodási jellemzők áttételesen érintik a variabilitás mértékét is. Ebben az esetben az enzimpolimorfizmus szintjében is tükröződnie kell egy hasonló irányú skálának; vagyis a *M. aurinia* populációknak kell a

legkevésbé, míg a *M. athalia* populációknak a leginkább változatosnak lennie, a többi faj variabilitása pedig a kettő közötti átmeneti szinten várható. Az eredmények azonban csak részben támasztották alá ezt a várakozást. A vizsgált fajokat lényegében két csoportba lehet sorolni: alacsony (*M. ornata*, *E. aurinia* és *E. maturna*) és magas (*M. phoebe* és mind a három *Melitaea* (*Mellicta*)-faj) variabilitású fajok. A két csoport elkülönülését főkomponens analízissel is alátámasztottam, amely több variabilitást jellemző paraméter tekintetében is elkülönülést mutatott. Az első tengely a teljes variancia 79%-át magyarázta, melyet 3 mutató határoz meg (a fixálódott allélok aránya, a variabilis allélok mennyisége, valamint a fixálódott allélok lokuszokra vonatkoztatott mennyisége). A két csoport közötti különbséget méginkább alátámasztotta az első tengelyre végzett MANOVA, ahol a két csoport között erősen szignifikáns különbség mutatkozott ($F_{8, 50}=40,72$; $P<0,001$). Pecsénye és mtsai. (2006, 2007) valamint a jelen munka eredményei tehát egyaránt azt tükrözik, hogy csupán a reprodukív stratégia hasonlósága nem eredményezett következetesen alacsony szintű genetikai variabilitást a Melitaeini tribusz fajaiban. Sőt, a három *Melitaea* (*Mellicta*)-faj esetében egyáltalán nem tükröződik a speciális reprodukív stratégia várható következménye a genetikai variabilitás szintjében. Még a szaporodási jellemzőkben meglévő különbségek is csak részben magyarázzák a variabilitás szintjében tapasztalt eltéréseket a Melitaeini tribusz eddig vizsgált fajaiban. Ugyanis a vizsgált fajok közül a *Mellicta* subgenusba tartozók genetikai variabilitása igen magasnak mutatkozott a többi fajhoz képest.

A variabilitás szintjét befolyásoló tényezők közé tartozik az adott faj generalista, vagy specialista jellege is (Habel és mtsai. 2009; Habel és Schmitt 2012). Korábbi vizsgálatok már foglalkoztak a generalizmus valamint a tápnövény specializáció genetikai következményeivel (Via 1999; Kelley és mtsai. 2000, Berlocher és Feder 2002; Packer és mtsai. 2005;

Stireman és mtsai. 2005). Egyes esetekben a szélesebb táplálékspektrumot hasznosító fajok genetikai variabilitása magasabbnak mutatkozott, mint azoké, amelyek csak egy, vagy néhány növényt fogyasztanak. Tágabb értelemben a generalista-specialista megközelítés kiterjedhet az adott faj diszperziós képességére, élőhelyének nagyságára és annak heterogenitására (Keyghobadi és mtsai. 1999; Manel és mtsai. 2003; Neville és mtsai. 2006). Habel és Schmitt (2009) például 34 lepkefaj adatait elemezve alátámasztotta, hogy a tágabb értelemben vett generalista/specialista életmód hatással van a fajok variabilitásának a szintjére. A fent említett Melitaeini fajok közül a *M. athalia* meglehetősen széles tápnövénytáplálékspektrummal rendelkezik, tehát a jelen összehasonlításban generalistának tekinthető (Weidemann 1988; Tolman 1997; Wahlberg 1998). A skála másik végén a *M. ornata* áll, amely bár laboratóriumi körülmények között több tápnövényen is jól nevelhető (Tóth és mtsai. kézirat), lárvái a hazai populációkban eddig még csak *Cirsium pannonicum*-on voltak megfigyelhetők (Varga 1967). Természetes körülmények között tehát a *M. ornata* a specialisták közé sorolható. Az *E. matura* és az *E. aurinia* lárvái több tápnövényt is képesek fogyasztani, ráadásul az *E. matura* a korai lárvális stádiumokban (a hibernáció előtt) más tápnövényt hasznosít, mint a későiben (hibernáció után) (Weidemann 1988; Tolman 1997; Wahlberg 1998). Habel és Schmitt (2012) más ökológiai faktorok alapján is a közepesen specialista fajok közé sorolta őket. Jóllehet a dolgozatban szereplő másik két *Melitaea* (*Mellicta*)-faj, a *M. aurelia* és a *M. britomartis* viszonylag szűk tápnövénytáplálékspektrummal rendelkezik (Weidemann 1988; Tolman 1997; Wahlberg 1998), a *M. aurelia*-t Habel és Schmitt (2012) a generalista fajok közé sorolta. A fent említett irodalmi adatokat összesítve tehát, ismét három kategóriába sorolhatjuk a jelenleg és a korábban vizsgált Melitaeini fajokat a specialista-generalista életmód alapján: széles táplálékspektrumot hasznosító ('generalista') (*M. athalia*), közepes táplálékspektrumot hasznosító (közepesen 'generalista'/'specialista') (a két

Euphydryas faj, a *M. aurelia*, *M. britomartis* és a *M. phoebe*), valamint a szűk táplálékspektrumot hasznosító ('specialista') (*M. ornata*). Az életmód és a variabilitás szintje közötti korreláció alapján a szélesebb tápnövényt spektrumot hasznosító fajokat várjuk a legpolimorfabbnak, míg a szűkebbet hasznosítókat a legkevésbé változatosnak. A jelen dolgozatnak, valamint a korábbi munkáknak (Pecsénye mtsai. 2006, 2007 c) az eredményei azonban részben ellentmondanak ennek a feltételezésnek: A *M. athalia* populációk valóban jelentős szintű polimorfizmussal jellemezhetők, míg a *M. ornata* populációk a legkevésbé variábilisnak bizonyultak. A két *Euphydryas* faj variabilitásának a szintje viszont inkább alacsony/közepes volt (Pecsénye mtsai. 2006, 2007 c), ugyanakkor a *M. aurelia*, *M. britomartis* illetve *M. phoebe* esetében kifejezetten magas szintű polimorfizmust tapasztaltam. Mindezek alapján megállapítottam, hogy a Melitaeini fajok genetikai variabilitásának a mértékét nem lehet kizárólagosan a fajok tápnövényt spektrum hasznosításával (specialista-generalista besorolásával) sem megmagyarázni.

A genetikai variabilitás szintjének és szerkezetének a meghatározásában egy további tényező lehet a vizsgált populációk helyzete a faj areáján belül. A centrális és a marginális helyzetű populációk esetében ugyanis más a populációk toleranciája az egyes ökológiai tényezőkre nézve, ami eltérő szelekciós hatásokhoz vezethet (Kirkpatrick és Barton 1997; Lenormand 2002). Ráadásul az area központjában és peremén elhelyezkedő populációk között különböző a génáramlás intenzitása is. Mindemellett a peremhelyzetű populációk esetében számolni kell a kis populációkat érintő sztochasztikus hatásokkal, amik a genetikai sodródás fokozódásához vezetnek. Mindezek a folyamatok azt eredményezik, hogy a faj areájának peremén található populációkban alacsonyabb szintű variabilitást várunk, mint a centrálisakban (Bridle és Vines 2006; Eckert mtsai. 2008). A különböző növény és

állatfajokon végzett vizsgálatok a legtöbb esetben alátámasztották ezt a hipotézist: például a *Lychnis viscaria* finn (Siikamaki és Lammi 1998), a *Coenonympha hero* észak-európai (Cassel és Tammaru 2003), és a *Lacerta viridis viridis* német (Bohme és mtsai. 2007) populációiban a várakozásoknak megfelelő eredményeket kaptak. Eckert és mtsai. (2008) 135 faj genetikai variabilitásának adatait elemezték és összehasonlították a centrális és perempopulációkat ebből a szempontból. A fajok 64%-ban találtak összefüggést a populációk centrális/marginális helyzete és genetikai varianciája között. Megvizsgáltam tehát a jelen dolgozatban, valamint a Pecsénye és mtsai. (2006, 2007 c) tanulmányában szereplő Melitaeini fajok Kárpát-medencei populációinak helyzetét a faj areájában. A két *Euphydryas*-faj esetében az IUCN Red List (IUCN 2012) adatait, míg a *Melitaea*-fajok esetében az európai lepkék elterjedésének atlaszát (Kudrna és mtsai. 2011) használtam a vizsgált populációk centrális/marginális helyzetének megítéléséhez. A *M. ornata* taxonómiai helyzetét és elterjedésének határait csak az utóbbi időben sikerült tisztázni (Tóth és mtsai. 2012). Ennek megfelelően a fajra vonatkozó információk forrásaként ezt a legújabb cikket használtam. A fent említett irodalmak alapján a fajokat két csoportra tudtam osztani. A dolgozatban szereplő három *Melitaea (Mellicta)*-faj, valamint a *M. phoebe* széles körben elterjedt Európában, bár ez utóbbi Észak-Európában nem fordul elő. Ennek a három fajnak tehát a Kárpát-medencei populációi centrális helyzetűnek tekinthetők. A másik csoportba a *M. ornata*, és a két *Euphydryas* faj tartozik. Az előbbi faj elterjedésének hazánk az északi határa, míg az *E. maturna* alapvetően kelet-európai faj, melynek nagy, összefüggő areája erősen feldarabolódik a Kárpát-medencében és különösen attól nyugatra. Az *E. aurinia* elterjedése diszjunkt, amennyiben Közép-Európában egy ÉNY–DK irányú törés osztja fel areáját egy viszonylag folytonos keleti, illetve nyugati elterjedési területre. Ezek alapján mindhárom faj esetében elmondható, hogy a Kárpát-medencei populációk peremhelyzetűnek

tekinthetők elterjedési területükön. Ha tehát a vizsgált populációk centrális/marginális helyzete befolyásolja genetikai variabilitásuk szintjét, akkor a hat Melitaeini faj esetében is két csoportot kell találni enzimpolimorfizmusuk mértéke alapján: alacsony variabilitású és magas szintű polimorfizmussal rendelkező fajokat. A jelen dolgozat, valamint Pecsénye és mtsai. (2006, 2007 c) eredményei szintén ezt mutatták. A *M. ornata*, és a két *Euphydryas* faj, melyeknek hazai populációi marginálisak, alacsony szintű variabilitással jellemezhetők. Ugyanakkor a *Melitaea* (*Mellicta*)-fajok, valamint a *M. phoebe* populációi, melyek centrálisnak tekinthetők, kifejezetten magas szintű polimorfizmussal rendelkeznek.

Összefoglalva, a hat megvizsgált Melitaeini faj genetikai variabilitásában mutatkozó különbségek értelmezésére három lehetséges tényező hatását elemeztem: (i) a szaporodásbiológiai különbségeket; (ii) az általános ökológiai jellemzők eltéréseit (különös tekintettel a tápnövény hasznosítás spektrumának nagyságára); (iii) a vizsgált populációk helyzetének a faj areájához viszonyított különbségeit (centrális/marginális). Mindent összevetve úgy tűnik, hogy a hat Melitaeini faj variabilitásának mintázatát ez utóbbi, a centrális-marginális hipotézis magyarázza meg a legteljesebben. Ez a hipotézis azonban nem minden relációban az egyetlen lehetséges magyarázat a fajok variabilitásának értelmezésében. Az eredményeim alapján ugyanis nehéz megmondani, hogy ha több Melitaeini fajra kiterjeszteném az elemzést, akkor szintén ezzel a hipotézissel lehetne-e megmagyarázni a genetikai variabilitás szintje közötti különbségeket. Ahhoz, hogy az igen fajgazdag Melitaeini tribuszra vonatkozóan megállapíthassuk, mi befolyásolja a fajaik genetikai variabilitásának szintjét, további fajok bevonására lenne szükség. Továbbá a centralitás és marginalitás meghatározása is nagyon fontos, ugyanis a teljes Palearktiszra nézve a Melitaeini tribusz fjai a Kárpát-medencét tekintve marginális

elhelyezkedésűek. Dolgozatomban a Kárpát-medencei minták vizsgálatából kapott eredményeket értékelem, és ezen a területen belül különítettem el centrális és marginális területeket. Tehát a centralitás és marginalitás rendelkezhet egyfajta hierarchiával. A hipotézis alátámasztására akkor lehetne korrekt magyarázatot adni, ha lehetőségem nyílna a vizsgálatot eurázsiai léptékben kiterjeszteni.

A morfológiai jellegek változatossága sok vizsgálatban tükrözte a genetikai variabilitás szintjét és szerkezetét (Berwaerts és mtsai. 1998; Garnier és mtsai. 2005; Fiorentino és mtsai. 2008; Francoy és mtsai. 2009; Suwanvijitr és mtsai. 2010; Dincă és mtsai. 2011; Hollós és mtsai. 2012). Ez érthető is, az élőlények génkészletének jelentős hányadát olyan gének alkotják, amelyek valamilyen fenotípusos jelleg kialakításában vesznek részt.

A *M. athalia* fenotípusos variabilitását vizsgálva megállapítható, hogy az egyes jellegek változatosságának a szintje jelentős különbségeket mutat. Meglepő módon a Levene-változók százalékos értékei azt sugallták, hogy az ivarszerveken mért jellegek variabilitása magasabb, mint a szárnyjellegeké. Ez az eredmény azért tűnik váratlannak, mert a szárnyak ki vannak téve a környezeti tényezők hatásainak (nagy a fenotípusos plaszticitásuk), míg az ivarszervek morfológiája feltehetően sokkal jobban behatárolt. A vizsgált szárnyjellegek két csoportra voltak elkülöníthetők: a szárnyak mintázatát leíró, relatíve változatos, valamint a szárny méretét és alakját jellemző viszonylag alacsony variabilitású jellegekre.

A szárnyjellegek variabilitását jellemző Levene-változók elemzése során kevés szignifikáns különbséget tapasztaltam a különböző populációcsoportok között. Tendenciáját tekintve azonban a Levene-változók átlaga (azaz a variabilitás mértéke) több jelleg esetében is nagyobbak mutatkozott a Kárpát-medence keleti területének populációiban, mint a nyugatiakban. Bár a jelenlegi adatok alapján még nehéz pontos magyarázatot adni erre a

jelenségre, az mindenesetre érdekes, hogy az enzimpolimorfizmus mértéke (specifikus allélok száma, fixálódott allélok aránya) is a Kárpát-medence keleti területének populációiban bizonyult magasabbnak a nyugatiakhoz képest. Eredményeim alapján úgy tűnik, hogy az enzimpolimorfizmus szintjével jellemzett genetikai variancia és a szárnyjellegek fenotípusos varianciája párhuzamos tendenciákat mutat.

Az ivarszerven mért jellegeket megvizsgálva szintén nem találtam egyérelmű különbségeket a variabilitás mértékében a hierarchia különböző szintjein, csupán bizonyos tendenciákat tapasztaltam. A szárnyjellegekkel ellentétben azonban, az ivarszerv jellegei a Kárpát-medence nyugati területének populációiban bizonyultak kis mértékben variábilisabbnak, mint a keletiekben. Az ivarszerv jellegeinek fenotípusos varianciája tehát nem mutat a genetikai variabilitással párhuzamos tendenciákat.

Összességében elmondható, hogy sem a szárny, sem pedig az ivarszerv jellegeit tekintve nem mutatkozott egyértelmű, szignifikáns különbség a fenotípusos variancia mértékében a hierarchia felső szintjén (egy-, illetve két generációs fenológiai típus; a Kárpát-medence keleti, illetve nyugati területének populációi). Ugyanakkor a két jellegcsoport esetében ellentétes tendenciát tapasztaltam a morfometriai variabilitás mértékében a Kárpát-medence keleti, illetve nyugati területének populációi között.

7. A GENETIKAI ÉS A FENOTÍPUSOS VARIABILITÁS SZINTJE ÉS STRUKTÚRÁJA KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ A *M. ATHALIA* POPULÁCIÓIBAN

7.1. Bevezetés

A genetikai és a fenotípusos variabilitás kapcsolata kardinális kérdés az evolúcióbiológusok számára, hiszen az adaptáció a fenotípus szintjén jelentkezik (Hartl és Clark 1989; Ridley 1996; Stearns és Hoekstra 2000), míg a molekuláris markerek révén a természetes populációk genetikai variabilitását tudjuk mérni (Frankham 1995; Hard 1995). A kvantitatív genetikusok egyszerű lineáris kapcsolatot tételtek fel a variancia ezen két szintje között, amennyiben a kérdéses kvantitatív jelleg varianciáját elsődlegesen additív genetikai tényezők határozzák meg (Falconer 1989). Ez a feltételezés azonban nem minden esetben teljesül, mert számos – különösen a fitnesszel szoros kapcsolatban álló – jelleg esetében számolhatunk a dominancia, vagy az episztázis jelenségével (Crnokrak és Rolf 1995). Ráadásul egy adott faj esetében eltérő hatások jelentkezhetnek a vizsgált fenotípusos jellegek és a marker-gének lokuszain. Míg a molekuláris markerekre elsősorban a drift és így a populációméret, a palacknyak események, valamint a génáramlás hat, addig a kvantitatív jellegek erőteljesen ki vannak téve a szelekció hatásának is. Az, hogy a fenotípusos és a genetikai variancia között milyen mértékű a korreláció, függ a szelekció típusától és intenzitásától (Reed és Frankham 2001). Ugyanakkor a molekuláris markerek közül az alloenzimek neutrális jellege a mai napig vitatott kérdés. Számos tanulmány eredménye támasztja alá azt a tényt, hogy az enzimpolimorfizmus fenntartásában szelekciós hatások, elsősorban az egyensúlyi szelekció játszik szerepet (a kérdés összefoglalását lásd Mitton 1997). Ugyanakkor a kvantitatív jellegek variabilitását is nagyrészt enyhe

stabilizáló szelekció tartja fenn. Tekintettel arra, hogy a variabilitás ezen két formája hasonló szelekciós hatásoknak van kitéve, feltételezhetjük közöttük a pozitív korelációt (Butlin és Tregenza 1998).

Mind a fenotípusos, mind pedig a genetikai variabilitást két aspektusból tanulmányozhatjuk: elemezhetjük a szintjüket, és vizsgálhatjuk a szerkezetüket. A variabilitás mértékének összehasonlítása során a genetikai variancia jellemzésére általában a heterozigóta gyakoriságot alkalmazták (pl. *Bicyclus anyana*: Saccheri és mtsai. 1996; *Thomomys bottae*: Soulé és Zegers 1996; *Pararge aegeria*: Berwaerts és mtsai. 1998). A morfológiai változatosságot azonban több paraméterrel is jellemezték: a variancia koefficienssel (pl. *Clupea harengus*: Ryman és mtsai. 1984, *Musca autumnalis*: Bryant 1984), illetve az additív genetikai varianciával (pl. *Drosophila melanogaster*: Briscoe és mtsai. 1992; *Bicyclus anyana*: Saccheri és mtsai. 1996). Ugyanakkor a genetikai és a fenotípusos variabilitás szerkezetének összehasonlítására a legtöbb analízisben a genetikai és a fenotípusos távolságmátrixok közötti korelációt vizsgálták (pl. *Chortippus parallelus*: Butlin és Tregenza 1998; *Carabus soleri*: Garnier és mtsai. 2005).

Munkámnak ebben a részében az volt a célom, hogy a korábbi eredményeket felhasználva összehasonlítsam a *M. athalia* populációkban tapasztalt morfológiai (szárny és ivarszerv jellegek) és genetikai (enzim polimorfizmus) variabilitást. Az analízisek során különböző jelleg/marker párokat alakítottam ki (enzim polimorfizmus és szárnyjellegek; enzim polimorfizmus és az ivarszerv jellegei; szárny és ivarszerv jellegek), melyeket párhuzamba állítottam egymással. A korábbi eredményekre tekintettel (6. fejezet) a szárnyjellegek esetén külön is megvizsgáltam a méretet és a mintázatot leíró jellegeket, valamint elemeztem variabilitásuk kapcsolatát a többi jelleggel.

Első lépésben a genetikai és a fenotípusos variabilitás szintje között kerestem az összefüggést. A legtöbb tanulmányban mind a genetikai, mind pedig a fenotípusos variabilitás mértékét egy-egy paraméterrel jellemezték (átlagos heterozigótaság, illetve a variancia koefficiens). Ennek megfelelően Pearson-féle korrelációs koefficienst állapítottak meg a két paraméter között (Reed és Frankham 2001). Vizsgálataim során azonban a genetikai és a morfometriai variabilitás szintjét egyaránt számos paraméter segítségével írtam le a *M. athalia* populációkban. Az enzimpolimorfizmus esetében a következő mérőszámokat alkalmaztam: lokuszonkénti átlagos allélszám (n_A), a heterozigóták átlagos gyakorisága (H), a polimorf lokuszok aránya (P%), a heterozigóta hiány mértéke (F_{IS}), valamint a fixálódott és a ritka allélok aránya. A szárny és az ivarszerv morfometria esetében pedig a vizsgált jellegekre számított Levene-féle változókkal jellemeztem a populációk fenotípusos variabilitását (szárny: 12 jelleg; ivarszerv: 11 jelleg). Mivel a célom az volt, hogy a korrelációs viszonyokat tárjam fel a 3 fenti jelleg/marker típus varianciájának a szintje között, ezért az egyes populációk variabilitását a paraméterek átlagával jellemeztem. A különböző paraméterek dimenziója azonban eltérő volt, ezért közvetlenül nem lehetett átlagolni őket. Így a variabilitás átlagos szintjét mindhárom jelleg/marker típus vonatkozásában rangok segítségével állapítottam meg. Az összes fent leírt paraméter esetében rangokat rendeltem a populációkhoz 1-től 13-ig a variabilitás növekedésének megfelelően (Précsényi 1995). Végül a populációk relatív variabilitását mind a három jelleg/marker vonatkozásában a rangok átlagával fejeztem ki. A különböző jelleg/marker párok közötti összefüggés vizsgálatára pedig Spearman-féle rangkorrelációt végeztem (Précsényi 1995). Ezzel az analízissel tulajdonképpen arra kerestem a választ, hogy két jelleg/marker variabilitása hasonló tendenciát mutat-e a vizsgált populációkban.

A második lépésben a genetikai és a morfológiai variabilitás szerkezetében kerestem a párhuzamot, azaz a populáció-párok közötti genetikai és morfometriai differenciálódás mértékét hasonlítottam össze. A genetikai differenciálódást az allélfrekvencia adatok alapján számolt Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolsággal jellemeztem (Cavalli-Sforza és Edwards 1967). A morfometriai differenciálódást pedig a kanonikus változók átlagai alapján számított euklideszi távolsággal fejeztem ki mind a szárny-, mind pedig az ivarszerv jellegeit tekintve. A különböző jelleg/marker párok közötti összefüggést Mantel teszt segítségével tanulmányoztam (Mantel 1967, Mantel és Valand 1970), amely vizsgálja a két távolságmátrix közötti korreláció mértékét. Az elemzésekhez felhasznált mintákat az egyedszámukkal valamint régiós besorolásukkal együtt a 9. függelék tartalmazza.

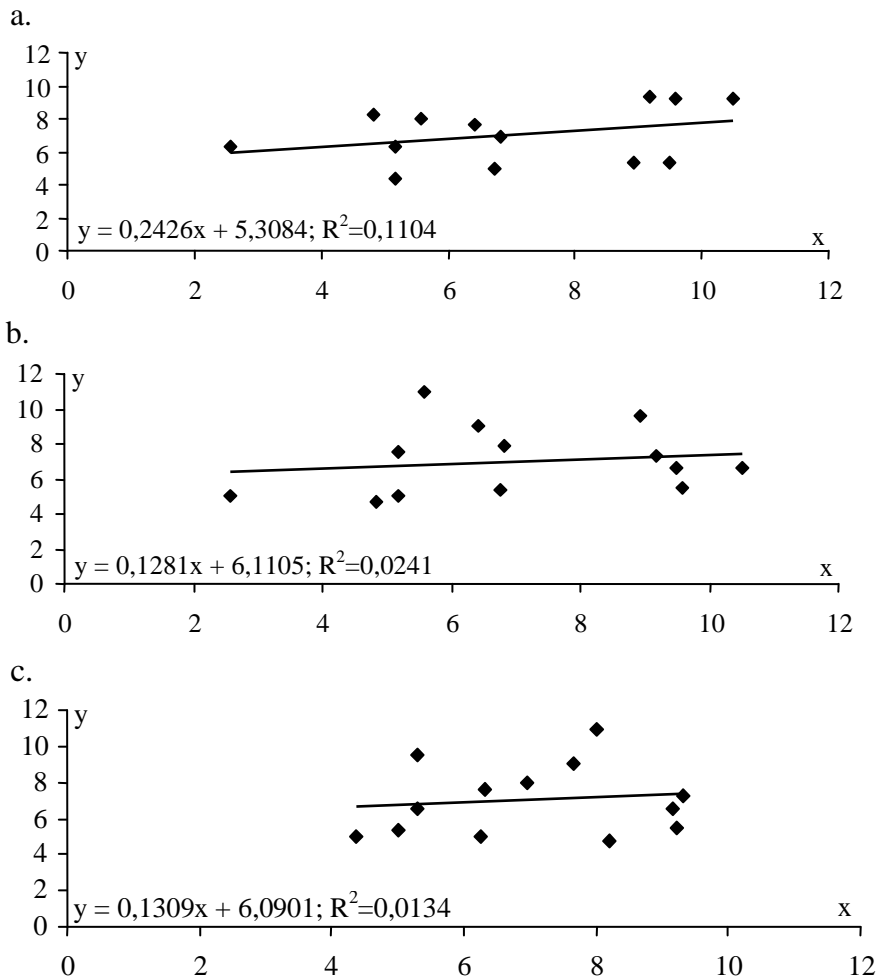
7.2. Eredmények

7.2.1. A genetikai és fenotípusos variabilitás szintjének kapcsolata

jelleg/marker párok	N	r	p
Gen+Szt	13	0,344	0,249
Gen+Iv	13	0,280	0,354
Szt+Iv	13	0,139	0,650
Szma+Sap	13	-0,039	0,901
Gen+Szma	13	0,652	0,016
Gen+Sap	13	-0,127	0,680
Szma+Iv	13	0,242	0,425
Sap+Iv	13	-0,138	0,653

13. táblázat: A Spearman-féle rangkorreláció eredményei a különböző jelleg/marker párok összehasonlítása során. **Gen:** a genetikai variabilitást jellemző rangok; **Szt:** a szárnyjellegek variabilitását jellemző rangok az összes jelleg vonatkozásában; **Iv:** az ivarszerv jellegek variabilitását jellemző rangok; **Szma:** a szárnyméret és alak jellegeinek variabilitását jellemző rangok; **Sap:** a sapkafolt jellegeinek variabilitását jellemző rangok. **N:** populációk száma; **r:** a rangok közötti korrelációs koefficiens; **p:** valószínűség. A szignifikáns korrelációt vastag betűpussal jelöltem.

A jelleg/marker párok közötti kapcsolatot megvizsgálva első megközelítésben azt tapasztaltam, hogy nincs párhuzam a genetikai variabilitás és a fenotípusos variabilitás szintje között. Ez a megállapítás igaz volt a szárny és az ivarszerv jellegek esetében is (13. táblázat: Gen+Szt; 23a. ábra; 13. táblázat: Gen+Iv, 23b. ábra). Mi több, a két morfológia jellegcsoport variabilitásának a szintje sem mutatott szignifikáns korrelációt egymással (13. táblázat: Szt+Iv, 23c. ábra).

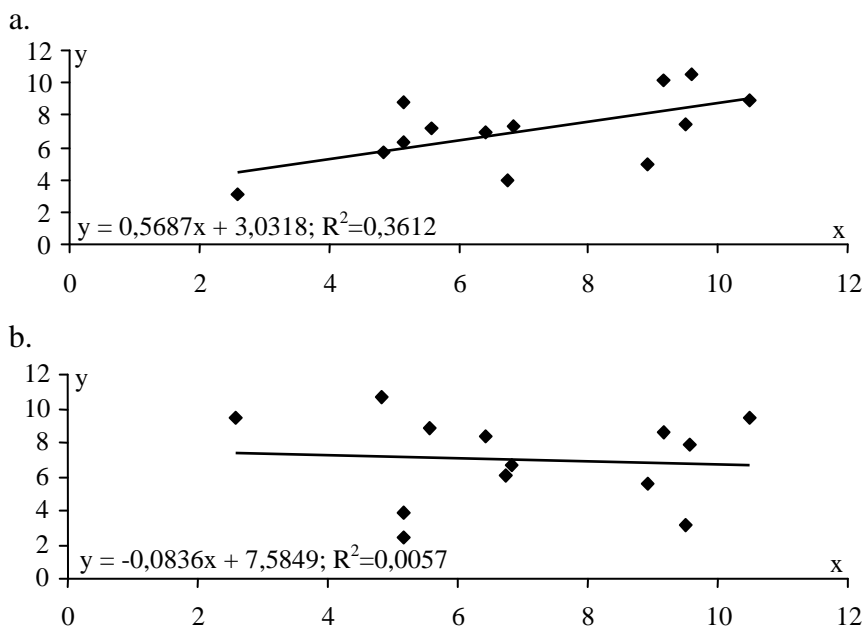


23. ábra: A különböző jelleg/marker párok variabilitásának szintje közötti kapcsolat az egyes populációk átlagos rangjai alapján.

a.: A genetikai variancia és szárnyjellegek variabilitása. x: genetikai variabilitás rangjai; y: a szárnyjellegek variabilitásának rangjai.

b.: A genetikai variancia és az ivarszerv jellegek variabilitása. x: genetikai variabilitás rangjai; y: az ivarszerv jellegek variabilitásának rangjai.

c.: A szárny és az ivarszerv jellegek variabilitása. x: a szárnyjellegek variabilitásának rangjai; y: az ivarszerv jellegek variabilitásának rangjai.



24. ábra: A genetikai variancia és a két szárnyjellegcsoport variabilitásának szintje közötti kapcsolat az egyes populációk átlagos rangjai alapján.

a.: A genetikai variancia és a szárnyméret illetve alak variabilitása. x: a genetikai variabilitás rangjai; y: a szárnyméret és alak variabilitásának rangjai.

b.: A genetikai variancia és a szárnymintázat variabilitása. x: a genetikai variabilitás rangjai; y: a szárnymintázat variabilitásának rangjai.

Figyelemre méltó azonban, hogy a genetikai variabilitás és a szárnyjellegek fenotípusos variabilitása között tapasztaltam a legmagasabb korrelációs koefficienst. Mivel a szárnyon kétféle, sok tekintetben eltérő jellegcsoportot mértem le (a szárnyméretet és alakot, valamint a mintázatot leíró bélyegek), a genetikai és a fenotípusos variancia közötti korrelációt úgy is megvizsgáltam, hogy a szárny fent említett két jellegcsoportját szétválasztottam és külön-külön végeztem el a korreláció vizsgálatát a méretet és alakot, valamint a mintázatot meghatározó jellegekkel. Először a szárny jellegeinek két csoportja közötti korrelációt vizsgáltam. Azt tapasztaltam, hogy nem volt összefüggés a két jellegcsoport variabilitásának a szintje között (13. táblázat: Szma+Sap). Amikor azonban a genetikai

variabilitás és a szárnyjellegek két különböző csoportjának fenotípusos varianciája közötti kapcsolatot vizsgáltam az eredmények azt mutatták, hogy a szárny méretet és alakot meghatározó jellegei szignifikáns pozitív korelációban vannak a genetikai variabilitással (13. táblázat: Gen+Szma, 24a. ábra), míg a sapkafoltok jellegeinek variabilitása nem korelált a genetikai varianciával (13. táblázat: Gen+Sap, 24b. ábra).

Ez az eredmény indokolta, hogy a két morfológiai jellegcsoport (szárny és ivarszerv) varianciája közötti korelációt is megvizsgáljam külön-külön a szárny méretet és alakot leíró, valamint a szárny mintázatát jellemző jellegek átlagos rangjainak a segítségével. Ebben az elemzésben nem találtam szignifikáns összefüggést egyik összehasonlításban sem (13. táblázat, Szma+Iv; Sap+Iv).

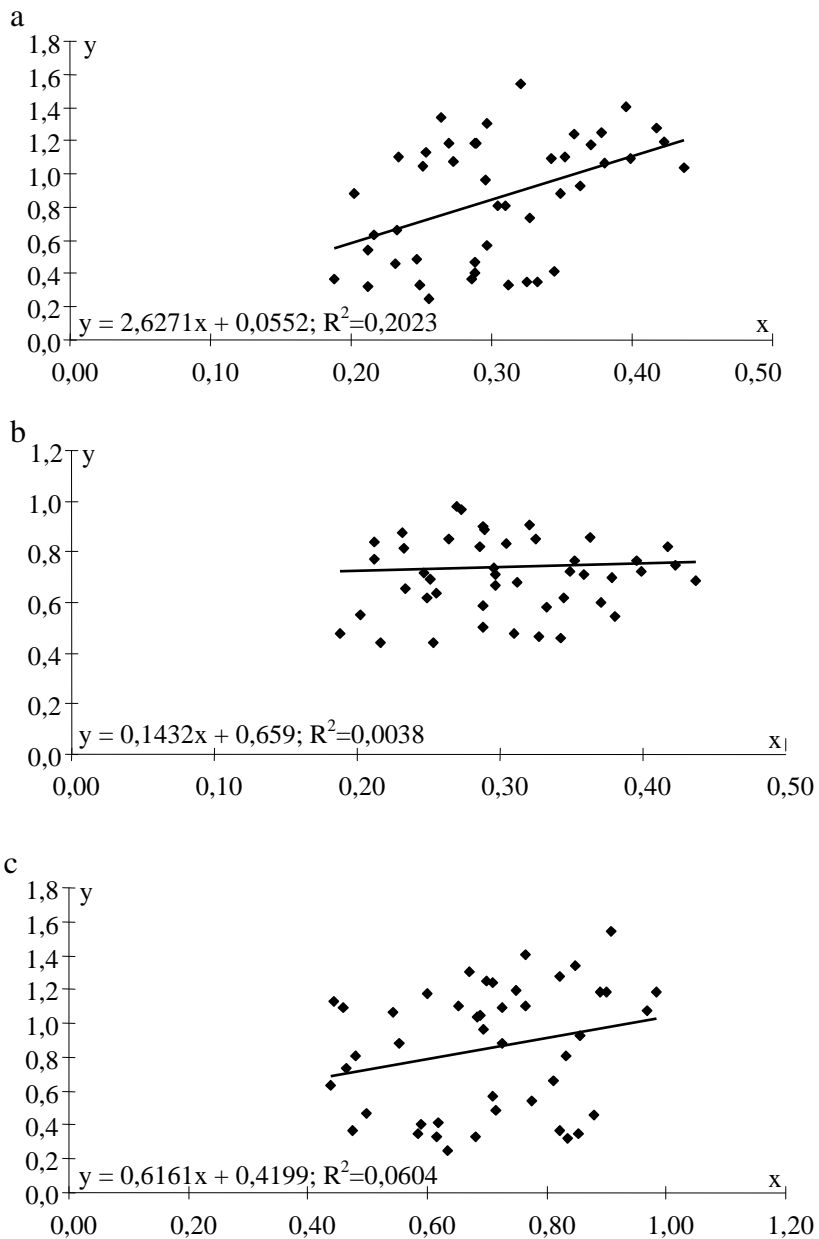
7.2.2. A genetikai és a fenotípusos differenciálódás kapcsolata

A genetikai és a fenotípusos variancia szerkezetének összehasonlítása során a populáció párok közötti differenciálódás szintjét elemeztem. A genetikai differenciálódás leírására a Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságokat használtam, míg a fenotípusos differenciálódást mindkét morfometriai jellegtípusra (szárny illetve genitália) a kanonikus változók átlaga alapján számított euklideszi távolságokkal jellemeztem. Az így kapott távolságmátrixokat Mantel teszt segítségével hasonlítottam össze.

A tesztek eredményei azt mutatták, hogy a hűrtávolságok mátrixa szignifikáns korelációban van a szárny jellegeire számolt euklideszi távolságok mátrixával (14. táblázat: Gen+Szt, 25a. ábra). Az ivarszerv jellegek esetében azonban a két mátrix korelációja nem volt szignifikáns (14. táblázat: Gen+Iv, 25b. ábra). Ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a két morfológiai jelleg differenciálódásának mértéke között nincs szignifikáns koreláció (14. táblázat: Szt+Iv, 25c. ábra).

jelleg/marker párok	N	r	p
Gen+Szt	45	0,450	0,011
Gen+Iv	45	0,061	0,335
Szt+Iv	45	0,246	0,082
Szma+Sap	45	0,748	0,002
Gen+Szma	45	0,390	0,023
Gen+Sap	45	0,351	0,021
Iv +Szma	45	0,214	0,117
Iv+Sap	45	0,209	0,097

14. táblázat: A Mantel teszt eredményei. **Gen:** Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok mátrixa; **Szt:** a szárnyjellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa; **Iv:** az ivarszerv jellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa; **Szma:** a szárnyméret és alak jellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa; **Sap:** a sapkafolt jellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok mátrixa; **r:** korelációs koefficiens; **p:** valószínűség. A szignifikáns korelációt vastag betűtípussal jelöltem.

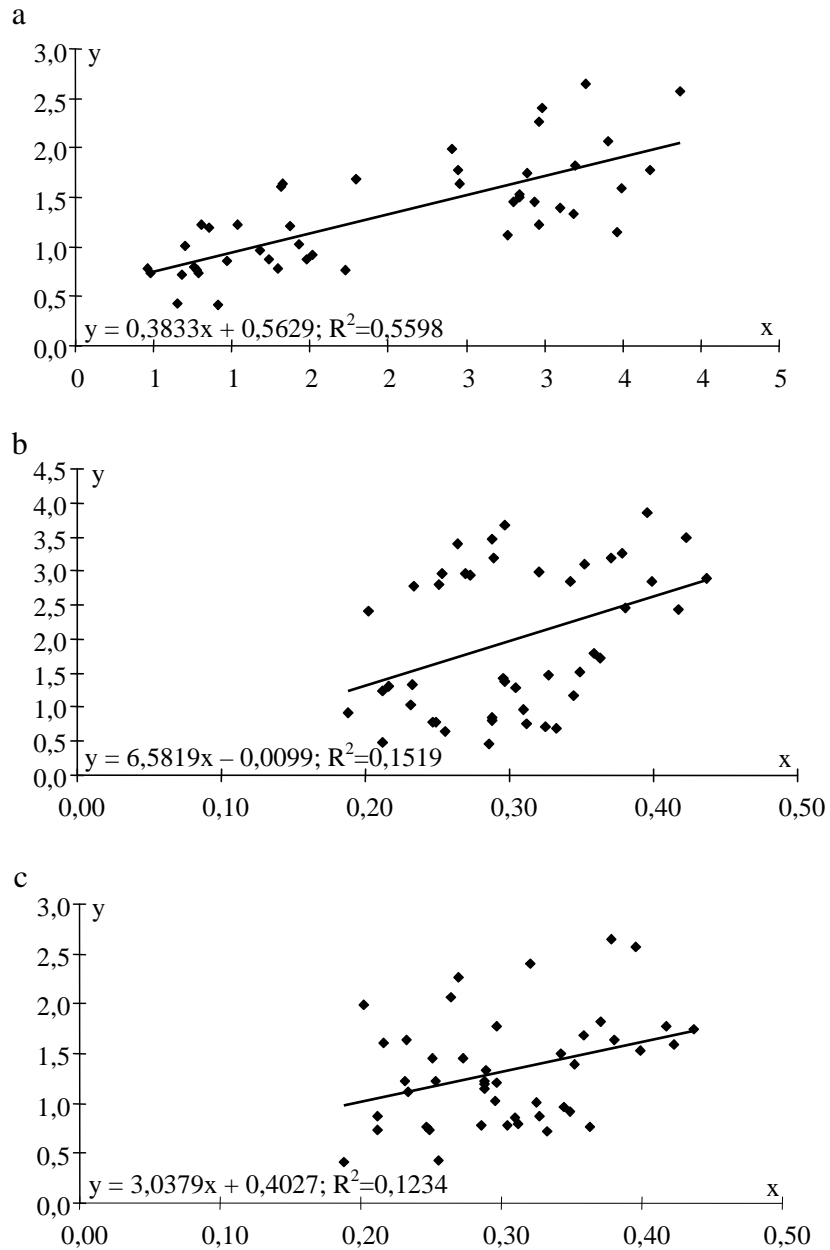


25. ábra: A Mantel teszt eredményei.

- a.: A Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok (x tengely) és a szárnyjellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok (y tengely) közötti kapcsolat.
- b.: A Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok (x tengely) és az ivarszervjellegek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok (y tengely) közötti kapcsolat.
- c.: A szárny- (x tengely) és az ivarszerv jellegek (y tengely) kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok közötti kapcsolat.

A korábbi eredmények tükrében, a fenotípusos és a genetikai differenciálódás mintázatának összehasonlítása során is megvizsgáltam a szárnyméretet és a sapka foltokat jellemző jellegeket külön-külön. A kanonikus változók átlaga alapján mindkét jellegcsoportra nézve külön megállapítottam a populációk közötti morfometriai távolságokat, majd Mantel teszt segítségével először az így kapott két távolságmátrixot hasonlítottam össze. A további tesztekben pedig a szárny két jellegcsoportjára kapott mátrixokat hasonlítottam össze a húrtávolságok mátrixával. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a szárny két különböző jellegcsoportjára számolt mátrixok nagyon szoros, szignifikáns korelációban vannak egymással (14. táblázat, 26a. ábra), valamint a genetikai távolságok mátrixával is (14. táblázat, 26b., c. ábra). Ez az eredmény azért volt meglepő, mert azt jelezte, hogy a fenotípusos variancia és a fenotípusos differenciálódás eltérő tendenciákat mutat a szárny két különböző jellegcsoportja esetében.

Ugyanakkor a két morfometriai jellegtípusra (szárny illetve genitália) számolt távolságmátrixot összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy nem korrelálnak egymással (14. táblázat: Szt+Iv 25c. ábra), vagyis a fenotípusos differenciálódás szintje a szárny és az ivarszerv jellegek között nem mutat párhuzamos trendeket. A koreláció akkor sem mutatkozott szignifikánsnak, amikor a genitália jellegeire számított távolságmátrixot külön-külön vettem össze a két szárnyjellegcsoportra számított távolságmátrixokkal.



26. ábra: A Mantel teszt eredményei.

a.: A szárnyméret és alak (x tengely) illetve a szárny mintázat jellegeinek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok (y tengely) közötti kapcsolat.

b.: A Cavalli-Sforza és Edwards húrtávolságok (x tengely) és a szárnyméret és alak jellegeinek kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok (y tengely) közötti kapcsolat.

c.: A Cavalli-Sforza és Edwards húrtávolságok (x tengely) és a szárny mintázat jellegeinek (y tengely) kanonikus változói alapján számolt euklideszi távolságok közötti kapcsolat.

7.3. Az eredmények megvitatása

A fenotípusos és a genetikai varianciára vonatkozó információk együttes figyelembevétele igen fontos a különböző evolúciós kérdések megválaszolásában, valamint a természetvédelmi problémák megértésében. Nem meglepő tehát, hogy mind a genetikai, mind pedig a fenotípusos variabilitást széles körben tanulmányozták a természetes populációkban. Sok esetben ez a két megközelítés elvált egymástól és a vizsgálatokat külön-külön végezték (morfometria: Wynhoff 2001; Fordyce és mtsai. 2002; Prieto és mtsai. 2009; Dapporto és mtsai. 2009, Tóth és Varga 2011, genetika: Aagaard és mtsai. 2002; Schmitt és mtsai. 2003; Bereczki és mtsai. 2005; Pecsénye mtsai. 2007), de a párhuzamos elemzésekre is van példa. Ez utóbbiakban éppen a genetikai és a morfometriai eredmények összehasonlítására helyezték a hangsúlyt a kutatók (Berwaerts és mtsai. 1998; Garnier és mtsai. 2005; Fiorentino és mtsai. 2008; Francoy és mtsai. 2009; Suwanvijitr és mtsai. 2010; Dincă és mtsai. 2011; Hollós és mtsai. 2012).

Mivel a morfológiai jellegekre jellemző, hogy több-kevesebb fenotípusos plaszticitást mutatnak (azaz nem kizárólag genetikai faktorok határozzák meg őket), fontos azt megvizsgálni, hogy változatosságuk milyen korrelációt mutat a genetikai variabilitással. Mivel a fenotípusos plaszticitás mértéke testrészfüggő lehet (lásd 6. fejezet: szárnyjellegek és az ivarszerv jellegei), érdekes lehet azt is elemezni, hogy a különböző testrészeken mért jellegek varianciája mutat-e párhuzamos tendenciákat, és hogy hasonló módon korrelálnak-e a genetikai variabilitással.

A vizsgálatok során az volt a célom, hogy fényt derítsek a *M. athalia* populációk genetikai és fenotípusos variabilitásának a kapcsolatára. Első lépésben a variancia szintjét hasonlítottam össze az enzimpolimorfizmus és a morfometriai vizsgálatok eredményei alapján. Az eredmények 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 is rávilágított, hogy a szárnyjellegek két típusának (méret+alak és mintázat) variabilitása között nincs koreláció. Így tehát lehetőségem nyílt a két jellegcsoport variabilitását külön-külön is összevetni a genetikai variabilitással. Ebben az analízisben azt tapasztaltam, hogy a szárny méretét és alakját leíró jellegek variabilitása szignifikánsan korrelált a genetikai varianciával, míg a sapkafoltok jellegei nem. Ez az eredmény azért érdekes, mert a szárny méretét és alakját jellemző bélyegek variabilitása jelentősen alacsonyabb szintű volt, mint a szárny mintázatát leíróké (lásd 6.2.3.1 fejezet). Úgy tűnik tehát, hogy a kevésbé variábilis, a környezeti tényezőknek feltehetően kevésbé kitett, szárny méret és alak jobban jelzi a genetikai variabilitás szintjét, mint a szárny mintázata, melyről számottevő mértékű plaszticitást tételezhetünk fel. Ugyanakkor ez az eredmény összhangban van azzal is, hogy a szárny mérete és alakja meghatározó az egyedek repülési adottságait tekintve (lásd 6.3 fejezet). Az a tény, hogy a méretet és alakot meghatározó jellegek fenotípusos varianciája alacsonyabb szintű, mint a mintázatot jellemzőké, valamint hogy a szárnyméret varianciája szignifikáns korelációban van az enzimpolimorfizmus mértékével azt sugallja, hogy ezeknek a jellegeknek a fenotípusos varianciáját nagyrészt genetikai faktorok határozzák meg. Ennek a feltevésnek az igazolására azonban további vizsgálatokat kell végezni.

A jelleg/marker párok variabilitásának mértéke közötti korelációra kapott eredményekkel párhuzamosan a Mantel teszt eredményei is azt mutatták, hogy a genetikai és a morfológiai differenciálódás között szoros koreláció van a szárny jellegeit tekintve. Ugyanakkor nagyon érdekes, hogy akár a variabilitás szintjét, akár a differenciálódás mértékét nézzük, a genitália jellegei nem korreláltak sem az enzimpolimorfizmussal, sem pedig a szárnyjellegek fenotípusos varianciájával. A koreláció hiánya a két

morfológiai jellegcsoport között valószínűleg számos okra vezethető vissza. Ugyan mindkét jellegcsoport varianciáját genetikai és környezeti faktorok határozzák meg, de a környezeti tényezők hatásának a mértéke (vagyis a jellegek fenotípusos plaszticitása), valamint a különböző tényezők relatív súlya feltehetően nagymértékben eltér. Ismert például, hogy a szárnyak erősen ki vannak téve a környezeti tényezők hatásainak (Shapiro 1976; Brakefield és mtsai. 1996; Brakefield és French 1999). De mint azt eredményeim is mutatják, még ebben a jellegcsoportban is különbséget kell tenni a mintázat és a méret+alak jellegei között. Ez utóbbi jellegek valószínűleg szorosabb összefüggésben állnak az élőhelyek jellemzőivel (a táplálékforrás mennyisége, eloszlása, a hőmérséklet, a növényzet struktúrája, stb.), amik feltehetően eltérő repülési sebességet, vagy manőverezési képességet igényelnek (Hill és mtsai. 1999; Berwaerts és mtsai. 2002). Ezért ezeknek a szárnyjellegeknek a differenciálódási szintje adaptív különbségeket jelezhet a populációk között. Ugyanakkor az élőhelyek közötti különbségek (különös tekintettel a táplálékforrásokra, vagy a hőmérsékletre) feltehetően hatással vannak a populációkban megjelenő enzimváltozatok összetételére is. Így lehetséges, hogy az adaptáció és az ehhez vezető szelekciós hatások a két jelleg/marker kapcsán hasonló tendenciával rendelkeznek. Eredményeimből továbbá az is kitűnik, hogy a szárnymintázatot és a méretet illetve alakot meghatározó jellegekre más környezeti faktorok lehetnek hatással. Amikor ugyanis külön-külön vizsgáltam ezt a két jellegcsoportot, nem tapasztaltam közöttük összefüggést, sőt a mintázat jellegei nem korreláltak sem a genetikai variabilitással, sem pedig az ivarszervek jellegeinek fenotípusos varianciájával. Ráadásul a szárnymintázat jellegeinek fenotípusos varianciája magasabb volt, mint a méretet és alakot jellemzőké. Ezek alapján feltételezhető, hogy a mintázat jellegeinek a fenotípusos plaszticitása magasabb szintű, vagyis kevésbé behatároltak a rájuk ható kényszerfeltételek.

Az ivarszervek jellegeinek varianciája viszont csak gyenge korelációban volt az enzimpolimorfizmus szintjével, valamint a szárnyjellegek variabilitásával. Akkor sem tapasztaltam szignifikáns korelációt, amikor a szárnyjellegek két csoportját különválasztottam. Sőt a differenciálódás szintjében sem tapasztaltam párhuzamos trendeket a másik két jelleg/marker csoporttal. Ez az eredmény részben meglepő volt, mert az irodalmi adatok alapján ismert, hogy az ivarszervek kevésbé vannak kitéve a környezeti hatásoknak, vagyis alacsonyabb fenotípusos plaszticitással rendelkeznek (Cesaroni és mtsai. 1994; Dapporto és mtsai. 2009). Ezért azt vártam, hogy a genitália jellegek varianciájának a szintje és a szerkezete korelációban lesz a genetikai variabilitással és esetleg a szárny méretét és alakját leíró jellegekkel is. A koreláció hiánya arra utal, hogy más környezeti tényezők hatnak a két morfológiai jellegcsoport fenotípusos varianciájára.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Melitaea* genus *Mellicta* subgenusába tarozó lepkefajok populációi Európa egyes részein hanyatlóak vagy alacsony egyedszámúak, így konzervációbiológiai és természetvédelmi jelentőségük igen nagy. A subgenus taxonómiaiilag bonyolult, mivel külső jellegeik igen variábilisak, valamint rejtett fajok, alfajok lehetnek jelen. Az élőhelyeik nagyon hasonlóak, bizonyos élőhelyeken egymás mellett fordulnak elő. Életmenet stratégiájukból adódóan a *Melitaea*-fajok populációiban nagymértékű lehet a genetikai sodródás a véletlenszerű események (sztochasztikus hatások) bekövetkezése miatt. Ugyanis egy nőstény egy csomóba viszonylag nagy mennyiségű petét rak le, és a fiatal hernyók is egy darabig társasan élnek, ezért egy nőstény összes utóda egyszerre van kiteve a különböző környezeti faktorok hatásainak.

Az általam vizsgált három tarkalepkefaj hasonló fejlődésmenetű, de életciklusukban egy igen lényeges eltérést lehet megfigyelni, ez pedig a voltinizmus. Míg a *M. britomartis* és a *M. aurelia* évente egy nemzedékes, addig a *M. athalia* esetében két típust lehet elkülöníteni. Az egyik fenológiai típusnak egy generációja van egy évben (monovoltin), míg a másik típusnak kettő (bivoltin). Továbbá a *M. athalia* lárvális fejlődése kis mértékben eltér a másik két fajétól, ugyanis hernyóik már a diapauza előtt szétszélednek a hernyófészekből, egyedileg táplálkoznak és egyedileg esztiválnak illetve hibernálnak. Ezek a lárvák a másik két faj hernyóinál jóval szélesebb tápnövénytáplálék spektrumot képesek hasznosítani.

Vizsgálataim során a *Mellicta* subgenus három fajának Kárpát-medencei populációiban tanulmányoztam a genetikai variabilitás szerkezetét, továbbá a differenciálódás mértékét. Ennek a vizsgálatnak az eredményeire alapozva különös figyelmet fordítottam a *M. athalia* két fenológiai típusának

vizsgálatára, valamint a fajon belüli differenciálódás mintázatának feltárására. Ezért ennek a fajnak külön vizsgáltam a genetikai variabilitását és fajon belüli differenciálódásának mértékét is, továbbá párhuzamos elemzést végeztem a fenotípusos variabilitás és differenciálódás vonatkozásában. Az eredményeket felhasználva a genetikai és a fenotípusos variabilitás szintje illetve struktúrája közötti korrelációt is megvizsgáltam a *M. athalia* populációkban.

Dolgozatom főbb eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

- 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 a vizsgálataik alapján a *M. athalia* és a *M. britomartis* bizonyult közeli rokonnak. Természetesen azt meg kell jegyezni, hogy ők más módszerrel, a Melitaeini tribusz összes fajának egy-egy egyedét vizsgálták. A *M. athalia* két fenológiai típusa között egyik analízis során sem mutatkozott különbség, azaz nem tekinthetők genetikailag két külön csoportnak. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az egy illetve két generációs jelleg egyfajta fenotípusos plaszticitás, vagyis az elkülönülés élőhelybeli sajátosságokon alapszik. Az analízisek eredményei azonban további kérdéseket vetettek fel, ugyanis a *M. athalia* populációk genetikailag nagymértékű differenciálódást mutattak egymástól.
- A *M. athalia* genetikai valamint morfometriai adatainak párhuzamos elemzése során fényt derítettem a populációk differenciálódási struktúrájának mintázatára. Minden genetikai analízisben kimutattam a populációk

regionális differenciálódását, ráadásul ebben az esetben a régiók két jól elkülöníthető csoportot alkottak a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően. A *M. athalia* két fenológiai típusa ebben a vizsgálatban sem különült el egymástól egyik analízisben sem, tehát ebben a típusú vizsgálatban is azt tapasztaltam, hogy nincs a két csoport között genetikai különbség. A fenotípusos differenciálódást megvizsgálva külön-külön a szárny valamint a hímivarszerv jellegeire vonatkoztatva szintén a populációk regionális differenciálódását tapasztaltam. A régiók a szárnyjellegek vonatkozásában részlegesen különültek el a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően, azonban az ivarszerv jellegei esetében ilyen mintázat nem volt megfigyelhető. Eredményeim azt tükrözik tehát, hogy a genetikai valamint a morfometriai vizsgálatok eredményei hasonlóak, ugyanis mindkét esetben a populációk regionális differenciálódása volt kimutatható. Ez a mintázat azonban az enzimpolimorfizmus vizsgálatok során markánsabbnak bizonyult, mivel ebben az esetben a régiókra ráépül egy magasabb hierarchia szint is, amely révén a földrajzi régiók a keleti-, ill. nyugati Kárpát-medencének megfelelően csoportosulnak. 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.

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

Mivel a *Melitaea*-fajok az r-K kontinuum r-hez közelebbi végén helyezkednek el, a populációikat jelentős mértékben érintik a sztochasztikus hatások, így intenzív drift várható melynek következményeként

általánosságban a populációknak alacsony szintű lesz a variabilitása. A dolgozatom eredményei ezzel ellentétben magas szintű variabilitást tükröztek, tehát nem a drift tűnt a variabilitás szintjét befolyásoló elsődleges tényezőnek. Két további lehetséges tényező hatását elemezve (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*) enzimpolimorfizmu adataival hasonlítottam össze. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált fajok variabilitásának mintázatát a centrális–marginális hipotézis magyarázza meg a legteljesebben.

A morfológiai jellegek változatossága sok vizsgálatban tükrözte a genetikai variabilitás szintjét és szerkezetét. Meglepő módon a Levene-változók százalékos értékei azt sugallták, hogy az ivarszerveken mért jellegek variabilitása magasabb, mint a szárnyjellegeké. 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 jellegek variabilitásában nincs egyértelmű, szignifikáns különbség a fenotípusos variancia mértékében a hierarchia felső szintjén. Ugyanakkor a két jellegcsoport esetében ellentétes tendenciát tapasztaltam a morfometriai 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.

• 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 variációjára alacsonyabb szintű, mint a mintázatot jellemzőké, valamint hogy a szárnyméret variációjára szignifikáns korrelációban van az enzimpolimorfizmus mértékével azt sugallja, hogy ezeknek a jellegeknek a fenotípusos variációját 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.

9. SUMMARY

Species of the *Mellicta* subgenus are listed as vulnerable or declining in several countries of Europe. Therefore, these species are of obviously great conservation concern. The subgenus is taxonomically complicated due to the great variety of the species in their external characters. Even the existence of cryptic species has been suggested. The habitat requirements and food plants of *Melitaea* species partly overlap, they often co-occur within the same habitat. *Melitaea* species have fairly similar life cycle: females lay a great number of eggs in a few batches and their caterpillars remain together feeding gregariously. As a consequence, all offspring of a female might be affected by various environmental factors. Due to this special reproductive strategy populations of the *Melitaea* species are greatly exposed to stochastic events and genetic drift is likely to have a large effect on their genetic composition.

The studied three *Melitaea* species differ in voltinism. Hungarian populations of *M. britomartis* and *M. aurelia* have a single brood per year, while *M. athalia* has two ecotypes: one has one brood per year (monovoltine) and the other usually has two (bivoltine). Moreover larval development of *M. athalia* is slightly different compared to the other two. Caterpillars of this species spread before the diapause, feed and aestivate/hibernate solitarily. Furthermore, larvae of *M. athalia* can exploit a wider range of food plants than those of the other two *Melitaea* species.

In my surveys, three *Melitaea* species were studied and I have analysed the structure of genetic variation and the level of differentiation of these species in the Carpathian Basin. I was particularly interested in the level of differentiation among *M. athalia* populations with special regard to the two ecotypes of this species. Accordingly, I have analysed the pattern of genetic differentiation among *M. athalia* populations in the Carpathian Basin. In addition to the study of enzyme polymorphism I also surveyed the structure

of morphometric variation using selected characteristics of wings and external genitalia. Thus, the structure of genetic and phenotypic variation was investigated in parallel. This approach allowed me to analyse the association between genetic and phenotypic variation in this species.

The results can be summarized in the following points:

- 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' surveys. In their tree, *M. athalia* and *M. britomartis* were closely related, while *M. aurelia* occurred in a neighbouring branch with other related species. It has to be mentioned, however, that their approach was entirely different: they used other markers to study the phylogeny of all species of the Melitaeini tribe using 1-3 individuals from each. 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.

- In parallel analyses of genetic and morphometric data I was able to describe the pattern of differentiation in *M. athalia*. All genetic analyses suggested a clear regional differentiation. Moreover, the regions could be separated to the East and West geographic zones 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. Findings of the

morphometric studies of wings and genital organs showed a regional pattern of differentiation of the phenotypic variation as well. Considering the characters measured on the wings, the separation between the regions of 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.

- Analysing the level of genetic variability in the *Mellicta* 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 the 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 *Mellicta* 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 several traits of the wings for higher variation in the populations of the East zone of the Carpathian Basin. 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. the populations of the West zone of the Carpathian Basin seemed to be more variable than those of the East one.

- Testing the correlation between the level of phenotypic and genetic variation at first sight 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, and found 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 the size and shape of the wings was mainly determined by genetic factors. Nevertheless, the level of morphometric variation of the traits of genitalia was not correlated to either 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.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Pecsénye Katalinnak és Prof. Dr. Varga Zoltánnak szakmai segítségükért, támogatásukért valamint hogy sokéves tapasztalatukat átadva segítették munkámat. Külön köszönettel tartozom Mester Valériának, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott az enzimpolimorfizmus vizsgálatok elvégzése során. Köszönöm munkatársamnak Dr. Bereczki Juditnak valamennyi szakmai és emberi segítségét. Hálás vagyok Dr. Tóth Jánosnak, aki nagyon sok hasznos tanáccsal látott el a vizsgálatok megvalósításában, valamint megtanította nekem a genitália preparálás alapjait. Szeretném megköszönni Dr. Végvári Zsoltnak a statisztikai elemzések kivitelezésében nyújtott segítségét, és javaslatait. Köszönöm Dr. Szabó Sándornak és Kozma Péternek a minták begyűjtését, valamint az Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék összes dolgozójának támogatását, akik segítettek munkámat. Hálával tartozom édesanyámnak, valamint férjemnek a dolgozat kivitelezésében és szerkesztésében nyújtott segítségükért. Kutatásaim anyagi háttérét az NKFP-3 B/023/2004 és az OTKA 84071K pályázatok biztosították.

11. IRODALOM

- Aagaard, K., Hindar, K., Pullin, A.S., James, C.H., Hammarstedt, O., Balstad, T. & Hanssen, O. (2002) Phylogenetic relationships in brown argus butterflies (Lepidoptera : Lycaenidae : Aricia) from north-western Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**: 27-37.
- Achtelik, G. (2006) Molekularbiologische Analyse der genetischen Diversität des *Melitaea athalia/celadussa*-Komplexes (Lepidoptera: Nymphalidae) unter Anwendung der ISSRPCR auf Art-, Unterart- und Populationsebene. PhD Thesis, Ruhr-Universität Bochum.
- Allendorf, F.W. & Luikart, G. (2007) Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Oxford.
- Als, T.D., Vila, R., Kandul, N.P., Nash, D.R., Yen, S.H., Hsu, Y.F., Mignault, A.A., Boomsma, J.J. & Pierce, N.E. (2004) The evolution of alternative parasitic life histories in large blue butterflies. *Nature*, **432**: 386-390.
- Avis, J.C. (1994). Molecular markers, Natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.
- Avis, J.C. (2005) Phylogenetic units and currencies above and below the species level. In: Purvis, A., Gittleman, J.L. & Brooks, T. (eds.) *Phylogeny and conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 77-100.
- Bargelloni, L., Alarcon, J.A., Alvarez, M.C., Penzo, E., Magoulas, A., Palma, J. & Patarnello, T. (2005) The Atlantic-Mediterranean transition: Discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**: 523-535.
- Beebe, T. & Rowe, G. (2004) An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press, Oxford, pp. 346.
- Berczki, J., Pecsénye, K., Peregovits, L. & Varga, Z. (2005) Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **43**: 157-165.
- Berczki, J., Pecsénye, K. & Varga, Z. (2006) Geographical versus food plant differentiation in populations of *Maculinea alcon* (Lepidoptera : Lycaenidae) in Northern Hungary. *European Journal of Entomology*, **103**: 725-732.
- Berczki, 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.

- Bergman, K.O., Askling, J., Ekberg, O., Ignell, H., Wahlman, H. & Milberg, P. (2004) Landscape effects on butterfly assemblages in an agricultural region. *Ecography*, **27**: 619-628.
- Berlocher, S.H. & Feder, J.L. (2002) Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology*, **47**: 773-815.
- Berwaerts, K., Van Dyck, H., Van Dongen, S. & Matthysen, E. (1998) Morphological and genetic variation in the speckled wood butterfly (*Pararge aegeria* L.) among differently fragmented landscapes. *Netherlands Journal of Zoology*, **48**: 241-253.
- Berwaerts, K., Van Dyck, H. & Aerts, P. (2002) Does flight morphology relate to flight performance? An experimental test with the butterfly *Pararge aegeria*. *Functional Ecology*, **16**: 484-491.
- Besold, J., Huck, S. & Schmitt, T. (2008) Allozyme polymorphisms in the small heath, *Coenonympha pamphilus*: recent ecological selection or old biogeographical signal? *Annales Zoologici Fennici*, **45**: 217-228.
- Binzenhöfer, B., Schröder, B., Strauss, B., Biedermann, R. & Settele, J. (2005) Habitat models and habitat connectivity analysis for butterflies and burnet moths - The example of *Zygaena carniolica* and *Coenonympha arcania*. *Biological Conservation*, **126**: 247-259.
- Bohme, M.U., Schneeweiss, N., Fritz, U., Schlegel, M. & Berendonk, T.U. (2007) Small edge populations at risk: genetic diversity of the green lizard (*Lacerta viridis viridis*) in Germany and implications for conservation management. *Conservation Genetics*, **8**: 555-563.
- Bohonak, A.J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology*, **74**: 21-45.
- Brakefield, P.M. & French, V. (1999) Butterfly wings: the evolution of development of colour patterns. *Bioessays*, **21**: 391-401.
- Brakefield, P.M., Gates, J., Keys, D., Kesbeke, F., Wijngaarden, P.J., Monteiro, A., French, V. & Carroll, S.B. (1996) Development, plasticity and evolution of butterfly eyespot patterns. *Nature*, **384**: 236-242.
- Bridle, J.R. & Vines, T.H. (2007) Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? *Trends in Ecology & Evolution*, **22**: 140-147.
- Briscoe, D.A., Malpica, J.M., Robertson, A., Smith, G.J., Frankham, R., Banks, R.G. & Barker, J.S.F. (1992) Rapid Loss of Genetic-Variation in Large Captive Populations of *Drosophila* Flies - Implications for the Genetic Management of Captive Populations. *Conservation Biology*, **6**: 416-425.

- Bryant, E.H. (1984) A Comparison of Electrophoretic and Morphometric Variability in the Face Fly, *Musca-Autumnalis*. *Evolution*, **38**: 455-458
- Butlin, R.K. & Tregenza, T. (1998) Levels of genetic polymorphism: marker loci versus quantitative traits. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **353**: 187-98.
- Cassel, A. & Tammaru, T. (2003) Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (*Coenonympha hero* : Lepidoptera, Nymphalidae): Implications for conservation. *Conservation Genetics*, **4**: 83-93.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edwards, A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, **19**: 233-257.
- Cesaroni, D., Lucarelli, M., Allori, P., Russo, F. & Sbordoni, V. (1994) Patterns of evolution and multidimensional systematics in graylings (Lepidoptera: Hipparchia). *Biological Journal of the Linnean Society*, **52**: 101-119.
- Coates, B.S., Sumerford, D.V. & Hellmich, R.L. (2004) Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplotypes. *Journal of Insect Science*, **4**: 1-9.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M. & Wayne, R.K. (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree*, **15**
- Crnokrak, P. & Roff, D.A. (1995) Dominance Variance - Associations with Selection and Fitness. *Heredity*, **75**: 530-540.
- Dapporto, L., Bruschini, C., Baracchi, D., Cini, A., Gayubo, S.F., González, J.A. & Dennis, R.L.H. (2009) Phylogeography and counter-intuitive inferences in island biogeography: evidence from morphometric markers in the mobile butterfly *Maniola jurtina* (Linnaeus) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**: 677-692
- Descimon, H. & Mallet, J. (2010) Bad species. In: Settele, J., Konvicka, M., Shreeve, T., Dennis, R. & Dyck, V. (eds.) *Ecology of Butterflies in Europe*. Cambridge University Press, London: pp. 219-249.
- Diamond, J. (1989) Overview of recent extinction. In: Pearls, M. & Western, D. (eds): *Conservation for the twenty-first century*. Oxford University Press, New York, pp. 37-41.
- Dincă, V., Lukhtanov, V.A., Talavera, G. & Vila, R. (2011a) Unexpected layers of cryptic diversity in wood white *Leptidea* butterflies. *Nature Communications*, **2**: 324.

- Dincă, V., Dapporto, L. & Vila, R. (2011b) A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* common blue butterflies. *CORD Conference Proceedings*, **20**: 3921-3935.
- Earl, D.A. & vonHoldt, B.M. (2011) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**: 359-361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Ebert, G. & Rennwald, E. (1991) Die Schmetterlinge Baden-Württenbergs. Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart.
- Eckert, C.G., Samis, K.E. & Loughheed, S.C. (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, **17**: 1170-1188.
- Emelianov, I., Marec, F. & Mallet, J. (2004) Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **271**: 97-105.
- Erhardt, A. (1985) Diurnal Lepidoptera - Sensitive Indicators of Cultivated and Abandoned Grassland. *Journal of Applied Ecology*, **22**: 849-861.
- Erhardt, A. & Thomas, J.A. (1991) Lepidoptera as indicators of change in seminatural grasslands of lowland and upland Europe. In: Collins, N.M. & Thomas, J.A. (eds.) *The Conservation of Insects and their Habitats*. Academic Press, London, pp. 213-236.
- Eriksson, K., Halkka, O., Lokki, J. & Saura, A. (1976) Enzyme polymorphism in feral, outbred and inbred rats (*Rattus norvegicus*). *Heredity*, **37**: 341-349.
- Estonba, A., Solis, A., Iriondo, M., Sanz-Martin, M.J., Perez-Suarez, G., Markov, G. & Palacios, F. (2006) The genetic distinctiveness of the three Iberian hare species: *Lepus europaeus*, *L. granatensis*, and *L. castroviejoi*. *Mammalian Biology*, **71**: 52-59.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-91.
- Fahrig, L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **34**: 487-515.

- Falconer, D.S (1981) Introduction to quantitative genetics. (Third edition) Longman Scientific and Technical, New York.
- Fartmann, T. (2004) Die Schmetterlingsgemeinschaften der Halbtrockenrasen-Komplexe des Diemeltales. Biozönologie von Tagfaltern und Widderchen in einer alten Hudelandschaft. *Abhandlungen aus dem Westfälischen Museum für Naturunde* **66**(1): 1-256.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Fiorentino, V., Salomone, N., Manganelli, G. & Giusti, F. (2008) Phylogeography and morphological variability in land snails: the Sicilian Marmorana (Pulmonata, Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **94**: 809-823.
- Fleishman, E., Thomson, J.R., Mac Nally, R., Murphy, D.D. & Fay, J.P. (2005) Using indicator species to predict species richness of multiple taxonomic groups. *Conservation Biology*, **19**: 1125-1137.
- Fordyce, J.A., Nice, C.C., Forister, M.L. & Shapiro, A.M. (2002) The significance of wing pattern diversity in the Lycaenidae: mate discrimination by two recently diverged species. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**: 871-879.
- Francoy, T.M., Wittmann, D., Steinhage, V., Drauschke, M., Muller, S., Cunha, D.R., Nascimento, A.M., Figueiredo, V.L.C., Simoes, Z.L.P., De Jong, D., Arias, M.C. & Goncalves, L.S. (2009) Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. *Genetics and Molecular Research*, **8**: 709-717.
- Frankham, R. (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, **29**: 305-327.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 617
- Futuyma, D.J. (2005) Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Garnier, S., Alibert, P., Audiot, P., Prieur, B. & Rasplus, J.Y. (2004) Isolation by distance and sharp discontinuities in gene frequencies: implications for the phylogeography of an alpine insect species, *Carabus solieri*. *Molecular Ecology*, **13**: 1883-1897.
- Garnier, S., Magniez-Jannin, F., Rasplus, J.Y. & Alibert, P. (2005) When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 269-280.

- Gorrochotegui-Escalante, N., Munoz, M.D., Fernandez-Salas, I., Beaty, B.J. & Black, W.C. (2000) Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**: 200-209.
- Goudet, J. (1995) Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**: 485.
- Gratton, P., Konopinski, M.K. & Sbordoni, V. (2008) Pleistocene evolutionary history of the Clouded Apollo (*Parnassius mnemosyne*): genetic signatures of climate cycles and a 'time-dependent' mitochondrial substitution rate. *Molecular Ecology*, **17**: 4248-4262.
- Grobler, J.P., Mafumo, H.B. & Minter, L.R. (2003) Genetic differentiation among five populations of the South African ghost frog, *Heleophryne natalensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 1023-1032.
- Guillaumin, M. & Descimon, H. (1976) La notion d'espèce chez les Lépidoptères. *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*, **21**: 129-201.
- Habel, J.C., Schmitt, T. & Muller, P. (2005) The fourth paradigm pattern of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the Marbled White butterfly (Satyrinae, Lepidoptera). *Journal of Biogeography*, **32**: 1489-1497.
- Habel, J.C. & Schmitt, T. (2009) The genetic consequences of different dispersal behaviours in Lycaenid butterfly species. *Bulletin of Entomological Research*, **99**: 513-523.
- Habel, J.C. & Schmitt, T. (2012) The burden of genetic diversity. *Biological Conservation*, **147**: 270-274.
- Habel, J.C., Junker, M. & Schmitt, T. (2010) High dispersal ability and low genetic differentiation in the widespread butterfly species *Melanargia galathea*. *Journal of Insect Conservation*, **14**: 467-478.
- Habel, J., Lens, L., Rodder, D. & Schmitt, T. (2011) From Africa to Europe and back: refugia and range shifts cause high genetic differentiation in the Marbled White butterfly *Melanargia galathea*. *BMC Evolutionary Biology*, **11**: 215.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2006) PAST - Paleontological Statistics, version 1.56 *Web site*: <http://folk.uio.no/ohammer/past>
- Hammouti, N., Schmitt, T., Seitz, A., Kosuch, J. & Veith, M. (2010) Combining mitochondrial and nuclear evidences: a refined evolutionary history of *Erebia medusa* (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) in Central Europe based on the COI gene. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **48**: 115-125.

- Hard, J.J. (1995) A quantitative genetic perspective on the conservation of intraspecific diversity. *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique Units in Population Conservation*, **17**: 304-326.
- Harris, H. & Hopkinson, D.A. (1976) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Hartl, D.L. (1998) A Primer of Population Genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hartl, G.B. & Reimoser, F. (1988) Biochemical variation in roe deer (*Capreolus capreolus* L.): are r-strategists among deer genetically less variable than K-strategists? *Heredity*, **60**: 221-227
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. (1989) Principles of population genetics. (Second edition) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hartl, G.B., Markov, G., Rubin, A., Findo, S., Lang, G. & Willing, R. (1993) Allozyme Diversity within and among Populations of 3 Ungulate Species (*Cervus-Elaphus*, *Capreolus-Capreolus*, *Sus-Scrofa*) of Southeastern and Central-Europe. *Zeitschrift Fur Säugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology*, **58**: 352-361
- Hartl, G.B., Zachos, F.E., Nadlinger, K., Ratkiewicz, M., Klein, F. & Lang, G. (2005) Allozyme and mitochondrial DNA analysis of French red deer (*Cervus elaphus*) populations: genetic structure and its implications for management and conservation. *Mammalian Biology*, **70**: 24-34.
- Haubrich, K. & Schmitt, T. (2007) Cryptic differentiation in alpine-endemic, high-altitude butterflies reveals down-slope glacial refugia. *Molecular Ecology*, **16**: 3643-3658.
- Hedrick, P.W. (1985) Genetic of Populations. Jones & Burtlett Publishers, Boston.
- Hill, J.K., Thomas, C.D. & Blakeley, D.S. (1999) Evolution of flight morphology in a butterfly that has recently expanded its geographic range. *Oecologia*, **121**: 165-170.
- Hill, J.K., Hughes, C.L., Dytham, C. & Searle, J.B. (2006) Genetic diversity in butterflies: interactive effects of habitat fragmentation and climate-driven range expansion. *Biology Letters*, **2**: 152-154.
- Hobbs, R.J. & Mooney, H.A. (1998) Broadening the extinction debate: Population deletions and additions in California and Western Australia. *Conservation Biology*, **12**: 271-283.
- Hodgson, J.A., Moilanen, A., Bourn, N.A.D., Bulman, C.R. & Thomas, C.D. (2009) Managing successional species: Modelling the dependence of heath fritillary populations on the spatial distribution of woodland management. *Biological Conservation*, **142**: 2743-2751.

- Hoelzel, A.R., Natoli, A., Dahlheim, M.E., Olavarria, C., Baird, R.W. & Black, N.A. (2002) Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **269**: 1467-1473.
- Hollós, A., Pecsénye, K., Bereczki, 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**: 87-103.
- Hughes, J.B., Daily, G.C. & Ehrlich, P.R. (1997) Population diversity: Its extent and extinction. *Science*, **278**: 689-692.
- Issekutz, L. & Kovács, L. (1954) A melitaea-nem athalia csoportja, különös tekintettel a *M. britomartis*-ra. *Rovartani közlemények, Folia Entomologica Hungarica*, **7**: 133-146.
- IUCN-International Union for Conservation of Nature and Natural Resources 2008. IUCN Red List of Threatened Species. *Web site*: www.iucnredlist.org.
- IUCN 2012. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2012.1. *Web site*: <http://www.iucnredlist.org>.
- Janson, K. (1987) Allozyme and Shell Variation in two Marine Snails (*Littorina*, *Prosobranchia*) with different dispersal abilities. *Biological Journal of the Linnean Society*, **30**: 245-256.
- Joyce, D.A. & Pullin, A.S. (2003) Conservation implications of the distribution of genetic diversity at different scales: a case study using the marsh fritillary butterfly (*Euphydryas aurinia*). *Biological Conservation*, **114**: 453-461.
- Kelley, S.T., Farrell, B.D. & Mitton, J.B. (2000) Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity*, **84**: 218-227.
- Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. (1999) Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology*, **8**: 1481-1495.
- Kirkpatrick, M. & Barton, N.H. (1997) Evolution of a species' range. *The American Naturalist*, **150**: 1-23.
- Kizic, M. & Borovac, M. (2001) ImageJ: Image Processing and Analysis in Java, *Web site*: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/pdfs/imagej-gui.pdf>
- Kudrna, O., Harpke, A., Lux, K., Pennerstorfer, J., Schweiger, O., Settele, J. & Wiemers, M. (2011) *Distribution Atlas of Butterflies in Europe*. Gesellschaft für Schmetterlingsschutz, Halle.

- Lande, R. (1981) The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* **99**: 541-553.
- Lande, R. & Barrowclough, G.F. (1987) Effective population size, genetic variation and their use in population management. In: Suole, M.E. (ed.) *Viable population for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 87-123.
- Launer, A.E. & Murphy, D.D. (1994) Umbrella Species and the Conservation of Habitat Fragments - a Case of a Threatened Butterfly and a Vanishing Grassland Ecosystem. *Biological Conservation*, **69**: 145-153.
- Leberg, P.L. (1996) Applications of allozyme electrophoresis in conservation biology. In: Smith, T.B. & Wayne, R.K. (Eds.) *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press, Oxford, pp. 87-103.
- Leijts, R., van Apeldoorn, R.C. & Bijlsma, R. (1999) Low genetic differentiation in north-west European populations of the locally endangered root vole, *Microtus oeconomus*. *Biological Conservation*, **87**: 39-48.
- Leneveu, J., Chichvarkhin, A. & Wahlberg, N. (2009) Varying rates of diversification in the genus *Melitaea* (Lepidoptera: Nymphalidae) during the past 20 million years. *Biological Journal of the Linnean Society*, **97**: 346-361.
- Lenormand, T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**: 183-189.
- Lepidopteren Arbeitsgruppe (1987) Tagfalter und Ihre Lebensräume. Arten - Gefährdung- Schutz. Schweizerischer Bund für Naturschutz. pp. 222-231.
- Louy, D., Habel, J.C., Schmitt, T., Assmann, T., Meyer, M. & Muller, P. (2007) Strongly diverging population genetic patterns of three skipper species: the role of habitat fragmentation and dispersal ability. *Conservation Genetics*, **8**: 671-681.
- Lozier, J.D., Roderick, G.K. & Mills, N.J. (2008) Evolutionarily significant units in natural enemies: Identifying regional populations of *Aphidius transcaspicus* (Hymenoptera: Braconidae) for use in biological control of mealy plum aphid. *Biological Control*, **46**: 532-541.
- Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P. (2004) *Ecological genetics. Design, analysis and Application*. Blackwell Publishing, Malden.
- Maes, D., Vanreusel, W., Talloen, W. & Van Dyck, H. (2004) Functional conservation units for the endangered Alcon Blue butterfly *Maculinea alcon* in Belgium (Lepidoptera : Lycaenidae). *Biological Conservation*, **120**: 229-241.

- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**: 189-197.
- Manly, B.F.J. (1986) *Multivariate Statistical Methods. A primer*. Chapman & Hall, London. Pp. 26-41.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-20.
- Mantel, N. & Valand, R.S. (1970) A Technique of Nonparametric Multivariate Analysis. *Biometrics*, **26**: 547-558.
- Marcon, P.C.R.G., Taylor, D.B., Mason, C.E., Hellmich, R.L. & Siegfried, B.D. (1999) Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera : Crambidae). *Insect Molecular Biology*, **8**: 213-221.
- May, B. (1992) Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel, A.R. (ed.) *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Oxford University Press, Oxford, pp. 1-18.
- Maynard Smith, J. (1989) *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Megléc, E., Pecsénye, K., Peregovits, L. & Varga, Z. (1997) Allozyme variation in *Parnassius mnemosyne* (L.) (Lepidoptera) populations in north-east Hungary: variation within a subspecies group. *Genetica*, **101**: 59-66
- Megléc, E., Petenian, F., Danchin, E., Coeur d'Acier, A., Rasplus, J.Y. & Faure, E. (2004) High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology*, **13**: 1693-1700.
- Mitton, J.B. (1997) *Selection in natural populations*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Moritz, C. (1994) Defining Evolutionarily-Significant-Units for Conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **9**: 373-375.
- Murphy, D.D. & Wilcox, B.A. (1986) Butterfly diversity in natural habitat fragments: a test of the validity of vertebrate-based management. In: Verner, J., Morrison, M. & Ralph, C. J. (eds.) *Wildlife 200: Modeling habitat relationship of terrestrial vertebrate*. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, pp. 287-292.
- Murphy, R.W., Sites, J.W., Jr. Buth, D.G. & Hauber, C.H. (1990) Proteins I. Isoenzyme electrophoresis. In: Hillis, D.M. & Moritz, C. (eds.) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, pp. 45-126.

- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Neville, H.M., Dunham, J.B. & Peacock, M.M. (2006) Landscape attributes and life history variability shape genetic structure of trout populations in a stream network. *Landscape Ecology*, **21**: 901-916.
- Nevo, E., Beiles, A. & Ben-Shlomo, R. (1984) The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates. In: Mani, G.S. (ed.) *Lecture Notes in Biomathematics*, Vol. 53. Springer-Verlag, Berlin, pp. 13-213
- New, T.R. (1997) Are Lepidoptera an effective 'umbrella group' for biodiversity conservation? *Journal of Insect Conservation*, **1**: 5-12.
- Newman, A., Bush, M., Wildt, D.E., Dam, D.v., Frankenhuis, M.T., Simmons, L., Phillips, L. & O'Brien, S.J. (1985) Biochemical Genetic Variation in Eight Endangered or Threatened Felid Species. *Journal of Mammalogy*, **66**: 256-267.
- Néve, G. & Meglecz, E. (2000) Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**: 376-377.
- Néve, G., Barascud, B., Descimon, H. & Baguette, M. (2000) Genetic structure of *Proclissiana eunomia* populations at the regional scale (Lepidoptera, Nymphalidae). *Heredity*, **84**: 657-666.
- Nice, C.C. & Shapiro, A.M. (1999) Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepidoptera : Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**: 936-950.
- Noss, R.F. (1990) Indicators for Monitoring Biodiversity - a Hierarchical Approach. *Conservation Biology*, **4**: 355-364.
- Nosil, P., Crespi, B.J. & Sandoval, C.P. (2002) Host-plant adaptation drives the parallel evolution of reproductive isolation. *Nature*, **417**: 440-443.
- Opdam, P. (1988) Populations in fragmented landscape. In: Schreiber, K.F. (ed.) *Connectivity in Landscape Ecology*. Münstersche Geographische Arbeiten 29, Münster, pp. 75-77.
- Packer, L., Zayed, A., Gixti, J.C., Ruz, L., Owen, R.E., Vivallo, F. & Toro, H. (2005) Conservation genetics of potentially endangered mutualisms: Reduced levels of genetic variation in specialist versus generalist bees. *Conservation Biology*, **19**: 195-202.
- Paplinska, J.Z., Taggart, D.A., Corrigan, T., Eldridge, M.D.B. & Austin, J.J. (2011) Using DNA from museum specimens to preserve the integrity of evolutionarily significant unit boundaries in threatened species. *Biological Conservation*, **144**: 290-297.

- Peacock, M.M., Robinson, M.L., Walters, T., Mathewson, H.A. & Perkins, R. (2010) The Evolutionarily Significant Unit Concept and the Role of Translocated Populations in Preserving the Genetic Legacy of Lahontan Cutthroat Trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, **139**: 382-395.
- Peakal, R. & Smouse, P.E. (2006) Genalex6: Genetic analysis in Excell. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-295.
- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tóth, A., & Varga, Z. (2005) The genetic structure of the Maculinea teleius populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Hungary. In: Settele, J., Kühn, E. & Thomas, J. (eds.) *Studies on the Ecology and Conservation of Butterflies in Europe. Vol. 2. Species ecology along a European Gradient: Maculinea butterflies as a model*. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow, pp. 192-196.
- Pecsénye, K., Megléc, E., Kenyeres, Á. & Varga, Z. (2006) Population structure and enzyme polymorphism in three protected butterfly species in the Carpathian Basin (*Parnassius mnemosyne*, *Euphydryas maturna*, *Aricia artaxerxes*). In: Láng, I. (ed) *Environmental Science and Technology in Hungary*. Műszaki Kiadó, Budapest.
- Pecsénye, K., Bereczki, J., Szilágyi, M. & Varga, Z. (2007a) High level of genetic variation in *Aricia artaxerxes issekutzii* (Lepidoptera: Lycaenidae) populations in Northern Hungary. *Nota Lepidopterologica*, **30**: 225-234.
- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tihanyi, B., Tóth, A., Peregovits, L. & Varga, Z. (2007b) Genetic differentiation among the Maculinea species (Lepidoptera : Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**: 11-21.
- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tóth, A., Megléc, E., Peregovits, L., Juhász, E. & Varga, Z. (2007c) A populációstruktúra és a genetikai variabilitás kapcsolata védett nappalilepke-fajainknál. In: Forró, L. & Ronkay, L. (eds.) *A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása*. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, pp. 241-260.
- Peterson, M.A. & Denno, R.F. (1998) The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. *American Naturalist*, **152**: 428-446.
- Pogson, G.H., Taggart, C.T., Mesa, K.A. & Boutilier, R.G. (2001) Isolation by distance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*, at large and small geographic scales. *Evolution*, **55**: 131-146.
- Porter, K. (1992) Eggs and egg laying. In: Dennis R.L.H. (ed.): *The ecology of butterflies in Britain*. Oxford University Press, Oxford, pp. 46-72

- Précsényi I., Barta Z., Karsai I. és Székely T. (1995): Alapvető kutatástervezési, statisztikai és projectértékelési módszerek a szupraindividuális biológiában. KLTE. Debrecen.
- Prieto, C.G., Munguira, M.L. & Romo, H. (2009) Morphometric analysis of genitalia and wing pattern elements in the genus *Cupido* (Lepidoptera, Lycaenidae): are *Cupido minimus* and *C. carswelli* different species? *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, **56**: 137-147.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, **155**: 945–959.
- Pritchard, J.K. 2004. Structure 2.1 *Web site*: <http://pritch.bsd.uchicago.edu>
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995a) An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**: 1280-1283.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995b) GENEPOP ver.1.2, a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 246-249.
- R Developmental Core Team. (2008) *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Reed, D.H. & Frankham, R. (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution*, **55**: 1095-1103.
- Richardson, B.J., Baverstock, P.R. & Adams, M. (1986) Allozyme Electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press, Sydney.
- Ricketts, T.H. (2001) The matrix matters: Effective isolation in fragmented landscapes. *American Naturalist*, **158**: 87-99.
- Ries, L. & Debinski, D.M. (2001) Butterfly responses to habitat edges in the highly fragmented prairies of Central Iowa. *Journal of Animal Ecology*, **70**: 840-852.
- Ridley, M. (1996) *Evolution*. (Second edition) Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts.
- Robinson, G.S. (1976) The preparation of slides of Lepidoptera genitalia with special reference to the Microlepidoptera. *Entomologist's Gazette*, **27**: 127–132.
- Ryder, O.A. (1986) Species conservation and systematics: The dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, **1**: 9-10.
- Ryman, N., Lagercrantz, U., Andersson, L., Chakraborty, R. & Rosenberg, R. (1984) Lack of Correspondence between Genetic and Morphologic Variability Patterns in Atlantic Herring (*Clupea-Harengus*). *Heredity*, **53**: 687-704.

- Saccheri, I.J., Brakefield, P.M. & Nichols, R.A. (1996) Severe inbreeding depression and rapid fitness rebound in the butterfly *Bicyclus anynana* (Satyridae). *Evolution*, **50**: 2000-2013.
- Sage, R.D. & Wolff, J.O. (1986) Pleistocene Glaciations, Fluctuating Ranges, and Low Genetic Variability in a Large Mammal (*Ovis dalli*). *Evolution*, **40**: 1092-1095.
- Santos, H., Rousset, J., Magnoux, E., Paiva, M.R., Branco, M. & Kerdelhue, C. (2007) Genetic isolation through time: allochronic differentiation of a phenologically atypical population of the pine processionary moth. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **274**: 935-941.
- Schadewald, G. (1988) Anmerkungen zu *Melitaea neglecta* PFAU, 1962 (Lep., Nymphalidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo*, **8**: 109-112.
- Schmitt, T. (1999) Phylogeographie europäischer Tagfalter basierend auf populations-genetischen Analysen. Ph.D. Dissertatio, Mainz, pp. 131.
- Schmitt, T. & Seitz, A. (2001) Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera : Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography*, **28**: 1129-1136.
- Schmitt, T. & Seitz, A. (2002) Postglacial distribution area expansion of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera : Lycaenidae) from its Ponto-Mediterranean glacial refugium. *Heredity*, **89**: 20-26.
- Schmitt, T. & Hewitt, G.M. (2004) The genetic pattern of population threat and loss: a case study of butterflies. *Molecular Ecology*, **13**: 21-31.
- Schmitt, T. & Müller, P. (2007) Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly *Erebia medusa* (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe (vol 45, pg 39, 2007). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **45**: 175-175.
- Schmitt, T. & Haubrich, K. (2008) The genetic structure of the mountain forest butterfly *Erebia euryale* unravels the late Pleistocene and postglacial history of the mountain coniferous forest biome in Europe. *Molecular Ecology*, **17**: 2194-2207.
- Schmitt, T. & Zimmermann, M. (2012) To hybridize or not to hybridize: what separates two genetic lineages of the Chalk-hill Blue *Polyommatus coridon* (Lycaenidae, Lepidoptera) along their secondary contact zone throughout eastern Central Europe? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **50**: 106-115.
- Schmitt, T., Varga, Z. & Seitz, A. (2000) Forests as dispersal barriers for *Erebia medusa* (Nymphalidae, Lepidoptera). *Basic and Applied Ecology*, **1**: 53-59.

- Schmitt, T., Giessler, A. & Seitz, A. (2002) Postglacial colonisation of western Central Europe by *Polyommatus coridon* (Poda 1761) (Lepidoptera : Lycaenidae): evidence from population genetics. *Heredity*, **88**: 26-34.
- Schmitt, T., Giessler, A. & Seitz, A. (2003) Did *Polyommatus icarus* (Lepidoptera : Lycaenidae) have distinct glacial refugia in southern Europe? Evidence from population genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, **80**: 529-538.
- Schmitt, T., Varga, Z. & Seitz, A. (2005) Are *Polyommatus hispana* and *Polyommatus slovacus* bivoltine *Polyommatus coridon* (Lepidoptera : Lycaenidae)? The discriminatory value of genetics in taxonomy. *Organisms Diversity & Evolution*, **5**: 297-307.
- Schmitt, T., Habel, J.C., Zimmermann, M. & Müller, P. (2006a) Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology*, **15**: 1889-901.
- Schmitt, T., Habel, J.C., Besold, J., Becker, T., Johnen, L., Knolle, M., Rzepecki, A., Schultze, J. & Zapp, A. (2006b) The Chalk-hill Blue *Polyommatus coridon* (Lycaenidae, Lepidoptera) in a highly fragmented landscape: How sedentary is a sedentary butterfly? *Journal of Insect Conservation*, **10**: 311-316.
- Schmitt, T., Rakosy, L., Abadjiev, S. & Müller, P. (2007) Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography*, **34**: 939-950.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Settele, J., Margules, C., Poschold, P. & Henle, K. (eds) (1996) *Species Survival in Fragmented Landscapes*. Kluwer, Dordrecht, pp. 381.
- Settele, J., Feldmann, R. & Reinhardt, R. (1999) *Die Tagfalter Deutschland*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Shapiro, A.M. (1976) Seasonal polyphenism. *Evolutionary Biology*, **9**: 259-333
- Shreeve, T.G., Dennis, R.L.H., Roy, D.B. & Moss, D. (2001) An ecological classification of British butterflies: Ecological attributes and biotope occupancy. *Journal of Insect Conservation*, **5**: 145-161.
- Siikamäki, P. & Lammi, A. (1998) Fluctuating asymmetry in central and marginal populations of *Lychnis viscaria* in relation to genetic and environmental factors. *Evolution*, **52**: 1285-1292.

- Simberloff, D. (1998a) Flagships, umbrellas, and keystones: Is single-species management passe in the landscape era? *Biological Conservation*, **83**: 247-257.
- Simberloff, D. (1998b) Small and declining populations. In: Sutherland, W. J. (ed.) *Conservation Science and Action*. Blackwell Science, Oxford, pp. 116-134.
- Sinama, M., Dubut, V., Costedoat, C., Gilles, A., Junker, M., Malausa, T., Martin, J.F., Neve, G., Pech, N., Schmitt, T., Zimmermann, M. & Meglecz, E. (2011) Challenges of microsatellite development in Lepidoptera: *Euphydryas aurinia* (Nymphalidae) as a case study. *European Journal of Entomology*, **108**: 261-266.
- Sneath, P.H. & Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Soulé, M.E. & Zegers, G.P. (1996) Phenetics of natural populations .5. Genetic correlates of phenotypic variation in the pocket gopher (*Thomomys bottae*) in California. *Journal of Heredity*, **87**: 341-350.
- SPSS Inc. (1999) *SPSS base 10.0 for windows user's guide*. Chicago, IL: SPSS Inc.
- Stearns, S.C. & Hoekstra, R.F. (2000) *Evolution: an introduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Steffan-Dewenter, I. & Tschardt, T. (2000) Butterfly community structure in fragmented habitats. *Ecology Letters*, **3**: 449-456.
- Stefanni, S. & Thorley, J.L. (2003) Mitochondrial DNA phylogeography reveals the existence of an Evolutionarily Significant Unit of the sand goby *Pomatoschistus minutus* in the Adriatic (Eastern Mediterranean). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28**: 601-609.
- Stireman, J.O., 3rd, Nason, J.D. & Heard, S.B. (2005) Host-associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? Evidence from a goldenrod-insect community. *Evolution*, **59**: 2573-87.
- Suwanvijitr, T., Kaewmuangmoon, J., Cherdshewasart, W. & Chanchao, C. (2010) Morphometric and Genetic Variation in *Pueraria Mirifica* Cultivars across Thailand. *Pakistan Journal of Botany*, **42**: 97-109.
- Taylor, A.C., Sherwin, W.B. & Wayne, R.K. (1994) Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorchinus krefftii*. *Molecular Ecology*, **3**: 277-290.

- Thomas, C.D. (2000) Dispersal and extinction in fragmented landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **267**: 139-145.
- Thomas, J.A., Clarke, R. T., Randle, Z., Simcox, D.J., Schonrogge, K., Elmes, G. W., Wardlaw, J.C. and Settele, J. (2005). Maculinea and Myrmecophiles as Sensitive Indicators of Grassland Butterflies (Umbrella Species), Ants (Keystone Species) and Other Invertebrates. *In*: Settele, J., Kühn, E. and Thomas, J.A., eds. *Studies on the Ecology and Conservation of Butterflies in Europe*. Sofia, Bulgaria: Pensoft, pp. 28-31.
- Tolman, T. (1997) Butterflies of Britain and Europe. HarperCollins Publishers, London.
- Tolman, T. & Lewington, R. (1998) Die Tagfalter Europas und Nordwestafrikas. Franck-Kosmos-Verlags-GmbH and Co, Stuttgart.
- Tóth, J.P. & Varga, Z. (2011) Inter- and intraspecific variation in the genitalia of the 'Melitaea phoebe group' (Lepidoptera, Nymphalidae). *Zoologischer Anzeiger*, **250**: 258-268.
- Tóth, J.P., Varga, K. Végvári, Zs. & Varga, Z. (2012) Distribution of the Eastern knapweed fritillary (Melitaea ornata Christoph, 1893) (Lepidoptera: Nymphalidae): past, present and future *Journal of insect conservation* DOI 10.1007/s10841-012-9503-2
- Urbahn, E. (1952) Unterschiede der Jugendstände von *M. athalia* und *M. parthenie* in Deutschland. *Zeitschrift der Wiener Entomologischen Gesellschaft*, **37**: 105-121.
- Vandewoestijne, S. & Baguette, M. (2002) The genetic structure of endangered populations in the Cranberry Fritillary, *Boloria aquilonaris* (Lepidoptera, Nymphalidae): RAPDs vs allozymes. *Heredity*, **89**: 439-445.
- Van Swaay, C. & Warren, M. (1999) Red Data book of European butterflies (Rhopalocera). Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Van Swaay, C., Warren, M.S. & Lois, G. (2006) Biotope use and trends of European butterflies. *Journal of Insect Conservation*. **10**: 189-209
- Van Swaay, C., Cuttelod, A., Collins, S., Maes, D., Munguira, M.L., Sasic, M., Settele, J., Verovnik, R., Verstrael, T., Warren, M., Wiemers, M. & Wynhoff, I. (2010) European Red List of Butterflies. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Varga, Z. (1967) A *Melitaea phoebe* délkelet-európai populációinak taxonómiai elemzése, két új alfaj leírásával. *Acta biologica Debrecina*, **5**: 119-137.

- Via, S. (1999) Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution*, **53**: 1446-1457.
- Vila, M., Lundhagen, A.C., Thuman, K.A., Stone, J.R. & Bjorklund, M. (2006) A new conservation unit in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae) as revealed by nuclear and mitochondrial markers. *Annales Zoologici Fennici*, **43**: 72-79.
- Wahlberg, N. (1998) The life history and ecology of *Euphydryas maturna* (Nymphalidae: Melitaeini) in Finland. *Nota Lepidopterologica*, **21**: 154-169.
- Wahlberg, N. (2000) Comparative descriptions of the immature stages and ecology of five Finnish melitaeine butterfly species (Lepidoptera : Nymphalidae). *Entomologica Fennica*, **11**: 167-174.
- Wahlberg, N. (2001) The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera : Nymphalidae). *Evolution*, **55**: 522-537.
- Wahlberg, N. & Zimmermann, M. (2000) Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera : Nymphalidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Cladistics*, **16**: 347-363.
- Waples, R.S. (1991) Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of "species" under the Endangered Species Act. Marine Fisheries. *Marine Fisheries Review*, **53**: 11-22.
- Warren, M.S. (1987a) The Ecology and Conservation of the Heath Fritillary Butterfly, *Mellicta athalia*. I. Host Selection and Phenology. *Journal of Applied Ecology*, **24**: 467-482.
- Warren, M.S. (1987b) The Ecology and Conservation of the Heath Fritillary Butterfly, *Mellicta athalia*. II. Adult Population Structure and Mobility. *Journal of Applied Ecology*, **24**: 483-498.
- Warren, M.S. (1987c) The Ecology and Conservation of the Heath Fritillary Butterfly, *Mellicta athalia*. III. Population Dynamics and the Effect of Habitat Management. *Journal of Applied Ecology*, **24**: 499-513.
- Watts, P.C., Rouquette, J.R., Saccheri, J., Kemp, S.J. & Thompson, D.J. (2004) Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. *Molecular Ecology*, **13**: 2931-2945.
- Weibull, A.C., Bengtsson, J. & Nohlgren, E. (2000) Diversity of butterflies in the agricultural landscape: the role of farming system and landscape heterogeneity. *Ecography*, **23**: 743-750.

-
- Weidemann, H.-J. (1988) Tagfalter: Biologie, Ökologie, Biotopschutz. Verlag J. Neumann-Neudamm GmbH and Co. KG, Melsungen, Germany.
- Weidemann, H.-J. (1995) Tagfalter: Beobachten, Bestimmen. Naturbuch Verlag, Augsburg.
- Weir, B.S. (1996) Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland.
- Wright, S. (1968) Evolution and the genetics of populations. Vol.1. Genetic and biometric foundations. University of Chicago Press Chicago.
- Wright, S. (1978) Evolution and the Genetics of Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Wynhoff, I. (2001) At home in foreign meadows. The reintroduction of two *Maculinea* butterfly species. PhD Thesis, Wageningen Universiteit.
- Zhang, D.X. (2004) Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**: 507-509.
- Zink, R.M. (2004) The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **271**: 561-564.

12. PUBLIKÁCIÓS LISTA

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK:

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:

- Bereczki, 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., Bereczki, 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): 7-103 (IF: 0,564)

Előadások (nemzetközi):

- Pecsénye, K., Bereczki, 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., Bereczki, 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., Bereczki, 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., Rákosy 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 szerkezetének 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* és 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 Természettudományi Múzeum, Budapest, pp. 241-260.

FÜGGELÉK

1. függelék: A *Mellicta* subgenus három vizsgált faja és élőhelyük.



Melitaea athalia
(Fotó: Dr. Varga Zoltán)



Melitaea aurelia
(Fotó: Dr. Varga Zoltán)



Melitaea britomartis
(Fotó: Dr. Varga Zoltán)



Élőhely: Tereszténye
(Fotó: Dr. Varga Zoltán)



Élőhely: Bátorliget
(Fotó: Dr. Varga Zoltán)



Csoportos előfordulás
(Fotó: Dr. Varga Zoltán)

2. függelék: A *Mellicta* subgenus fajai Magyarországon.

	Nemzedék	Általános elterjedés	Magyarországi elterjedés	Élőhely	Repülési idő	Lárvális tápnövény
<i>Melitaea athalia</i>	monovoltin	Euro-Szibéria	az Alföld középső részén kívül egész Mo.-on	száraz és félszáraz rétek, erdőszegélyek, tisztások	május vége-augusztus közepe	különböző <i>Scrophulariaceae</i> , pl.: <i>Veronica</i> , <i>Melampyrum</i> , <i>Rhinanthus</i> , <i>Plantago</i>
	bivoltin	Közép- és Észak-Európa	a síkságok peremvidékein	mocsaras rétek és tisztások	május közepe-június közepe és július vége augusztus vége	különböző <i>Scrophulariaceae</i> , pl.: <i>Veronica</i> , <i>Melampyrum</i> , <i>Rhinanthus</i>
<i>Melitaea britomartis</i>	monovoltin	Euro-Szibéria	főleg a középhegységekben, lokálisan	száraz és félszáraz rétek, erdőszegélyek, tisztások	június közepe-augusztus eleje	különböző <i>Scrophulariaceae</i> , de főleg <i>Veronica austriaca</i> , <i>V. teucrium</i> , kérdéses: <i>Melampyrum</i>
<i>Melitaea aurelia</i>	monovoltin	Európa, Nyugat-Ázsia	főleg a középhegységekben, lokálisan	száraz és félszáraz mozaikos gyepek, tisztások, tisztások	május vége-június vége	főleg <i>Plantago</i> , esetleg némely <i>Scrophulariaceae</i> is

3. függelék: Az enzimpolimorfizmus vizsgálatokhoz felhasznált minták.

Fajok	Gyűjtőhely	Régió	Egyedszám (N)
<i>Melitaea athalia</i> 1.	Tohonya-völgy	Karszt	115
	Szőlőhegy	Karszt	20
	Csákvár	Vértes	52
	Sárd	Erdély	15
	Válaszút	Erdély	12
<i>Melitaea athalia</i> 2.	Lónyai erdő	Bereg	13
	Bockereki erdő	Bereg	46
	Fülesd	Bereg	21
	Kaszonyi-hegy	Bereg	12
	Fényi erdő (Önböly)	Nyírség	52
	Fényi erdő (határszél)	Nyírség	46
	Kétvölgy	Őrség	61
	Apátistvánfalva	Őrség	24
Szomoróc	Őrség	26	
<i>Melitaea britomartis</i>	Tohonya-völgy	Karszt	116
	Szőlőhegy	Karszt	23
	Teresztenye	Karszt	13
	Csákvár	Vértes	25
<i>Melitaea aurelia</i>	Dénes-töbör	Karszt	20
	Szőlőhegy	Karszt	15
	Válaszút	Erdély	47
Összesen:			774

4. függelék: A homogenizáló oldat összetétele.

Homogenizáló oldat (50 ml)	
Tris (0,5M, pH=7,5)	1 ml
Szacharóz	5 ml
Bróm-fenolkék	40 mg
EDTA (0,1M, pH=8,0)	0,5 ml
Ditiotreitol	1 mg/ml

5. függelék: Pufferrendszerek.

Puffer- rendszerek	1	2	3	4a	4b
Gélpuffer	0,3 M Tris pH=8,9	0,02 M Tris 0,0005 M EDTA 0,02 M Hisztidin pH=6,2	0,0675 M Tris 0,0225 M Citromsav pH=7,1	0,2 M Tris 0,26 M Bórsav 0,0064 M EDTA pH=8,0	0,05M Tris 0,095 M Bórsav 0,008 M EDTA pH=8,0
Elektroforézis puffer	0,005 M Tris 0,038 M Glicin pH=8,3	0,14 M Tris 0,05 M Citromsav pH=7,0	0,09 M Tris 0,03 M Citromsav pH=7,1	0,05M Tris 0,065 M Bórsav 0,0016 M EDTA pH=8,0	0,05M Tris 0,065 M Bórsav 0,0016 M EDTA pH=8,0
Futási feltételek	240 V 90 mA 2,5 h	120 V 60 mA 6 h	170 V 110 mA 5 h	200 V 90 mA 3 h	200 V 90 mA 3 h
Enzimek	AOX, HK- SOD, PGI,	IDH, MDH	ME, G6PDH, 6PGDH	EST, α GPDH, PGM, GOT	ACON

6. függelék: Festékek.

Enzimek	0,5% agaróz	Pufferek	Ionok	Szubsztrátok	Oldatban használt enzimek	Kofaktorok	Festékek
ACON	+	0,1 M Tris pH=8	10 mM MgCl ₂	30 mM <i>cisz</i> -akonitsav	0,1 U/ml IDH	1,3 mM NADP	0,5 mM MTT 0,1 mM PMS
AOX		0,1 M Tris pH=8 2 mM EDTA	14 mM KCl	190 mM benzaldehyd			0,15 mM NBT 0,02 mM PMS
EST	+	0,075 M Tris pH=7		4 mM α -naftilacetát 4 mM β -naftilacetát			3 mM Fast Blue RR
6PGDH		0,18M Tris pH=8	10 mM MgCl ₂	6-foszfoglükonát		0,3 mM NADP	0,25 mM NBT 0,05 mM PMS
G6PDH	+	0,18 M Tris pH=8 2 mM EDTA	10 mM MgCl ₂	6 mM D-glükóz-6-foszfát		0,25 mM NADP	0,25 mM NBT 0,05 mM PMS
GOT	+	0,15 M Tris pH=8		72 mM D/L-aszparginsav 12 mM α -ketoglutársav		0,7 mM piridoxál-5-foszfát	3 mM Fast Blue BB
GPDH	+	0,12 M Tris pH=7	8 mM KCN	10 mM D/L- α -glicerofoszfát		0,7 mM NAD	0,3 mM NBT 0,03 mM PMS
HK-SOD	+	0,05 M Tris pH=8 3 mM EDTA	16 mM MgCl ₂	22 mM D-glükóz 28 mM D-galaktóz	0,13 U/ml G6PDH	3,6 mM ATP 0,9 mM NADP	0,6 mM NBT 0,16 mM PMS
IDH	+	0,15 M Tris pH=8	15 mM MgCl ₂	7 mM D/L-izocitromsav		0,4 mM NADP	0,3 mM NBT 0,03 mM PMS
MDH	+	0,17 M Tris pH=8 5 mM EDTA		31 mM D/L-almasav		0,8 mM NAD	0,7 mM NBT 0,1 mM PMS

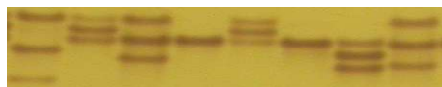
6. függelék: Festékek (folyt.).

Enzimek	0,5% agaróz	Pufferek	Ionok	Szubsztrátok	Oldatban használt enzimek	Kofaktorok	Festékek
ME	+	0,17 M Tris pH=8	41 mM MgCl ₂	9 mM D/L-almasav		0,4 mM NADP	0,4 mM NBT 0,08 mM PMS
PGI	+	0,05 M Tris pH=8	16 mM MgCl ₂	4 mM D-fruktóz-6- foszfát	0,13 U/ml G6PDH	0,8 mM NADP	0,4 mM NBT 0,04 mM PMS
PGM	+	0,05 M Tris pH=8 3 mM EDTA	16 mM MgCl ₂	33 mM α -D-glükóz 1-foszfát	4,3 U/ml G6PDH	1,5 mM NADP	0,8 mM NBT 0,16 mM PMS

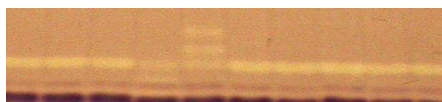
7. függelék: Gélképek.



6 foszfo-glükonát-dehidrogenáz (*6pgdh*)



Foszfo-glükóz-izomeráz (*Pgi*)



Szuperoxid-dizmutáz (*Sod*)



Akonitáz (*Acon*)



Izocitrát-dehidrogenáz (*Idh*)



Malát-dehidrogenáz (*Mdh*)



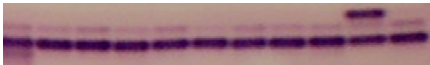
Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (*G6pdh*)



Glutamát-oxálacetát-transzamináz (*Got*)



α -glicerofoszfát-dehidrogenáz (*α Gpdh*)



Hexokináz (*Hk*)



Malik-enzim (*Me*)



Foszfo-glüko-mutáz (*Pgm*)



Észteráz (*Est*)



Aldehyd-oxidáz (*Aox*)

8. függelék: A faktortér tengelyeit meghatározó variancia százalékos megoszlása – *Mellicta* subgenus enzimpolimorfizmus.

Tengely	Sajátérték	% variancia
1	1,07365	60,9840
2	0,416973	23,6850
3	0,10917	6,2010
4	0,036249	2,0590
5	0,025073	1,4242
6	0,022768	1,2933
7	0,013312	0,7561
8	0,010994	0,6245
9	0,009413	0,5347
10	0,007051	0,4005
11	0,006501	0,3693
12	0,00567	0,3221

9. függelék: Az enzimpolimorfizmushoz valamint a morfometriai vizsgálatokhoz felhasznált *M. athalia* minták.

	Gyűjtőhely	Régió	Generációk	Egyedszám (N)		
				genetika	ivarszerv	szárny
<i>M. athalia</i> 1.	Tohonya-völgy	Karszt	-	39	34	34
	Szőlőhegy	Karszt	-	20	10	15
	Csákvár	Vértes	-	52	15	14
	Kolozsvár (Cluj-Napoca) mellett	Erdély	-	27	10	12
<i>M. athalia</i> 2.	Fényi erdő (Ömböly)	Nyírség	I.	52	38	45
	Fényi erdő (határszél)	Nyírség	I.	46	29	35
	Fülesd	Bereg	I.	21	18	12
	Fülesd	Bereg	II.	32	27	22
	Hetefejércse	Bereg	II.	41	29	29
	Kétvölgy	Őrség	II.	24	17	17
	Kétvölgy	Őrség	I.	37	28	25
	Apátistvánfalva	Őrség	I.	24	11	13
	Szomoróc	Őrség	I.	26	16	12
Összesen:				441	282	285

10. függelék: A faktortér tengelyeit meghatározó variancia százalékos megoszlása a főkomponens analízisben—*M. athalia* enzimpolimorfizmus.

Tengely	Sajátérték	% variancia
1	0,186756	49,5610
2	0,05263	13,9670
3	0,031949	8,4787
4	0,028336	7,5197
5	0,017045	4,5235
6	0,015783	4,1883
7	0,013588	3,6059
8	0,009259	2,4571
9	0,007532	1,9989
10	0,006236	1,6549
11	0,004992	1,3247
12	0,002714	0,7203
13	5,84E-32	1,55E-29
14	1,10E-69	2,93E-67

11. függelék: A faktortér tengelyeit meghatározó variancia százalékos megoszlása — *M. athalia* szárnymorfometria.

Tengely	Sajátérték	% variancia
1	1,01643	92,1010
2	0,051311	4,6494
3	0,020503	1,8579
4	0,009802	0,8882
5	0,003651	0,3309
6	0,001267	0,1148
7	0,000279	0,0253
8	0,000237	0,0215
9	5,60E-05	0,0051
10	4,32E-05	0,0039
11	1,69E-05	0,0015
12	1,36E-08	1,24E-06

12. függelék: A faktortér tengelyeit meghatározó variancia százalékos megoszlása – *M. athalia* hímvivarszerv morfometria.

Tengely	Sajátérték	% variancia
1	0,0043	70,0350
2	0,000951	15,4930
3	0,000508	8,2743
4	0,000172	2,8072
5	8,60E-05	1,4000
6	6,46E-05	1,0516
7	3,04E-05	0,4957
8	1,92E-05	0,3129
9	6,43E-06	0,1048
10	1,07E-06	0,0174
11	5,11E-07	0,0083

13. függelék: A diszkriminancia analízis eredményei-földrajzi régiók szerinti osztályozás.

	Tengely	Sajátérték	Canonical R	Wilks' λ	χ^2	df	P
Szárny	1	1,686	0,792	0,256	374,46	60	0,000
	2	0,196	0,405	0,688	102,73	44	0,000
	3	0,143	0,354	0,823	53,52	30	0,005
	4	0,050	0,219	0,941	16,75	18	0,540
	5	0,012	0,108	0,988	3,24	8	0,918
Ivarszerv	1	0,527	0,587	0,393	254,32	55	0,000
	2	0,400	0,534	0,600	139,05	40	0,000
	3	0,110	0,314	0,840	47,40	27	0,009
	4	0,038	0,192	0,932	19,09	16	0,264
	5	0,033	0,178	0,968	8,81	7	0,267

14. függelék: A Levene-féle változók értékei a szárnymorfometria esetében a *M. athalia* két fenológiai típusára vonatkoztatva. **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*.

Szárnyjelleg	M. ath. 1	M. ath. 2	átlag
eh	0,541	0,624	0,582
eosh	0,498	0,457	0,478
hsh	0,482	0,472	0,477
hhsh	0,640	0,421	0,531
<i>átlag 1</i>	0,540	0,494	0,517
β	0,025	0,024	0,025
γ	0,034	0,038	0,036
<i>átlag 2</i>	0,030	0,031	0,030
u	0,086	0,093	0,090
t	0,068	0,073	0,071
<i>átlag 3</i>	0,077	0,083	0,080
sfa	0,158	0,138	0,148
sfb	0,152	0,138	0,145
sfc	0,144	0,157	0,151
sfd	0,128	0,146	0,137
<i>átlag 4</i>	0,145	0,145	0,145
<i>tot. átlag</i>	0,246	0,232	0,239

15. függelék: A Levene-féle változók értékei a szárnymorfometria esetében a földrajzi régiókra vonatkoztatva.

Szárnymorfológusok	Nyirseg	Bereg	Őrség	Karszt	Vértes	Erdély	átlag
eh	0,621	0,674	0,581	0,490	0,692	0,569	0,605
eosh	0,414	0,498	0,471	0,515	0,405	0,536	0,473
hsh	0,499	0,470	0,442	0,459	0,592	0,449	0,485
hhsh	0,450	0,388	0,418	0,807	0,380	0,261	0,451
<i>átlag 1</i>	0,496	0,508	0,478	0,568	0,517	0,454	0,503
β	0,027	0,019	0,025	0,027	0,026	0,019	0,024
γ	0,039	0,036	0,037	0,036	0,032	0,025	0,034
<i>átlag 2</i>	0,033	0,028	0,031	0,032	0,029	0,022	0,029
u	0,097	0,099	0,082	0,097	0,063	0,071	0,085
t	0,080	0,077	0,062	0,077	0,044	0,057	0,066
<i>átlag 3</i>	0,089	0,088	0,072	0,087	0,054	0,064	0,076
sfa	0,147	0,140	0,126	0,159	0,146	0,167	0,147
sfb	0,142	0,149	0,124	0,151	0,145	0,163	0,146
sfc	0,172	0,144	0,151	0,175	0,084	0,091	0,136
sfd	0,163	0,128	0,143	0,149	0,086	0,092	0,127
<i>átlag 4</i>	0,156	0,140	0,136	0,158	0,115	0,128	0,139
<i>tot. átlag</i>	0,238	0,235	0,222	0,262	0,225	0,208	0,232

16. függelék: A Levene-féle változók értékei a szárnymorfometria esetében a keleti-, és nyugati Kárpát-medencére vonatkoztatva.

Szárnnyjelleg	Kelet	Nyugat	átlag
eh	0,603	0,600	0,602
eosh	0,471	0,460	0,466
hsh	0,478	0,468	0,473
hhsh	0,506	0,411	0,458
<i>átlag 1</i>	0,514	0,485	0,500
β	0,024	0,025	0,025
γ	0,037	0,036	0,037
<i>átlag 2</i>	0,031	0,031	0,031
u	0,096	0,079	0,088
t	0,077	0,059	0,068
<i>átlag 3</i>	0,086	0,069	0,078
sfa	0,149	0,130	0,139
sfb	0,147	0,128	0,138
sfc	0,159	0,139	0,149
sfd	0,145	0,133	0,139
<i>átlag 4</i>	0,150	0,132	0,141
<i>tot. átlag</i>	0,241	0,222	0,232

17. függelék: A Levene-féle változók értékei az ivarszervmorfometria esetében a *M. athalia* két fenológiai típusára vonatkoztatva. **M. ath. 1:** egy generációs *M. athalia*; **M. ath. 2:** két generációs *M. athalia*.

Ivarszervjellegek	M. ath. 1	M. ath. 2	átlag
a	0,040	0,045	0,042
b	0,025	0,025	0,025
c	0,012	0,012	0,012
d	0,045	0,043	0,044
e	0,055	0,047	0,051
f	0,043	0,033	0,038
h	0,020	0,024	0,022
i	0,030	0,035	0,032
j	0,028	0,031	0,030
k	0,023	0,029	0,026
m	0,035	0,034	0,034
átlag	0,032	0,033	0,032

18. függelék: A Levene-féle változók értékei az ivarszervmorfometria esetében a földrajzi régiókra vonatkoztatva.

Ivarszervjellegek	Nyírség	Bereg	Őrség	Karszt	Vértés	Erdély	átlag
a	0,051	0,043	0,042	0,039	0,030	0,056	0,043
b	0,028	0,021	0,026	0,025	0,024	0,029	0,025
c	0,012	0,014	0,012	0,012	0,009	0,014	0,012
d	0,046	0,036	0,046	0,043	0,047	0,053	0,045
e	0,051	0,036	0,056	0,051	0,060	0,063	0,053
f	0,033	0,030	0,037	0,038	0,058	0,045	0,040
h	0,026	0,025	0,021	0,020	0,018	0,025	0,023
i	0,036	0,025	0,043	0,028	0,033	0,032	0,033
j	0,034	0,028	0,032	0,029	0,023	0,031	0,029
k	0,032	0,023	0,034	0,026	0,020	0,017	0,025
m	0,033	0,032	0,036	0,032	0,043	0,036	0,035
átlag	0,035	0,028	0,035	0,031	0,033	0,036	0,033

19. függelék: A Levene-féle változók értékei az ivarszervmorfometria esetében a keleti-, és nyugati Kárpát-medence populációira vonatkoztatva.

Ivarszervjelegek	Kelet	Nyugat	átlag
a	0,045	0,040	0,043
b	0,025	0,026	0,025
c	0,013	0,011	0,012
d	0,042	0,046	0,044
e	0,046	0,056	0,051
f	0,033	0,040	0,037
h	0,024	0,021	0,023
i	0,030	0,041	0,036
j	0,031	0,030	0,030
k	0,027	0,031	0,029
m	0,032	0,038	0,035
<i>átlag</i>	0,032	0,035	0,033