



**A genetikai variabilitás szerkezete a
Maculinea alcon-fajcsoport (Lepidoptera:
Lycaenidae) Kárpát-medencei populációiban**

The structure of genetic variation in the Alcon Blue populations
(Lepidoptera: Lycaenidae) in the Carpathian Basin

PhD thesis

Bereczki Judit

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Debrecen, 2008

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben egyre intenzívebben jelentkező antropogén hatások a természetes életterek beszűkülését, feldarabolódását, bizonyos fajok népességeinek méretbeli csökkenését, a populációk fragmentálódását és izolációját eredményezték. Ezek a folyamatok nagymértékben hozzájárultak a veszélyeztetett növény- és állatfajok számának drasztikus növekedéséhez. Ennek következtében a gyakorlati természetvédelem számára kiemelkedő jelentőségűvé váltak a konzervációbiológiai kutatások, melyek egyik fontos részterülete annak a vizsgálata, hogy a veszélyeztetett fajok populációiban milyen evolúciós erők hatnak, és ezek hogyan befolyásolják a populációk genetikai variabilitásának mértékét és szerkezetét. A genetikai diverzitás képezi ugyanis a változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodás alapját, vagyis ez határozza meg az adott populáció evolúciós potenciálját.

A veszélyeztetett fajok közül több is indikátor szerepet tölt be. Ilyenek például a Lycaenidae családba tartozó hangyaboglárka fajok (*Maculinea* van Eecke, 1915), melyek speciális és összetett élőhely igényükkel sok más faj igényeit is megjelenítik. Sajátos életciklusuknak köszönhetően egész Európában veszélyeztetettek illetve védettek. Hernyóik kezdetben a specifikus tápnövény magvaival táplálkoznak, majd obligát módon *Myrmica* Latreille, 1804 hangyafajok fészkeiben fejlődnek. Életmenetükből adódóan populációik erősen ki vannak téve a genetikai sodródás hatásának. Ráadásul az iniciális tápnövény magházában, illetve a hangyafészkekben való fejlődés során intra- és interspecifikus kompetíció is felléphet, így a lárvális stádiumban szelekciós hatások is érvényesülhetnek.

Az élőhely fragmentáció és izoláció miatt Európa-szerte megfigyelhető tendencia a *Maculinea*-fajok népességeinek nagymértékű

csökkenése. A populációik megőrzésére vonatkozó természetvédelmi intézkedéseket csak a rájuk ható folyamatok ismeretében lehet kidolgozni és végrehajtani. A téma tehát nagy konzervációbiológiai és gyakorlati természetvédelmi jelentőséggel bír.

A *Maculinea*-nemzetségnek Európában tradicionálisan öt fajtát különböztetik meg: lápi hangyaboglárka, *Maculinea alcon* [(Denis & Schiffermüller), 1775]; karszti hangyaboglárka, *Maculinea rebeli* (Hirschke, 1904); nagypöttyös hangyaboglárka, *Maculinea arion* (Linnaeus, 1758); vérfű vagy kispöttyös hangyaboglárka, *Maculinea teleius* (Bergsträsser, 1779); zanót vagy sötét hangyaboglárka, *Maculinea nausithous* (Bergsträsser, 1779). Mivel a *M. alcon* és *M. rebeli* külső morfológiai és ivarszervi jellegei is átmeneteket mutatnak, így az iniciális tápnövény- illetve hangyagazda-használatra alapozott tradicionális faji megkülönböztetés taxonómiai jellegű kérdéseket is felvet.

Vizsgálataim során tehát a *Maculinea alcon*-fajcsoport Kárpát-medencei populációiban tanulmányoztam a genetikai variabilitás szerkezetét, és következtetéseket vontam le a tapasztalt mintázat háttérében álló lehetséges mikroevolúciós folyamatokról. Ugyanakkor arra is kerestem a választ, hogy a kapott eredmények megerősítik-e a hagyományos taxonómiai beosztást a *Maculinea alcon*-fajcsoport esetében.

Dolgozatom négy fő témakörének legfontosabb kérdései.

(i) Van-e elkülönülés a különböző tápnövényeket használó populációk között, illetve van-e a differenciálódásnak földrajzi mintázata a Kárpát-medence nagy régióit tekintve?

(ii) Elkülönülnek-e egymástól kisebb földrajzi léptékben az *alcon*- illetve a *rebeli*-típusú populációk, valamint milyen mértékű a genetikai differenciálódás a földrajzi alrégiók között?

(iii) Milyen a differenciálódás térbeli és időbeli mintázata a különböző típusú tápnövényeket használó populációk esetében?

(iv) Van-e különbség a genetikai variabilitás mértékében két eltérő méretű, de ugyanazt a tápnövényt használó populáció között?

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Minták

Vizsgálataimhoz 1999 és 2005 között 50 mintát gyűjtöttünk Közép-Európa öt nagy földrajzi régiójának 27 populációjából, melyek közül 13 populáció egyedei a *G. pneumonanthe* L.-t (*M.alcon*), 14 pedig a *G. cruciata* L.-t (*M.rebeli*) használják iniciális tápnövényként.

2.2. Enzimpolimorfizmus vizsgálatok

Poliakrilamid gélelektroforézis segítségével 16 különböző enzimlokuszt vizsgáltam meg (*Acon*, *Acph*, *Aox*, *Est*, *Gdh*, *Got1*, *Got2*, *G6pdh*, *Gpdh*, *Hk*, *Idh*, *Mdh*, *Me*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod*).

Az elektroforézis a töltéssel rendelkező molekuláknak elektromos erőterben való elmozdulásán alapuló elválasztástechnikai eljárás, melynek során a különböző méretű és töltésű fehérjék vándorlási sebességük alapján különülnek el. A gélelektroforézist követően a vizsgált lokuszok által meghatározott allélikus enzimváltozatok specifikus hisztokémiai eljárások révén megfesthetők, így a géntermékek közvetlenül vizsgálhatók. Az enzimmintázat alapján meg lehet határozni a populációk genotípus- és

allélgyakoriságait. Ezeknek az ismeretében egyrészt a variabilitás mértékét jellemző paraméterek számolhatók, másrészt különböző statisztikai módszerek és az azoknak megfelelő programcsomagok segítségével a variabilitás szerkezetét is elemezhetjük.

2.3. Statisztikai analízisek

A variabilitás mértékének megállapítása céljából meghatároztam a polimorfizmus mutatóit: lokuszonkénti átlagos allélszám (n_A), polimorf lokuszok aránya (P), átlagos heterozigóta gyakoriság (H), multilokusz genotípusok átlagos száma (G). Az egyes populációkra, földrajzi régiókra és alrégiókra vonatkoztatva kiszámoltam az összállélszámot, illetve a különböző gyakoriságú allélok megoszlását.

A genetikai variancia megoszlását F-statisztika segítségével elemeztem, melynek során három indexet számítottam ki: a populáció teljes genetikai varianciáját jellemző F_{IT} -t, a populáción belüli variancia komponenst reprezentáló F_{IS} -t, és a populációk közötti komponenst jellemző fixációs indexet (F_{ST}).

A populációk differenciálódásának megállapítására Fisher-féle exakt tesztet végeztem, valamint megállapítottam a differenciálódás különböző mérőszámait (fixációs index (F_{ST}), Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok átlaga (D), privát allélok gyakorisága (q), allélgyakoriságok szórása (s_p)).

Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA) segítségével a teljes genetikai varianciát komplex módon analizáltam: felosztottam mintákon belüli, populációkon belüli – minták közötti, populációk közötti (taxonon illetve földrajzi (al)régióon belüli, valamint taxonok illetve földrajzi (al)régiók közötti) komponensekre.

A populációk közötti Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok mátrixa alapján UPGMA dendrogramokat szerkesztettem.

A populációk allélgyakoriságai alapján főkomponens analízist végeztem, amelynek során azt vizsgáltam, hogy a populációk mennyire különböznek el egymástól a változók redukált terében.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Tápnövény és földrajzi régiók szerinti differenciálódás

A *Maculineaalcon*-fajcsoporton belül a *M.alcon* és a *M.rebeli* taxonómiai különválasztását elsősorban ökológiai bélyegekre (élőhely, iniciális tápnövény, hangyagazda) alapozzák. Morfológiai tulajdonságaik a szárnyakat illetve az ivarszerveket illetően átfedők, valamint az iniciális tápnövény-használat és a külső morfológiai jellegek is gyakran ellentmondóak. Első lépésben tehát azt vizsgáltam meg, hogy a genetikai adatok megerősítik-e a korábbi faji elkülönítést, vagy ellenkezőleg, a faji differenciálódás hiányát valószínűsítik.

A *Maculinea*-fajokra általánosságban jellemző az életmenetből adódó nagymértékű sztochaszticitás, populációikban tehát erős genetikai sodródásra lehet számítani. Ez viszont magas szintű differenciálódáshoz vezethet abban az esetben, ha azt a migráció következtében fellépő génáramlás nem tudja ellensúlyozni. A variabilitás földrajzi mintázatának kialakulása is alapvetően a genetikai differenciálódás és a génáramlás intenzitásától függ. Ha a közeli populációk között (pl. egy földrajzi régióon belül) a génáramlás hatása erősebb, mint a távoli populációk között (pl. különböző földrajzi régiók között), akkor a variancia földrajzi mintázatot mutathat. Ha egy populációrendszerben a drift hatása erős, és ha a migráció általi génáramlás nem tudja ellensúlyozni a genetikai sodródás

következtében létrejött nagymértékű genetikai differenciálódást, akkor az eltérés még az egymáshoz viszonylag közeli populációk között is jelentős mértékű lesz. Ebben az esetben tehát a genetikai variancia nem fog földrajzi mintázatot mutatni. Második lépésben tehát arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a *Maculineaalcon*-fajcsoport esetében a genetikai variabilitásnak van-e földrajzi mintázata a Kárpát-medence nagy földrajzi régióit tekintve.

A genetikai variabilitás szintje a *Maculineaalcon*-fajcsoport esetében alacsonyabbnak bizonyult más vizsgált boglárkalepke fajokhoz képest. Az *alcon*- illetve a *rebeli*-típusú populációk között nem mutatkozott faji szintű elkülönülés egyik statisztikai analízis során sem. Hasonló eredményt kaptak mitokondriális és nukleáris gének szekvencia analízise, valamint morfológiai és ökológiai karakterek elemzése révén is. Eredményeim alapján az is nyilvánvalóvá vált, hogy a *Maculineaalcon*-fajcsoport populációiból származó minták nagymértékben elkülönülnek egymástól. A minták közötti különbségek egy része az egymást követő generációk közötti különbségekből adódott, ami a genetikai sodródás hatásának és a generációnként fellépő, ismétlődő palacknyak-effektusoknak tulajdonítható. A fluktuáló 'bottle-neck'-ek sztochasztikus változásokhoz vezethetnek a populációk allélfrekvenciáiban, amit csak részben tud kompenzálni a populációk közötti génáramlás még egy földrajzi régióon belül is. Ezek a folyamatok eredményezhetik az egyértelmű trend hiányát a nagy földrajzi régiók differenciálódását illetően.

3.2. Tápnövény és földrajzi alrégiók szerinti differenciálódás a *Maculineaalcon*-fajcsoport észak-magyarországi populációiban

Miután a *Maculineaalcon*-fajcsoporton belül nem tudtam kimutatni sem faji szintű, sem egyértelmű regionális elkülönülést, ezért szükségesnek

tartottam tovább elemezni a differenciálódás mintázatát kisebb földrajzi léptékben is.

A *Maculinea*-fajok életmenetéből adódó nagymértékű sztochaszticitás eredménye a populációk közötti erős differenciálódás, ami abban az esetben vezet egyértelmű szubrégiós tagolódáshoz, ha egy alrégióon belül a populációk között intenzív a migráció általi génáramlás. Ha a génáramlás nem tudja ellensúlyozni a differenciálódást, akkor egy alrégióon belül is nagy különbségek lesznek a populációk között, vagyis a variabilitás nem fog földrajzi mintázatot mutatni.

Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy kisebb földrajzi léptékben (azaz a Kárpát-medence egy földrajzi régiójában) elkülönülnek-e egymástól az *alcon*- illetve a *rebeli*-típusú populációk, valamint hogy van-e a minták között egyértelmű szubrégiós differenciálódás. Ezért az észak-magyarországi régióból származó mintákat részletes analízisnek vettem alá.

Az *alcon*- és a *rebeli*-típusú populációk között kisebb földrajzi léptékben sem tudtam kimutatni faji szintű differenciálódást. A statisztikai analízisek eredményei azt is mutatták, hogy a *Maculineaalcon*-fajcsoport populációi között kisebb földrajzi léptékben is viszonylag nagymértékű az elkülönülés, ugyanakkor az alrégiók közötti differenciálódás egyértelműen kimutatható volt néhány esetben: a Szatmári-síki és a mátrai minták egyértelműen elkülönültek a másik három, egymással átfedésben levő szubrégió (Zempléni-hegység, Bükk hegység, Aggteleki-karszt) mintáitól. Ez utóbbi alrégiókon belül valószínűleg nem olyan erős a génáramlás, hogy világos szubrégiós mintázat jöjjön létre, illetve lehetséges, hogy a lokális adaptáció hasonló genetikai struktúrát eredményezett a három, sok tekintetben hasonló alrégióban. Nem vethetjük el azonban azt a feltételezést

sem, hogy a szubrégiók genetikai struktúrájában mutatkozó hasonlóság egyszerűen véletlen események eredménye.

3.3. A genetikai variabilitás térbeli és időbeli szerkezete a *Maculineaalcon*-fajcsoport észak-magyarországi populációiban

A továbbiakban szükségesnek tartottam a *Maculinea*-populációkban ható genetikai sodródás illetve szelekció térbeli és időbeli dinamikájának részletesebb feltárását. Vizsgálataim során egyrészt az észak-magyarországi régió bükki és zempléni alrégiójának egymáshoz közel elhelyezkedő populációiban, másrészt ugyanazon populáció különböző generációinak mintáiban hasonlítottam össze a genetikai differenciálódás szintjét. Azért ezt a két alrégiót választottam, mert az előző vizsgálatok azt mutatták, hogy a bükki és a zempléni szubrégiók mintáinak genetikai összetétele részleges átfedésben van egymással.

Az elkülönülés mértéke az egymás közelében elhelyezkedő populációk között a migráció általi génáramlás és a genetikai differenciálódás egyensúlyától függ. A populációk közötti differenciálódást azonban nemcsak sztochasztikus hatások, hanem a diverzifikáló szelekció is előidézhetheti. A *Maculineaalcon* populációi között magas szintű differenciálódást tapasztaltam, melynek kialakításában mindkét hatásnak szerepe lehet. Amennyiben a differenciálódás elsődlegesen a sztochasztikus hatások, vagyis a speciális életciklusból adódó, generációnként fellépő ismétlődő palacknyak-hatás következménye, akkor azt várjuk, hogy mind a populáción belül, a különböző évekből (generációkból), mind pedig a különböző populációkból származó minták között jelentős mértékű lesz a differenciálódás. Ha viszont a differenciálódás elsődlegesen a diverzifikáló szelekció hatására vezethető vissza, vagyis a lokális adaptáció következményeként lép fel, akkor a különböző populációk között jelentős,

míg az egy populáció különböző generációiból származó minták között jóval kisebb mértékű differenciálódást várunk.

A Bükk-fennsíki populáció kivételével mindkét alrégió populációiban a minták közötti teljes differenciálódás jelentős hányadát tette ki a generációk közötti különbség, azaz számottevő volt a genetikai differenciálódás időbeli komponense. Ez arra utal, hogy a *M. alcon* vizsgált populációi esetében a magas szintű differenciálódás elsődlegesen nem a diverzifikáló szelekcióra, hanem a speciális életciklusból adódó sztochasztikus hatásokra vezethető vissza. Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy a differenciálódás térbeli és időbeli komponenseinek megoszlása nem volt azonos a két alrégióban, de nem is várhatunk hasonló tér-idő mintázatot, ha a jelenség hátterében a genetikai sodródás áll.

3.4. A genetikai variabilitás szintjének összehasonlítása két ugyanazt a tápnövényt használó, de eltérő méretű populációban

Az eddigiekben több szempontból megvizsgáltam a drift következményeit. A továbbiakban azt elemeztem, hogy a fentiekben túlmenően befolyásolja-e a populációméret a genetikai sodródásnak a polimorfizmus szintjére és mintázatára kifejtett hatását. Általában azt várjuk, hogy a genetikai variabilitás a kis populációkban alacsony, a nagy populációkban pedig magas szintű lesz. Megvizsgáltam, hogy teljesül-e ez a várakozás egy olyan faj esetében is, amelynek populációi egyébként is erős drift hatásnak vannak kitéve. Ezért kiválasztottam két különböző méretű *M. alcon*-populációt (Bükk-fennsíki kicsi és tohonya-völgyi nagy), melyekben összehasonlítottam a genetikai variabilitás mérőszámait. Ezzel párhuzamosan tanulmányoztam a polimorfizmus szintjének időbeli változását is.

Az eltérő nagyságú Bükk-fennsíki és tohonya-völgyi populációban a polimorfizmus szintje egyaránt mérsékeltnak bizonyult. Az eredmények azt mutatták, hogy a lecsökkent méretű Bükk-fennsíki populáció variabilitása alacsonyabb szintű, mint a relatíve nagyobb méretű, aktív természetvédelmi kezeléssel stabilizált tohonya-völgyié. Úgy tűnik tehát, hogy a *M.alcon* obligát mirmekofil életmódjából adódó erős sztochasztikus hatások mellett is kimutatható a kis populációkban fellépő drift hatás következménye. Ugyanakkor a generációk közötti eltérések mértékét illetően nem tudtam egyértelmű különbséget kimutatni a két populáció között. Eredményeim alapján tehát elmondható, hogy a kis populációkban fellépő intenzív genetikai sodródás hatását elsősorban a variabilitás szintjében fellépő változás kapcsán figyeltem meg.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *Maculineaalcon*-fajcsoport populációiban mérsékelt szintű polimorfizmust tapasztaltam, amely alacsonyabbnak bizonyult más vizsgált boglárkalepke fajokhoz képest.

2. Az *alcon*- illetve a *rebeli*-típusú populációk között nem mutatkozott faji szintű elkülönülés egyik statisztikai analízis során sem.

3. A *Maculineaalcon*-fajcsoport populációiból származó minták nagymértékben elkülönülnek egymástól. A minták közötti teljes differenciálódás egyik része az adott populáció egymást követő generációi közötti, míg másik része a különböző populációk közötti különbségekből adódott.

4. Nem tudtam egyértelmű trendet kimutatni a Kárpát-medence nagy földrajzi régióinak a differenciálódását illetően. Ugyanakkor az észak-

magyarországi régióban az alrégiók közötti differenciálódás egyértelműen kimutatható volt néhány esetben: a Szatmári-síki és a mátrai minták egyértelműen elkülönültek a másik három, egymással átfedésben levő szubrégió (Zempléni-hegység, Bükk hegység, Aggteleki-karszt) mintáitól.

5. A minták közötti teljes genetikai differenciálódás időbeli komponense jelentős mértékű volt mindkét vizsgált szubrégióban. Ez arra utal, hogy a *M.alcon*-populációk közötti differenciálódás háttérben elsősorban a specifikus életmenetből adódó sztochasztikus hatások állnak.

6. A lecsökkent méretű Bükk-fennségi populáció variabilitása alacsonyabb szintű volt, mint a nagyobb egyedszámú és -sűrűségű, aktív természetvédelmi kezeléssel stabilizált tohonya-völgyié. Mindezek alapján megállapítható, hogy a *M.alcon* obligát mirmekofil életmódjából adódó erős sztochasztikus hatások mellett is kimutatható a kis populációkban fellépő drift hatás következménye.

1. INTRODUCTION

It is widely accepted that due to growing anthropogenic influences natural habitats have become critically restricted and fragmented, which in turn has resulted in declining and isolated populations of certain species. These processes contributed to the dramatic increase of the number of threatened plant and animal species. As a consequence, the results of conservation biological research have become significant in practical nature conservation. An important question in this field is what kind of evolutionary effects are at work in threatened populations and how they influence the level and structure of their genetic variation. Such surveys have a great theoretical importance as well, since genetic diversity of natural populations is the basis of adaptation to changing environmental conditions determining their evolutionary potential.

Several of the threatened species are special indicators of habitat changes. *Maculinea* butterflies of the family Lycaenidae are one of them (*Maculinea* van Eecke, 1915), representing the requirements of other species as they live in complex habitats. Owing to their special life cycle they are in decline and endangered throughout Europe. Their caterpillars feed on the seeds of specific food plants and then they develop in *Myrmica* Latreille, 1804 ant nests in an obligate manner. As a consequence of this life cycle their populations are exposed to the effects of genetic drift. In addition, intraspecific and interspecific competition may occur during their development in the capsule of the initial food plant and also in the ant nest and thus they are subjected to selection.

As a result of habitat fragmentation and isolation a significant declining tendency in *Maculinea* populations can be observed in Europe. Conservational measures aiming to protect populations can only be

developed and undertaken successfully when being aware of both ecological and genetic processes affecting populations.

Traditionally, five *Maculinea* species are recognized in Europe: Alcon Blue, *Maculinea alcon* ([Denis & Schiffermüller], 1775); Mountain Alcon Blue, *Maculinea rebeli* (Hirschke, 1904); Large Blue, *Maculinea arion* (Linnaeus, 1758); Scarce Large Blue, *Maculinea teleius* (Bergsträsser, 1779); Dusky Large Blue, *Maculinea nausithous* (Bergsträsser, 1779). Since *M. alcon* and *M. rebeli* are only slightly differentiated morphologically the traditional species distinction is mostly based on the initial food plant and host ant differences between them. This situation brings about taxonomic questions as well.

In my study, I have analysed the genetic structure of the *Maculinea alcon* species group in the Carpathian Basin and tried to deduce the microevolutionary processes giving rise to the observed genetic patterns. I have also aimed at finding whether the results could support the traditional taxonomic distinction of *M. alcon* and *M. rebeli*.

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

(i) Is there any clear differentiation between the populations of the *Maculinea alcon* species group using different initial food plant and host ant species? Is it possible to detect any geographic pattern in the differentiation among the populations of the Carpathian Basin?

(ii) Can we reveal genetic differentiation between the *alcon* and *rebeli* type populations at a smaller geographic scale? Can we find any geographic pattern of genetic variation in Northern Hungary?

(iii) What is the distribution between the spatial and temporal components of genetic differentiation in the populations using different initial food plant and host ant species?

(iv) Can we detect any further effects of genetic drift on the genetic composition of a small population in addition to those attributable to the specific life cycle of Alcon Blues?

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples

Samples were collected from five large regions of Central Europe. Altogether 50 samples were collected from 27 populations between 1999 and 2005.

2.2. Enzyme studies

Allozyme polymorphism was studied at 16 different loci by vertical polyacrylamide gel electrophoresis (*Acon*, *Acph*, *Aox*, *Est*, *Gdh*, *Got1*, *Got2*, *G6pdh*, *Gpdh*, *Hk*, *Idh*, *Mdh*, *Me*, *Pgi*, *Pgm*, *Sod*).

2.3. Statistical analyses

Genotype and allele frequencies were calculated on the basis of banding patterns. Measures of genetic variation (average number of alleles, proportion of polymorphic loci, average observed heterozygosity, and average number of multilocus genotypes) were calculated for each sample.

Genetic differentiation among the populations was first analysed by Wright's F-statistics. In this analysis, the total genetic variation of the samples (F_{IT}) is partitioned into within (F_{IS}) and between population

components (F_{ST}). An exact test of population differentiation was conducted to test for independence of the allelic composition of the populations.

The distribution of the total genetic variation at various levels of the hierarchy was studied by AMOVA. In this analysis, the total genetic variation is partitioned into various components: among groups (i.e. species or geographic regions), among populations within the groups, among samples originating from the same population and within samples.

UPGMA dendrograms were constructed on the basis of Cavalli-Sforza & Edwards arc distances.

In the last part of all studies, we carried out a principal component analysis (PCA) using the allele frequency data of the samples to show the size of overlap in their genetic composition in a reduced space of variables.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Genetic differentiation between the species and among the geographic regions

The distinction between *Maculinea alcon* and *M. rebeli* is traditionally based on their ecological characteristics (i.e. the initial food plant and host ant species). Nonetheless, their morphological traits both on the wings and on the genital appendages are often overlapping. Thus, one of my aims was to investigate whether the genetic data support the separation of the two species.

Maculinea species are greatly exposed to stochastic events owing to their specific life cycle. As a consequence, we can expect the effect of strong genetic drift in their populations, which results in intense differentiation among them. The presence of geographic pattern in genetic variation is basically determined by the interaction between genetic

differentiation and gene flow. If migration is more intense among close populations (i.e. within a geographic region) than among further ones (i.e. among geographic regions) genetic variation will exhibit geographic pattern. When genetic drift is strong it results in a high level of differentiation among the populations, which cannot be completely counterbalanced by gene flow. In this situation, the level of differentiation will be high even among close populations and genetic variation will not display geographic pattern. My aim, therefore, was to analyse the structure of genetic differentiation among the populations of the *Maculineaalcon* species group.

The Alcon Blues proved to be less polymorphic than other lycaenid butterfly species studied. The statistical analyses could not confirm any genetic differentiation between *alcon* and *rebeli* type populations. Similar conclusion was drawn by Als et al. (2004) on the basis of mitochondrial and nuclear DNA sequences and by Pech et al. (2004) using 91 morphological and ecological characters. At the same time it is also obvious that the samples of the Alcon Blue populations exhibited a high level of differentiation. One portion of this between sample differentiation can be explained by the differences among consecutive generations within a population. The higher portion of differentiation was, however, observed among the populations. Fluctuating bottle-neck in every generation may lead to stochastic changes in allele frequencies, which can only partially be counterbalanced by gene flow among the populations. Thus high level of differentiation can be expected even within a geographic region. These processes can account for the lack of evident trends in the differentiation among the geographic regions in the Carpathian Basin.

3.2. Food plant versus geographic differentiation among the Northern Hungarian populations of the *Maculinea alcon* species group

Neither between the two species nor among the large regions of the Carpathian Basin was any clear pattern detectable in the genetic differentiation among the populations of the *Maculinea alcon* species group. Therefore, I found it interesting to analyse the genetic data at a smaller geographic scale.

Owing to the specific life cycle populations of *Maculinea* species are exposed to stochastic events and consequently they are highly differentiated. Nevertheless, gene flow might be intensive enough among the local populations at a small geographic scale (i.e. within a subregion) to balance genetic differentiation. In this way, it is possible that there is a more or less expressed geographic pattern of genetic variation within a region of the Carpathian Basin.

In this part of my work, I was interested in the structure of genetic differentiation among the populations of the *Maculinea alcon* species group in Northern Hungary.

The level of polymorphism in *M. alcon* populations proved to be average in this region as well. There was no differentiation between the *alcon* and *rebeli* type populations at a smaller geographic scale either. The results of the statistical analyses also showed a high level of differentiation among the samples of the Alcon Blue populations at a smaller geographic scale. At the same time, a certain level of differentiation among the subregions could also be observed, e.g. samples of Szatmári-lowlands and Mátra Mountains were clearly differentiated from the three other subregions (Zempléni Mts., Bükk Mts., and Aggtelek Karst). The samples of these latter subregions greatly overlapped with each other indicating that gene flow within them were probably not as strong as to create a clear

subregional pattern. But it is also possible that local adaptation resulted in a comparable genetic structure in these three subregions, as they are fairly similar to each other in many respects. Nevertheless, the assumption that the similarity observed in the genetic structure of these subregions might be the result of coincidence cannot be ignored either.

3.3. The spatial and temporal structure of genetic variation in the Northern Hungarian populations of the *Maculinea alcon* species group

In the next part of my work, I wanted to study the fine structure of genetic differentiation among the populations of the *Maculinea alcon* species group. Accordingly, I analysed several samples collected in consecutive years from two pairs of populations in the Bükk Mts. and Zempléni Mts. I chose these populations as the results of former analyses suggested that the genetic composition of the populations of these two subregions was partly overlapping.

The level of genetic differentiation between two populations depends on the balance between migration and differentiation. Genetic differentiation, however, can be the result of either stochastic effects or diversifying selection. I found a high level of genetic differentiation even among local populations of the *Maculinea alcon* species group, which can be the consequence of either process. If genetic differentiation is the result of stochastic events (i.e. repeated bottle necks in every generation) we expect a similar level of genetic differentiation among samples originating from consecutive generations of a population and among different populations. If genetic differentiation, however, is the consequence of diversifying selection (i.e. it is due to local adaptation) we expect higher level of differentiation among local populations than among samples collected in different generations from the same population.

The results of the analyses indicated that except for the population of Bükk-plateau, a significant part of the total differentiation among the samples can be explained by the differences among the generations within the populations in both subregions, i.e. the temporal component of genetic variation was considerable. It suggests that the high level of differentiation observed in *M. alcon* populations cannot be the consequence of diversifying selection, but it is most probably attributable to stochastic effects resulting from the life cycle of the species. This assumption is also supported by the fact that the distribution of differentiation between the spatial and temporal components is different in the two subregions. In any case, we are not to find a similar spatial-temporal pattern if genetic drift is behind the phenomenon.

3.4. Comparison of genetic variation between two *Maculinea alcon* populations using the same food plant but having different population size

So far I studied several aspects of the genetic consequences of drift. In this part of my work, I aimed at analysing whether the effect of genetic drift observed in small populations can be detected in *Maculinea alcon* populations as well. In general, we expect lower level of genetic variation in small populations compared to large ones. Thus, my goal was to study whether this assumption is also fulfilled in a species basically exposed to strong effect of genetic drift due to its specific life cycle. I have selected two populations with different size (Bükk-plateau and Tohonya-valley being small and large, respectively) where several samples were collected in consecutive generations and compared various parameters of polymorphism in them. At the same time, I also analysed the changes in the level of genetic variation in time in both populations.

The level of polymorphism turned out to be average in both populations analysed. Genetic variation was clearly lower in the declining Bükk-plateau population than that of the relatively larger and stable Tohonya-valley population. In addition to the strong stochastic effects resulting from the obligate myrmecophilous life cycle of *M.alcon* I was able to detect the genetic consequences of small population size in the Bükk-plateau population. At the same time, there was no evident difference in the level of differentiation among the generations between the two populations. Thus it can be concluded that the effect of intensive genetic drift in small populations can primarily be detected in the level of genetic variation.

4. NEW RESULTS AND CONCLUSIONS

1. Samples of the *Maculineaalcon* species group had an moderate level of polymorphism, which proved to be much lower than reported in other lycaenid butterfly species.

2. The genetic differentiation between the *alcon* and *rebeli* type populations was not clear in any statistical analysis.

3. In general, the samples of the Alcon Blue populations exhibited a high level of differentiation. This high differentiation was partly explained by the differences among the samples collected in consecutive generations of a population and partly by the variation among the populations.

4. There was a lack of evident geographic pattern in the differentiation among the large regions of the Carpathian Basin. In the Northern Hungarian region, however, a certain level of differentiation was observed among the subregions: the samples of Szatmári-lowlands and

Mátra Mountains were clearly differentiated from the three other subregions (Zempléni Mts., Bükk Mts., and Aggtelek Karst).

5. The temporal component accounted for a sizeable amount of the total genetic differentiation in both subregions studied. This suggested that the high level of genetic differentiation observed in *M. alcon* populations was mostly due to stochastic events resulted from the specific life cycle of the species.

6. The level of enzyme polymorphism was clearly lower in the small and declining Bükk-plateau population than in the large and stable Tohonya-valley one, indicating that the general effect of genetic drift observed in small populations can be detected in addition to those resulting from the life cycle of the species.

BERECZKI JUDIT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Cikkek

- Berezki, 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(2)**: 157-176. IPF: 1,177
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2006. Geographical versus food plant differentiation in Alcon Blue populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Northern Hungary. *European Journal of Entomology* **103**: 725-732. IPF: 0.782
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2006. A genetikai variabilitás szerkezete a szürkés hangyaboglárka fajcsoport Kárpát-medencei populációiban. *Magyar Tudomány* **6**: 700-704.
- Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Tihanyi, B., Tóth, A., Peregovits, L. & Varga, Z. 2007. Genetic differentiation among the *Maculinea* species (Lepidoptera, Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 11-21. IPF: 2,445

Konferencia kiadványok (proceedings)

- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. Geographical versus food plant differentiation in Alcon Blue populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Northern Hungary. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 159-163.
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. Temporal and spatial structure of genetic variation in the Alcon Blue populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Northern Hungary. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 163-167.

Berezki, J., Pecsénye, K., Peregovits, L. & Varga, Z. 2005. Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 167-171.

Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Tihanyi, B., Tóth, A., Peregovits, L. & Varga, Z. 2005. Genetic differentiation among the *Maculinea* species (Lepidoptera, Lycaenidae) in eastern Central Europe. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Tudományos diákköri dolgozatok

Berezki, J. 2001. Az *Aricia artaxerxes issekutzi* két Kárpát-medencei populációjának összehasonlítása a hím ivarszervek metrikus vizsgálata alapján. OTDK, Budapest.

Berezki, J. 2002. A bükki szerecsenboglárka (*Aricia artaxerxes issekutzi*) két Kárpát-medencei populációjának összehasonlítása a hím ivarszervek és a szárnyak metrikus vizsgálata alapján. OKDK, Veszprém.

Cikkek

Berezki, J., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2004. A morfológiai változatosság szerkezetének időbeli változása az *Aricia artaxerxes issekutzi* (Lepidoptera: Lycaenidae) két Kárpát-medencei populációjában. *Természetvédelmi Közlemények* **11**: 329-336.

Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2006. Egg-laying preferences of the xerophilous ecotype of *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Aggtelek National Park. *European Journal of Entomology* **103**: 587-595. IPF: 0.782

Árnyas, E., Berezki, J., Tóth, A., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2006. A *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) peterakási preferenciájának vizsgálata az Aggteleki Nemzeti Parkban. *Természetvédelmi Közlemények* **13**: 421-430.

- Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A., Varga, K., Pecsénye, K., Tartally, A., Kövics, Gy., Karsa, D. & Varga, Z. 2008. Oviposition behaviour of *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) influenced by food-plant specialized aphids (*Aphis gentianae*) and fungal infection by *Puccinia gentianae* (in press).
- Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Szilágyi, M. & Varga, Z. 2007. High level of genetic variation in *Aricia artaxerxes issekutzii* (Lepidoptera: Lycaenidae) populations in Northern Hungary. *Nota lepidopterologica* **30**: 225-234.

Konferencia kiadványok (proceedings)

- Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. Egg-laying preferences of the xerophilus ecotype of *Maculinea alcon* (= *M. rebeli*; Lepidoptera: Lycaenidae) in the Aggtelek National Park. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 61-64.
- Prondvai, E., Kassai, F., Árnyas, E., Csösz, S., **Berezki, J.**, Tóth, A., Tartally, A., Kiss, J., Peregovits, L. & Varga, Z. 2005. Oviposition in *Maculinea alcon* butterflies. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 82-83.
- Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. Results of the mark-release-recapture studies of a *Maculinea rebeli* in the Aggtelek karst (N Hungary) between 2002-2004. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 111-114.
- Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Tóth, A. & Varga, Z. 2005. The genetic structure of the *Maculinea teleius* populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Hungary. In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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.

Tóth, A., Pecsénye, K., **Berezki, J.** & Varga, Z. 2005. Patterns of genetic differentiation in the Hungarian *Maculinea arion* populations (Lepidoptera, Lycaenidae). In: J. Settele, E. Kühn & J. Thomas (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. 199-203.

Könyvfejezetek

Pecsénye, K., Meglécz, E., Kenyeres, Á., **Berezki, J.** & Varga, Z. 2005. A genetikai variabilitás három nappali lepke faj (*Nymphalidae*) hazai populációiban. In: Jordán F. (szerk.) *A DNS-től a globális felmelegedésig. A 70 éves Vida Gábor köszöntése.* Scientia Kiadó, Budapest, pp. 135-147.

Pecsénye, K., **Berezki, 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.

Egyetemi jegyzetek

Berezki, J. & Nagy, A. 2007. Általános rovarmorfológia. In: Rác, I.A. (szerk.) *Állatrendszertani gyakorlatok.* Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, pp. 85-98.

Berezki, J. 2007. Endopterigota, Paraneoptera (Eumetabola). In: Rác, I.A. (szerk.) *Állatrendszertani gyakorlatok.* Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, pp. 124-147.

Berezki, J. 2007. Dipteroidea (Diptera, Siphonaptera). In: Rác, I.A. (szerk.) *Állatrendszertani gyakorlatok.* Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, pp. 253-268.

Berezki, J. & Varga, Z. 2007. Zootaxonomiai és szisztematikai fogalomgyűjtemény. In: Rác, I.A. (szerk.) *Állatrendszertani gyakorlatok.* Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, pp. 358-387.

Előadások (hazai konferenciák)

- Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Szilágyi, M. & Varga, Z. 2002. Morfológiai és genetikai variabilitás az *Aricia artaxerxes issekutzi* Kárpát-medencei populációiban. I. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Sopron.
- Pecsénye, K., **Berezki, J.** & Varga, Z. 2005. A genetikai variabilitás szerkezete a *Maculinea alcon*-fajcsoportban (Lepidoptera, Lycaenidae). A természetvédelmi biológia frontvonalai, MTA tudományos ülés, Budapest.
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. A genetikai variabilitás szerkezete a *Maculinea alcon*-fajcsoportban (Lepidoptera: Lycaenidae). Biológiai Tanszékcsoport Napja, Debrecen.

Előadások (nemzetközi konferenciák)

- Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Szilágyi, M. & Varga, Z. 2002. Structure of variation in Hungarian populations of *Aricia artaxerxes issekutzi*: Genetic and morphometric analysis. Fourth International Conference on the Biology of Burtterflies, Leiden.
- Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Tihanyi, B., Tóth, A. & Varga, Z. 2004. Results on the allozyme polymorphism and population structure in *M. alcon-rebeli*, *M. teleius* and *M. arion*. MacMan Midterm Conference, Budapest.
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2004. Geographical *versus* Food plant Differentiation in Alcon Blue Populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Northern Hungary. 38th Population Genetics Group Meeting, Reading.
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. Geographical *versus* Food plant Differentiation in Alcon Blue Populations (Lepidoptera, Lycaenidae) in Northern Hungary. MacMan Conference, Laufen.
- Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. Temporal and spatial structure of genetic variation in the Alcon Blue (Lepidoptera, Lycaenidae) populations in Northern Hungary. MacMan Conference, Laufen.

Pecsénye, K., **Berezki, J.**, Tóth, A. & Varga, Z. 2005. The genetic structure of the *Maculinea teleius* populations in Hungary. MacMan Conference, Leipzig.

Posztterek (hazai konferenciák)

Berezki, J., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2002. A morfológiai változatosság szerkezetének időbeli változása az *Aricia artaxerxes issekutzi* két Kárpát-medencei populációjában. I. Kvantitatív Ökológiai Szimpózium, Debrecen.

Berezki, J., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2002. Hogyan változott a morfológiai változatosság az utóbbi 20 évben az *Aricia artaxerxes issekutzi* két Kárpát-medencei populációjában? I. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Sopron.

Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2005. A *Maculineaalcon* peterakási preferenciájának vizsgálata az Aggteleki Nemzeti Parkban. III. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Eger.

Posztterek (nemzetközi konferenciák)

Berezki, J., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2002. Morphometric survey of 6 populations of the *Maculineaalcon-rebeli* species group from E Hungary and Transylvania. MacMan Project Meeting, Leipzig.

Berezki, J., Pecsénye, K. & Varga, Z. 2004. Allozyme variability of *Maculineaalcon/rebeli* populations in Hungary and surrounding areas (data from 2003). MacMan Midterm Conference, Budapest.

Tóth, A., **Berezki, J.**, Pecsénye, K. & Varga, Z. 2004. Allozyme variability of *Maculinea arion* populations (data from 2002-2003). MacMan Midterm Conference, Budapest.

Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A. & Varga, Z. 2003. Structure and dynamics of a population of *Maculinea rebeli xerophila* in the Aggtelek National Park. MacMan Midterm Conference, Budapest.

Árnyas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A. & Varga, Z. 2005. The results of the mark-release-recapture studies of the Tohonya valley population of *Maculinea rebeli xerophila* between 2002-2004. MacMan Conference, Laufen.

- Prondvai, E., Kassai, F., Árnas, E., Csősz, S., **Berezki, J.**, Tóth, A., Tartally, A., Kiss, J., Peregovits, L. & Varga, Z. 2005. Oviposition in *Maculinea alcon* butterflies. XXIX. Ethological Conference, Budapest.
- Pecsenye, K., **Berezki, J.**, Tihanyi, B., Tóth, A., Peregovits, L. & Varga, Z. 2005. Genetic differentiation among the *Maculinea* species (Lepidoptera, Lycaenidae) in eastern Central Europe. SEL, Róma.
- Tóth, A., Pecsenye, K., **Berezki, J.** & Varga, Z. 2005. Pattern of genetic differentiation in the Hungarian *Maculinea arion* populations. MacMan Conference, Leipzig.
- Berezki, J.**, Pecsenye, K. & Varga, Z. 2006. Spatial and temporal dynamics of genetic variation in the Alcon Blue populations in Northern Hungary. 1st European Congress of Conservation Biology, Eger.
- Pecsenye, K., **Berezki, J.**, Tóth, A., Peregovits, L. & Varga, Z. 2006. How many evolutionary significant units are in the *Maculinea* genus in Hungary. 1st European Congress of Conservation Biology, Eger.
- Tóth, A., Pecsenye, K., **Berezki, J.** & Varga, Z. 2006. Are there cryptic subspecies in *Maculinea arion* in Hungary? 1st European Congress of Conservation Biology, Eger.
- Árnas, E., **Berezki, J.**, Tóth, A., Pecsenye, K. & Varga, Z. 2006. Egg-laying preferences of the xerophilous ecotype of *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in the Aggtelek National Park. 1st European Congress of Conservation Biology, Eger.