

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Palacknyak hatás az *Arícia artaxerxes issekutzi* (Lepidoptera: Lycaenidae) észak-magyarországi populációiban

Szerző: RácZ Rita

Biológus MSc II. évfolyam

Témavezető: Dr. Pecsénye Katalin

Dr. Bereczki Judit

Debrecen

2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. A palacknyak hatás következményei és kimutatása.....	3
1.2. A bükki szerecsenboglárka – <i>Arícia artaxerxes issekutzi</i> (Balogh, 1956).....	4
1.3. Célkitűzés	5
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	6
2.1. A minták származási helye.....	6
2.2. Enzimvizsgálatok	7
2.3. Statisztikai módszerek.....	7
3. EREDMÉNYEK	8
4. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	19
5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	22
6. IRODALOMJEGYZÉK.....	23
7. FÜGGELÉK.....	26

1. BEVEZETÉS

1.1. A palacknyak hatás következményei és kimutatása

A genetikai variabilitás nagyon fontos komponense a populációk hosszú távú fennmaradásának (England és mtsai 2003; Nyström és mtsai 2006). Az élőhely fragmentáció a populációk kisebb alegységekre esését, illetve azok egymástól való izolálódását eredményezi, így csökkentve az effektív populációméretet (Thomas és mtsai 1998). Azonban egy ilyen demográfiai változás, azaz az egyedszám drasztikus visszaesése a genetikai variabilitásra negatív hatással van, annak mértékét jelentősen csökkenti, hiszen az eredeti populáció ritka alléljai nagyon kis eséllyel maradnak fenn az utódpopulációban. Ráadásul egy kevés egyedből álló populációban az allélfixálódás is sokkal gyorsabb ütemben megy végbe (Frankham és mtsai 2002; Allendorf és Luikart 2006). Azonban a csökkent genetikai diverzitás a populáció fitnessét is befolyásolja (Lacy 1997; Amos és Balmford 2001; Larson és mtsai 2002), hatására a populáció környezethez való alkalmazkodóképessége szintén csökken. Éppen ezért fontos, főleg veszélyeztetett fajok esetében, hogy kellő információ legyen birtokunkban a genetikai variabilitásról, hogy lépéseket tudjunk tenni a faj megőrzése érdekében. A populációk jelen genetikai adatainak felhasználásával az előbbieken vázolt tendenciák alapján tehát következtetni tudunk arra, hogy a múltban történt-e drasztikus demográfiai csökkenés a vizsgált populáció(k)ban. A palacknyak hatás következtében ugyanis a populációban átmenetileg nagyobb heterozigóta gyakoriság mérhető, mint azt a lokuszonkénti allélszám alapján várnánk, mutáció-drift egyensúlyt feltételezve (Cornuet és Luikart 1996). Ráadásul az allélgyakorisági osztályok (0-0,1; 0,1-0,2;...0,9-0) aránya is jelentősen megváltozik. Egy palacknyak hatással sújtott populáció esetében: a ritka allélok (0-0,1) gyakorisága lecsökken az elméletileg várhatóhoz képest, míg a közepesen gyakori allélok (0,3-0,4; 0,3-0,5, 0,5-0,6) a vártnál jóval nagyobb arányban fordulnak elő (Luikart és mtsai 1998a). Bár a molekuláris genetika eszköztárának fejlődésével újabb markereket fejlesztettek ki a genetikai variabilitás és a populációkban zajló mikroevolúciós folyamatok vizsgálatára (ld. mikroszatellitek), az enzimvizsgálatokból származó adatok szintúgy alkalmasak lehetnek arra, hogy következtetéseket vonjunk le azokkal a populációstruktúrát alakító tényezőkkel kapcsolatban, mint amilyen például a palacknyak effektus (Luikart és mtsai 1998a; Luikart és Cornuet 1998).

1.2. A bükki szerecsenboglárka – *Aricia artaxerxes issekutzi* (Balogh, 1956)

Az *Aricia artaxerxes* (Fabricius, 1793) Észak-Európától Közép-Ázsiáig előforduló faj, illetve Kelet-Szibériában is megtalálható (Obratsov 1935, 1936). Elterjedési területének északnyugati határán, valamint Dél-Európa hegyvidékein több alfaját különítették el (Beuret 1954; Balogh 1956; Kaaber és Hoegh-Guldberg 1961; Urbahn 1964; Hoegh-Guldberg 1966, 1968; Hoegh-Guldberg és Jarvis 1969; Kames 1969; Varga 1968). Ezen alfajok egyike az *A. artaxerxes issekutzi* (Balogh 1956, 1. ábra) – bükki szerecsenboglárka –, amely a Kárpát-medence meszes alapkőzetű, száraz-félszáraz, rövidfűvű gyepeit népesíti be (Varga 1961, 1968). Az imágók fő nektárforrásként kisebb, sárga virágú, Fabaceae családba tartozó növényeket (*Lotus corniculatus*, *Melilotus* spp.) használnak (Varga személyes megfigyelése). A lárvák bizonyított tápnövénye a *Helianthemum ovatum* (közönséges napvirág) és a *Geranium sanguineum* (piros gólyaorr). Azonban az *A. artaxerxes* különböző alfajainak lárvái mesterséges körülmények között képesek más iniciális tápnövényen is kifejlődni, például *Erodium cicutariumon* és más *Geranium* fajokon (Hoegh-Guldberg és Jarvis 1969). A bükki szerecsenboglárka monovoltin faj, évente csupán egy nemzedéke fejlődik ki. Egy nőstény körülbelül 100 petét rak - általában egyesével, növényenként csak 3-5-öt - a levelek fonákára vagy a virágrügyekre (Maliczky 1969, Varga 1968). A hernyók kezdetben a tápnövényen fejlődnek, majd arról lepotyogva és megfelelő hangyagazdát magukhoz csalogatva, hangyafészekbe vitethetik magukat, és ott folytathatják fejlődésüket. Ebben az esetben azonban csak fakultatív mirmekofiliáról beszélhetünk, a faj számára nem létszükséglet a fejlődés ilyen formája (Maliczky 1969).



1. ábra *Aricia artaxerxes issekutzi* – bükki szerecsenboglárka (Fotó: Górád Ádám)

A faj Kárpát-medencei előfordulása két területre korlátozódik, az Aggteleki-karszton és a Bükk-fennsíkon élnek populációi. A bükki előfordulási terület körülbelül 700-800 méteres tengerszint feletti magasságban helyezkedik el, és magasabb éves csapadékmennyiség (átlagosan 700 mm/év) jellemzi. Az aggteleki-karszti élőhelyek ennél alacsonyabban vannak (250-550 m), és az évi átlagos csapadékmennyiség is kevesebb (átlagosan 600 mm/év). A Bükk-fennsíkon az utóbbi évtizedekben jelentősen csökkent a különböző kezelések (kaszálás, legeltetés) intenzitása, így ezek hiányában a bükki szerecsenboglárka által preferált rövidfűű gyepek a szukcessziós folyamatoknak egyre erőteljesebben ki vannak téve. Az így kialakuló magasfűű, cserjés társulások már alkalmatlanok a faj számára. Ennek tulajdonítható, hogy a hatvanas években a Bükkben még gyakorinak mondható *Aricia artaxerxes issekutzi* (Varga személyes megfigyelése) egyre ritkábbá, populációi lokálisabbá váltak az elmúlt 30 évben. Ezzel szemben az Aggteleki-karszton a sekély, karsztos aljzatnak köszönhetően a szukcessziós folyamatok lényegesen lassabb ütemben zajlanak, mint a Bükkben, vagyis a faj számára a vegetációstruktúra sokkal kedvezőbb. Ez viszont nagy és stabil populációk fennmaradását teszi lehetővé.

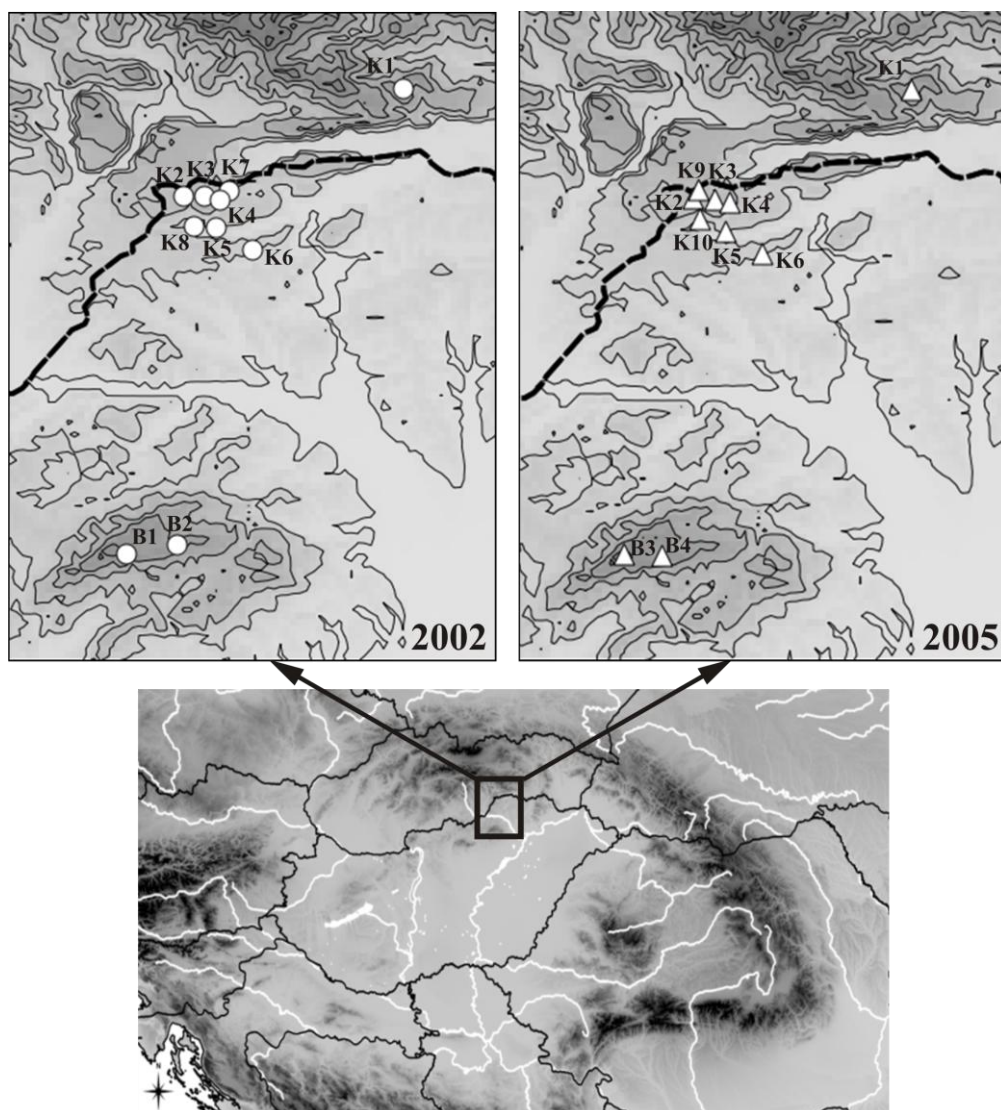
1.3. Célkitűzés

Munkám során az *Aricia artaxerxes issekutzi* bükki és aggteleki-karszti populációiból származó egyedek enzimpolimorfizmusát vizsgáltam. Egyik célom a faj genetikai variabilitásának elemzése volt. Figyelembe véve, hogy az Aggteleki-karszton nagy és stabil, a Bükkben pedig kisebb és hanyatló populációk élnek, feltételeztem, hogy a bükki populációk variabilitása alacsonyabb lesz, hiszen a csökkenő populációméret következtében a genetikai sodródás jobban érvényesülhet bennük. Kutatásom másik kérdése az volt, hogy a palacknyak hatás genetikai következményeit ki lehet-e mutatni a bükki populációkban. A két földrajzi régióra ugyanis különböző habitat struktúra, és ebből adódóan eltérő populációs trend jellemző. A bükki populációkban jelentkező egyedszám csökkenés valószínűsíti a bottleneck hatásának a kimutatását az erős és stabil karszti populációkkal összehasonlítva.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A minták származási helye

Vizsgálataimhoz az Aggteleki-karsztról és a Bükk-fennsíkról 2002-ben és 2005-ben gyűjtött egyedeket használtam fel. Tíz, többnyire stabil aggteleki-karszti, és négy kisebb, hanyatló bükki populációból összesen 20 mintát elemeztem (2. ábra, 1. függelék). Az egyedek a fő peterakási időszak után lettek begyűjtve, ezt követően az enzimpolimorfizmus vizsgálatig -80°C -on tároltuk őket.



2. ábra Gyűjtőhelyek. B1: Zsidó-rét (Zsr); B2: Kecskeláb-rét (Klr); B3: Fekete-sár (Fes); B4: Nagymező (Nme); K1: Hacava (Hac); K2: Haragistya, 20-as töbör (HHt); K3: Dénes-töbör (Dtb); K4: Szelce-puszta (Szp); K5: Szőlőhegy (Szh); K6: Zabanyik (Zab); K7: Ménesvölgy, Derenki elágazás (MDe); K8: Tohonya-völgy (Toh); K9: Ménes-völgy, Mogyoróskút (MMr); K10: Lófej-völgy (Lof).

2.2. Enzimvizsgálatok

Vertikális poliakrilamid gélelektroforézis segítségével 19 enzim lokuszt vizsgáltunk: akonitáz (*Acon*), acid-foszfátáz (*AcphA*, *AcphB*), alkohol-dehidrogenáz (*Adh*), aldehyd-oxidáz (*Aox*), észteráz (*Est*), glutamát-dehidrogenáz (*Gdh*), glutamát-oxálacetát transzamináz (*Got*), glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (*G6pdh*), α -glicerofoszfát dehidrogenáz (*α Gpdh*), hexokináz (*Hk*), izocitrát dehidrogenáz (*Idh*), laktát dehidrogenáz (*Ldh*), malát dehidrogenáz (*Mdh*), malik enzim (*Me*), foszfoglükóz izomeráz (*Pgi*), foszfoglükomutáz (*Pgm*) és szuperoxid diszmutáz (*SodA*, *SodB*). A tor 300 μ l, a potroh 150 μ l extrakciós pufferben lett homogenizálva. A torból származó homogenizátumokat használtuk a *Got*, *α Gpdh*, *G6pdh*, *Hk*, *Idh*, *Ldh*, *Mdh*, *Me*, *Pgi*, *Pgm*, *SodA* és a *SodB*, a potrohból származókat az *Acon*, *AcphA*, *AcphB*, *Adh*, *Aox*, *Est*, és *Gdh* enzimlokuszok analíziséhez. Az eljárás során alkalmazott extrakciós puffer, az elektroforézis pufferrendszerek, a futási paraméterek és a festési módszerek megegyeznek a Pecsénye és mtsai (2007) által használtakkal. Az egyedek genotípusát a gélen látható sávmintázatok alapján azonosítottuk.

2.3. Statisztikai módszerek

A variabilitás szintjének felméréséhez első lépésben meghatároztam a polimorfizmus paramétereit minden populációban, majd mindkét évben régióként átlagoltam őket. A régiók allélkészletének becslése után megállapítottam a mindkét régióra jellemző és a specifikus allélok arányát. Valamennyi paramétert összevettem a régiók és az évek között, amihez két utas ANOVA-t használtam, melyben az egyik fő faktor a régió, míg a másik az év volt. A számításokat az R 2.12.1 program segítségével végeztem el (R Developmental Core Team 2008). A PAST 1.56 program segítségével (Hammer és mtsai 2006), az allélfrekvenciák alapján, a populációk között Cavalli-Sforza és Edwards-féle hűrtávolságokat számoltam (Cavalli-Sforza és Edwards 1967), majd ezek alapján UPGMA dendrogramot (Sneath és Sokal 1973) szerkesztettem. 2000-szeres ismétlésszámot megadva, nem parametrikus bootstrap értékekkel (Felsenstein 1985) határoztam meg a dendrogram elágazási pontjainak megbízhatóságát. A genetikai és földrajzi távolság közti korreláció vizsgálatához Mantel-tesztet (Mantel 1967) használtam 999-es permutációval. Az analízist a GENALEX6 program (Peakall és Smouse 2006) segítségével végeztem el. A GENECLASS2 (Piry és mtsai 2004) program révén assignment tesztet végeztem. A program a különböző egyedek multilokusz genotípusa alapján bayesi statisztikai módszert alkalmazva (Rannala és Mountain 1997)

valószínűségi értékeket adott meg arra vonatkozóan, hogy az egyes egyedek milyen eséllyel sorolódnak be a karszti illetve a bükki régióba. Végül megvizsgáltuk, hogy a kapott adatok mely populációk esetében utalnak palacknyak hatásra. Egy mutáció-drift egyensúlyban lévő populációban az allélok megoszlása a különböző gyakorisági osztályokban L-formájú görbét mutat; azaz leggyakrabban a ritka (0-0,1) allélok jelennek meg, majd az allélgyakoriság növekedésével exponenciálisan csökken az adott frekvencia osztályban várható allélok száma. Ezzel ellentétben, egy nemrég palacknyak hatást elszenvedett populációban a ritka allélok gyakorisága jelentősen lecsökken a várhatóhoz képest. (Luikart és mtsai 1998b). Ezért összehasonlítottuk a vizsgált populációkban az allélok megoszlását a gyakorisági osztályok között. Ugyanakkor a palacknyak hatást követően egy populációban relatív heterozigóta többlet tapasztalható az allélszám alapján várható értékhez képest. Megnéztük tehát azt is, hogy mely minták esetében mutatható ki szignifikáns heterozigóta többlet a várható gyakorisághoz képest (Cornuet és Luikart 1996, Luikart és Cornuet 1998). A palacknyak hatás kimutatására a BOTTLENECK programot (Piry és mtsai 1999) használtuk.

3. EREDMÉNYEK

A polimorfizmus valamennyi paramétere magas szintű variabilitást jelez a vizsgált *A. artaxerxes issekutzi* populációkban (1A, 1B táblázat). Mivel a különböző élőhelyekről származó minták egyedszáma igen tág intervallumok között változik (12 és 56 között, 1. függelék), ezért nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a tényt, hogy a lókuszonkénti átlagos allélszámot befolyásolja a minta mérete. Ezért megvizsgáltuk az allélszám és a mintaméret összefüggését. Tekintettel előzetes feltételezésünkre a bükki populációkban esetlegesen lezajlott palacknyak hatásról, ebben az analízisben csak a Karszton, 2002-ben és 2005-ben gyűjtött mintákat használtuk. Szignifikáns ($F_{1, 13}=7.22$; $P=0.0186$) logaritmikus összefüggést tapasztaltunk a két paraméter között: $n_{AN}=1.681+1.0057*\log_{10}N$. Az egyenlet alapján minden mintában kiszámoltuk a korrigált allélszámot (1B táblázat: n_{AN}).

További lehetőség az átlagos allélszám és a minta mérete közötti összefüggés kiküszöbölésére az allélgazdagság (allelic richness) és az effektív allélszám megállapítása (1B. táblázat: Ar , n_E). Az allélgazdagság nem más, mint a legkisebb mintával megegyező egyedszámú, eredeti mintákból létrehozott részmintákban várt allélszám. Ebben az esetben tehát az eredeti minta újramintázásával (resampling) kapunk, egy mintamérettől független allélszám értéket. Ugyanakkor az effektív allélszám azt mutatja meg, hogy a tapasztalttal

megegyező mértékű heterozigótaságot hányszor, körülbelül egyforma gyakorisággal előforduló allél alakítaná ki. Mivel a ritka allélok a heterozigótasághoz kis mértékben járulnak hozzá, ezért egy normál populációban – melyet nem ért bottleneck hatás, és ezért relatíve gyakoriak benne a ritka allélok – ez a mérőszám jelentősen alulbecsüli az allélszámot. Egy bottleneck sújtotta populációban azonban, ahol elsősorban a ritka allélok hiányoznak, az effektív és a valós lokuszonkénti allélszám nem észlelhető ilyen mértékű eltérés. Így tehát, az átlagos lokuszonkénti allélszám és az effektív allélszám különbsége jó jelzője lehet egy korábban bekövetkezett palacknyak hatásnak. A különbség számolásához a tapasztalt allélszám helyett azonban korrigált értékeket használtunk: $\Delta_1 = n_{AN} - n_E$; $\Delta_2 = A - n_E$ (1B. táblázat).

A magas szintű polimorfizmus mellett a vizsgált régiók paraméterei között számottevő különbség figyelhető meg. A legtöbb paraméter magasabbnak mutatkozott a Karszt populációiban a Bükkiekhez képest, bár ez a tendencia nem volt következetes minden paraméter esetében (1B. táblázat). Az allélszám paraméterei a korrigált lokuszonkénti allélszám (n_{AN}) kivételével szignifikáns különbséget mutattak a két régióban (1C. táblázat: reg). Ugyanakkor a két Δ érték közül csak a $\Delta_2 = A - n_E$ mutatkozott szignifikánsnak, vagyis az újramintázás révén korrigált allélszám és az effektív allélszám különbsége. Az évek között csak két paraméterben mutatkozott szignifikáns különbség: az effektív allélszámban (n_E) és az effektív heterozigóta gyakoriságban (H_e) (1C. táblázat: év)

1A. táblázat. A polimorfizmus régiós szintű mutatói a két vizsgált évben. A: teljes allélszám; S: adott régióra specifikus allélok száma.

Év	Régió	A	S
2002	Karszt	88	38
	Bükk	52	2
	Total	90	-
2005	Karszt	97	43
	Bükk	58	4
	Total	101	-

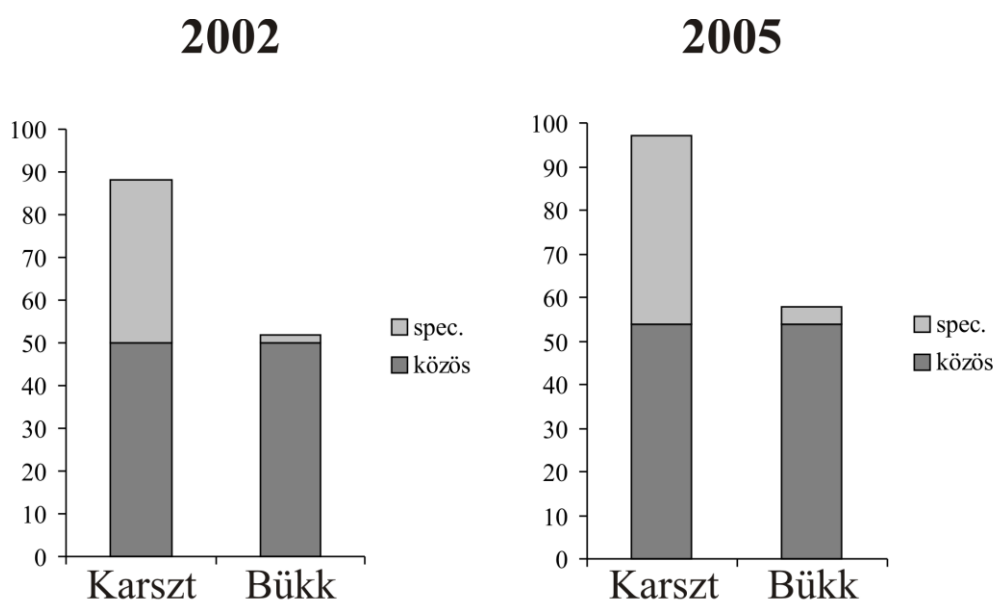
1B. táblázat. A polimorfizmus populációs szintű mutatóinak régiókra számított átlagai a két évben. N: mintaméret; n_A : lókuszonkénti átlagos allélszám; n_{AN} : mintaméretre korrigált n_A ; n_E : effektív allélszám; Δ_1 : n_{AN} és n_E különbsége; Ar: allélgazdagság (allelic richness); Δ_2 : Ar és n_E különbsége; H_e : átlagos várt heterozigóta gyakoriság.

Év	Régió	N	n_A	n_{AN}	n_E	Δ_1	Ar	Δ_2	H_e
2002	Karszt	40.0 (± 11.4)	3.18 (± 0.24)	3.28 (± 0.13)	1.82 (± 0.05)	1.45 (± 0.13)	2.67 $\pm(0.08)$	0.858 (± 0.24)	0.317 (± 0.013)
	Bükk	18.2 (± 0.8)	2.42 (± 0)	2.95 (± 0.02)	1.62 (± 0.02)	1.32 (± 0.00)	2.33 (± 0.04)	0.708 (± 0.24)	0.282 (± 0.007)
	Total	35.7 (± 13.6)	3.03 (± 0.38)	3.21 (± 0.18)	1.78 (± 0.09)	1.43 (± 0.13)	2.60 (± 0.16)	0.823 (± 0.24)	0.310 (± 0.019)
2005	Karszt	29.5 (± 8.7)	3.2 (± 0.3)	3.14 (± 0.15)	1.85 (± 0.05)	1.29 (± 0.27)	2.65 (± 0.15)	0.798 (± 0.24)	0.326 (± 0.010)
	Bükk	33.7 (± 30.7)	2.8 (± 0.4)	3.10 (± 0.47)	1.76 (± 0.04)	1.34 (± 0.51)	2.44 (± 0.03)	0.681 (± 0.24)	0.302 (± 0.008)
	Total	30.3 (± 12.9)	3.11 (± 0.36)	3.13 (± 0.20)	1.83 (± 0.06)	1.30 (± 0.20)	2.61 (± 0.16)	0.774 (± 0.24)	0.321 (± 0.014)

1C. táblázat. Az ANOVA eredményei: a paraméterek összehasonlítása a régiók (reg) és évek (év) között. reg*év: a két fő faktor közötti interakció; $F_{1,16}$: F-érték, ahol $df_1=1$ és $df_2=16$; P: valószínűség. A további jelek magyarázatát lásd az 1B táblázat szövegében. A vastagon szedett számok a faktor szignifikáns hatását mutatják.

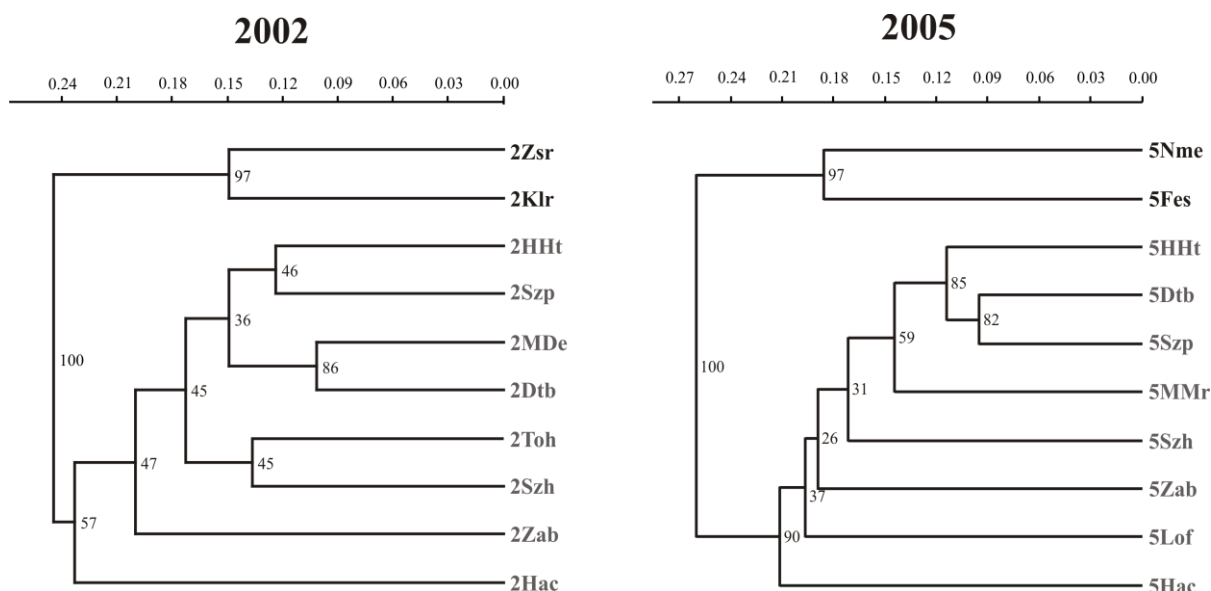
		n_A	n_{AN}	n_E	Δ_1	Ar	Δ_2	H_e
reg	$F_{1,16}$	14.14	3.56	29.55	0.16	18.59	7.13	22.35
	P	0.0017	0.0774	0.0001	0.6987	0.0005	0.0168	0.0002
év	$F_{1,16}$	1.27	0.01	8.86	0.58	0.39	0.68	5.25
	P	0.2759	0.9439	0.0089	0.4583	0.5431	0.4207	0.0358
reg*év	$F_{1,16}$	1.09	2.17	3.59	0.93	1.01	0.08	0.81
	P	0.3118	0.1600	0.0762	0.3492	0.3297	0.7863	0.3826

A teljes allélszámot vizsgálva elmondható, hogy az Aggteleki-karszt allélkészlete közel 60%-kal nagyobb, mint a bükkie (1A. táblázat: A). Az allélokat régiókban való előfordulásuk alapján osztályozva két csoportot különböztettünk meg: közös allélok, melyek mindkét régióra jellemzőek, és specifikus allélok, melyek csak az adott régióban fordulnak elő. Az egyes régiókra jellemző specifikus allélok számában jelentős különbség figyelhető meg mindkét évben. Míg ezek a Karszt allélkészletének valamivel több, mint 40%-át teszik ki, addig ez az arány a Bükkben összességében nem éri el a 6%-ot (1A. táblázat, 3. ábra). Ráadásul a karszti specifikus allélok jelentős része (körülbelül 86%-a) ritka allél, vagyis 5%-nál kisebb gyakoriságú.



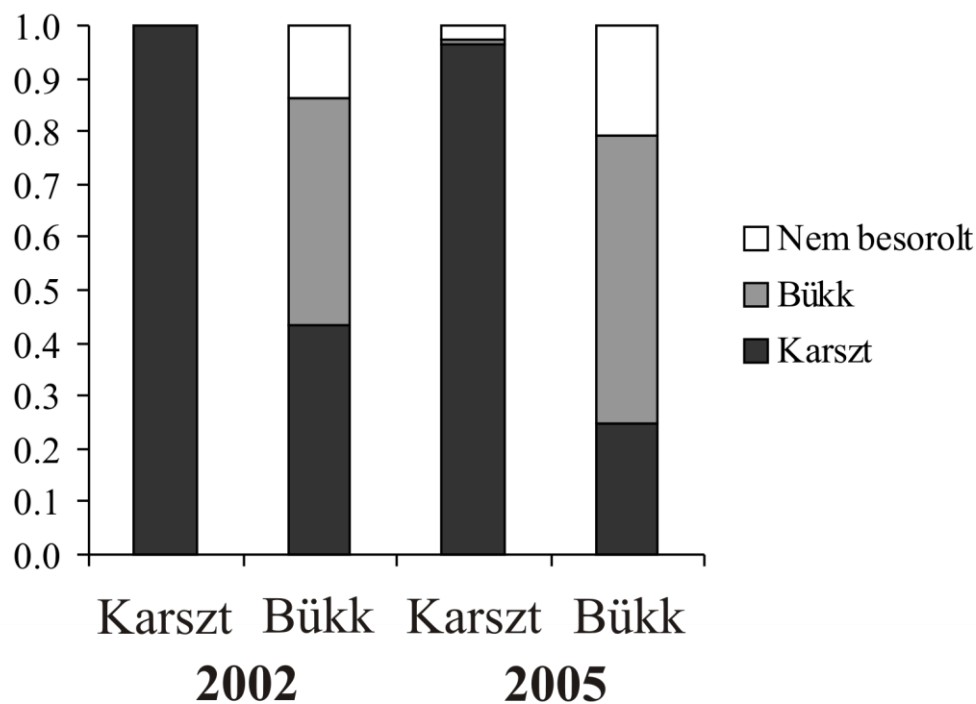
3. ábra Az allélkészlet megoszlása a vizsgált években. Közös: mindkét régióban előforduló allélok; spec.: csak az adott régióra jellemző allélok.

A populációk közötti Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján UPGMA dendrogramokat készítettünk a vizsgált évekre külön-külön. A dendrogramok mindkét évben földrajzi mintázatot mutatnak, hiszen a populációk a régióknak megfelelően két ágban klasztereződtek (4. ábra). További tagolódás figyelhető meg az aggteleki-karszti minták esetében, ugyanis a Karszt szlovákiai részén fekvő hačavai (Hac) populációból származó minták mindkét évben elkülönülnek a többi karszti populációtól.



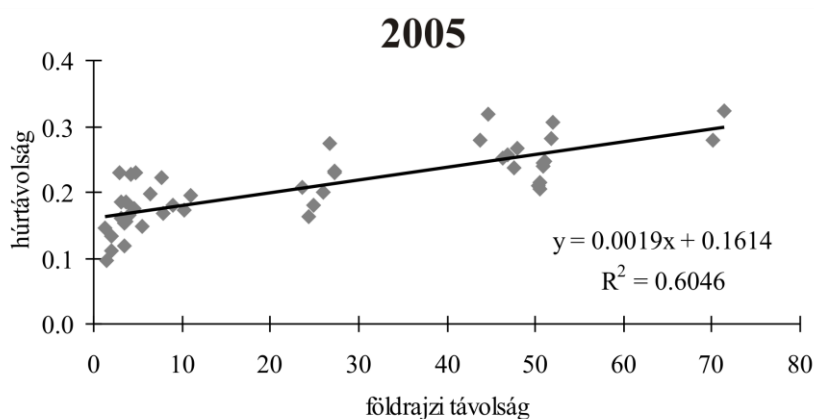
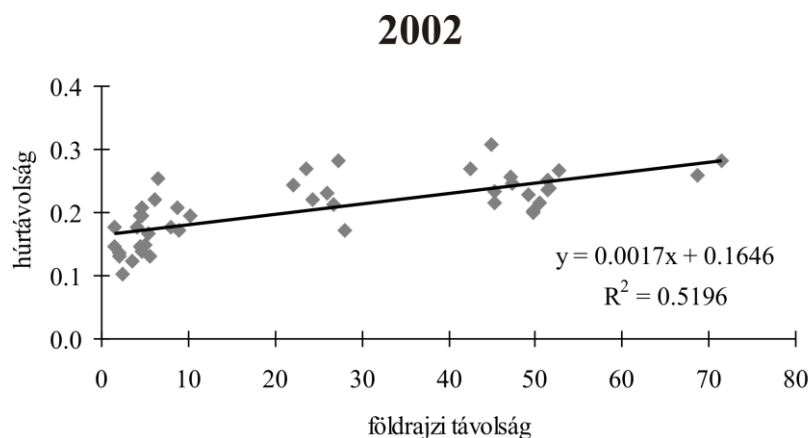
4. ábra Cavalli-Sforza és Edwards hűrtávolságok alapján készített UPGMA dendrogramok a vizsgált években. Az elágazási pontoknál levő számok bootstrap értékek.

A továbbiakban assignment tesztet végeztünk mindkét évre külön-külön. Mivel a regionális szintű osztályozás sikerességét akartuk megvizsgálni, ezért az adatsorunkban egyesítettük az egy régióba eső populációk egyedeinek adatait. Az eredmények értékelésénél három kategóriát hoztunk létre: jól, tévesen és nem besorolható egyedek. Az utóbbi csoportba azon egyedek tartoztak, amelyeket a program nagyon hasonló valószínűséggel sorolt be mindkét régióba (a különbség a két érték között kevesebb volt, mint 0,05). A három kategória megoszlása óriási különbségeket mutatott a két földrajzi terület között (5. ábra). Míg az aggteleki-karszti egyedeket a program mindkét évben majdnem 100%-ban helyesen sorolta be (majdnem minden egyed a karsztiak közé lett sorolva), addig a bükki egyedeknek kevesebb mint a felét ítélte a program „valódi bükkinek” (5. ábra). Sőt, ebben a régióban jelentős volt a nem besorolható egyedek aránya is (5. ábra). Ez az eredmény párhuzamba állítható a közös és specifikus allélok számában mutatkozó különbséggel, a Karszt esetében tapasztalt jó osztályozás köszönhető az ottani specifikus allélok nagy arányának.



5. ábra Az assignment teszt eredményei. Karszt: a karszti régióba sorolt egyedek; Bükk: a bükki régióba sorolt egyedek; Nem besorolt: azon egyedek, melyek egyik régióba sem sorolhatók.

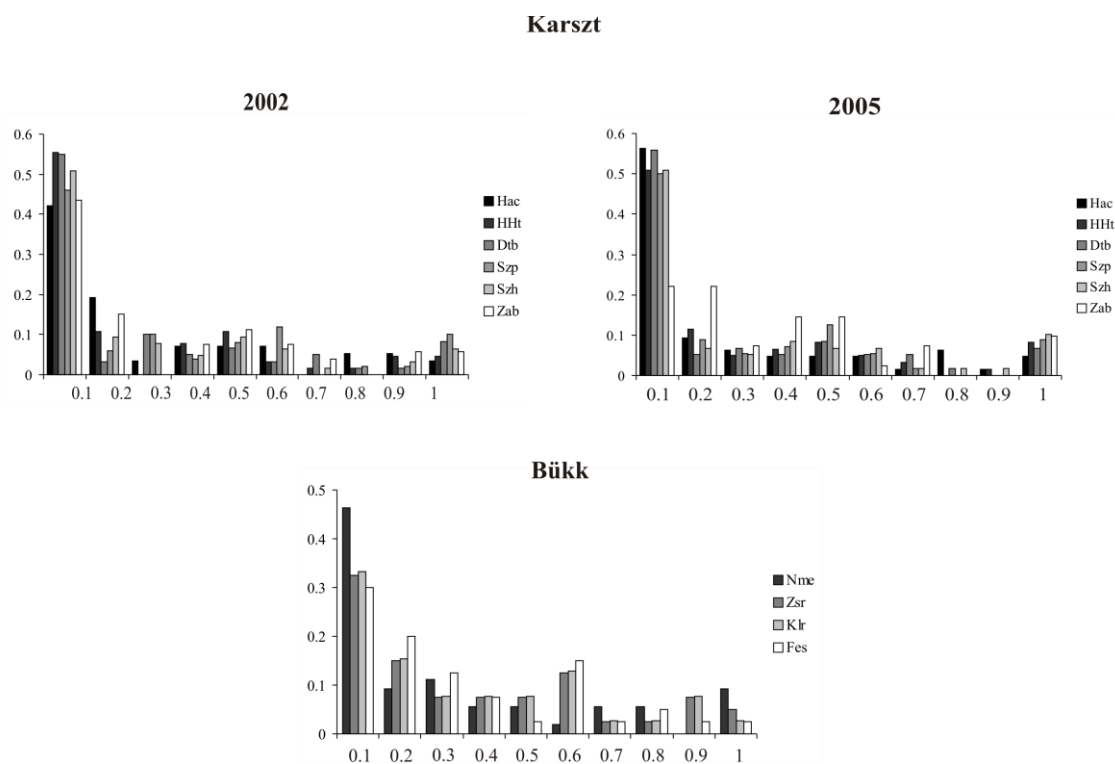
Habár a dendrogramok egyértelmű regionális differenciálódást mutattak, az assignment teszt eredményei részben módosították a képet. Hogy megvizsgáljuk a két régió elkülönülésének fokát, Mantel-tesztet végeztünk. A genetikai és földrajzi távolságok mindkét évben szignifikáns korrelációt mutattak, ráadásul a két év eredményei gyakorlatilag azonosak, a korreláció mértékét és a regressziós egyenesek paramétereit illetően (6. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a távolság növekedésével fokozódó izoláció (isolation by distance modell) az, ami legjobban magyarázhatja az észak-magyarországi *A. artaxerxes* populációk genetikai variabilitásának szerkezetét.



6. ábra A Mantel-teszt eredményei.

Ahhoz, hogy magyarázatot találjunk a két régió genetikai variabilitásának a különbségeire, a palacknyak hatás valószínűségét vizsgáltuk meg a populációkban. Ha a tapasztalt heterozigóta gyakoriság jelentősen nagyobb, mint azt a megfigyelt allélszámok alapján, a mutáció-drift egyensúlya esetén várnánk, akkor feltételezhetjük, hogy az adott populáció jelenlegi összetételét egy, a közelmúltban lezajlott palacknyak hatás eredményezte. Figyelembe véve a populációs trendeket, úgy véltük, hogy a bükki mintáinkban nagyobb eséllyel következhetett be hirtelen demográfiai csökkenés. Bár az elemzés során kapott eredmények nem támasztották alá teljes mértékben az elképzeléseinket, bizonyos tendenciákat meg tudtunk figyelni. Az allélok különböző frekvenciaosztályok szerinti megoszlását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az összes karszti populáció – a 2005-ös zabanyiki minta kivételével – tipikus „L eloszlást” mutatott, vagyis a kisebb gyakoriságú allélok nagy arányban voltak jelen, míg a nagyobb frekvenciájúak exponenciálisan csökkenő arányban (7. ábra). Azonban a 2005-ös zabanyiki (Zab) populációban a 0-0.1 és 0.1-0.2 gyakoriságú allélok jóval kisebb, ezzel szemben az átmeneti (0.4-0.5 és 0.5-0.6) gyakoriságú

allélok viszonylag nagyobb arányban voltak jelen a normál „L eloszlást” mutatottakhoz képest (7. ábra). A bükki régióban ennek a fordítottja volt megfigyelhető: három populáció (Fes, Klr, Zsr) mutat a zabanyikihoz hasonló, az intermedier osztályok irányába tolódott eloszlást, míg a nagymezői populációban (Nme) a többi karszti populációéhoz hasonló „L-eloszlást” tapasztaltunk (7. ábra). Mindez arra enged következtetni, hogy a karszti populációk többsége (kivéve a 2005-ből származó zabanyiki minta), valamint a Bükk-nagymezői (Nme) populáció esetében fennáll a mutáció és a drift egyensúlya. Ezzel szemben a 2005-ös zabanyiki populáció és a bükki populációk – a nagymezői kivételével – valószínűleg egy korábban lejátszódó palacknyak effektus genetikai következményeit hordozzák.



7. ábra Az allélok megoszlása a különböző frekvenciaosztályokban. A populációk rövidítéseit a Függelék 1. tartalmazza.

Ezt a feltételezést erősítik a polimorfizmus paramétereinek más csoportosításban való összehasonlítása során kapott eredmények is. A populációkat mind 2002-ben, mind pedig 2005-ben újra csoportosítottuk: stabil egyedszámú (Nonbot) és bottlenecket feltehetően elszenvedett (Bot) populációkra. A két csoport között összehasonlítottuk a polimorfizmus allél számokkal kapcsolatos mutatóinak átlagát (2A és 2B táblázatok). Minden paraméter, egyértelmű szignifikáns különbséget mutatott a két csoport között. Különösen fontos, hogy mindkét Δ érték – a korrigált allélszám, valamint az allélgazdagság és az effektív allélszám

különbsége egyaránt – szignifikánsan alacsonyabb volt a palacknyak hatással sújtott populációkban, mint a többiben. Azaz, a heterozigóta gyakoriság alapján becsült allélszám jobban megközelítette a valós allél számok akár extrapolációval (n_{AN}), akár újramintázással (Ar) korrigált értékeit azokban a populációkban, melyek feltehetően ki voltak téve a bottleneck hatásának.

2A. táblázat. A polimorfizmus néhány paraméterének átlaga a stabil egyedszámú (Nonbot) és bottlenecket feltehetően elszenvedett (Bot) populációkban a két vizsgált évben. n_A : lókuszonkénti átlagos allélszám; n_{AN} : mintaméretre korrigált n_A ; n_E : effektív allélszám; Δ_1 : n_{AN} és n_E különbsége; Ar : allélgazdagság (allelic richness); Δ_2 : Ar és n_E különbsége.

		n_A	n_{AN}	n_E	Δ_1	Ar	Δ_2
Nonbot	2002	3.18	3.28	1.82	1.456	2.67	0.851
	2005	3.26	3.21	1.84	1.368	2.65	0.807
Bot	2002	2.42	2.95	1.62	1.325	2.33	0.777
	2005	2.47	2.81	1.77	1.034	2.42	0.644

2B. táblázat. Az ANOVA eredményei: a paraméterek összehasonlítása a stabil egyedszámú és bottlenecket feltehetően elszenvedett populációk (bot), valamint az évek (év) között. Bot és év a két fő faktor; bot*év: a két fő faktor közötti interakció; $F_{1,16}$: F-érték, ahol $df_1=1$ és $df_2=16$; P: valószínűség. A további jelek magyarázatát lásd az 2A. táblázat szövegében. A vastagon szedett számok a faktor szignifikáns hatását mutatják.

		n_A	n_{AN}	n_E	Δ_1	Ar	Δ_2
bot	$F_{1,16}$	54.18	30.05	20.96	9.22	21.66	11.97
	P	0.0000	0.0001	0.0003	0.0079	0.0003	0.0032
év	$F_{1,16}$	0.43	2.34	8.99	6.15	0.29	1.50
	P	0.5201	0.1454	0.0085	0.0247	0.5965	0.2387
bot*év	$F_{1,16}$	0.02	0.33	4.73	1.77	0.76	0.05
	P	0.8775	0.5752	0.0450	0.2024	0.3977	0.8260

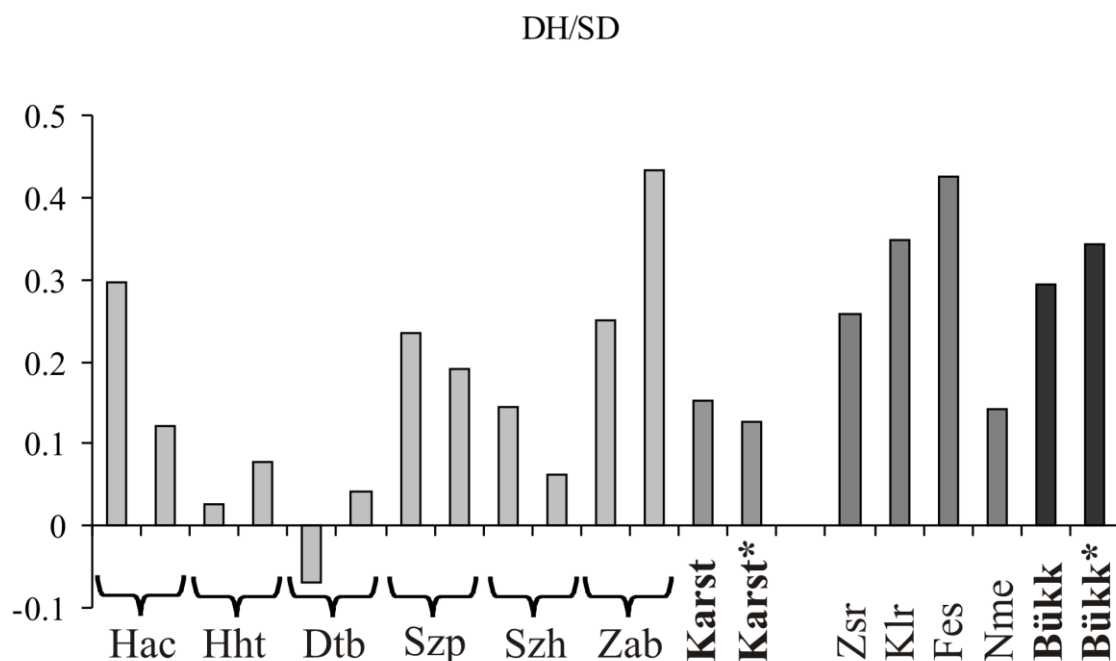
A palacknyak után jelentkező heterozigóta többlet kapott eredmények azonban nem mutattak ilyen világos képet. A heterozigóta többlet kimutatásának egyik lehetősége az előjel teszt. Ebben az analízisben abból indulunk ki, hogy a mutáció-drift egyensúly esetén a lokuszok felénél várunk véletlenszerűen megjelenő heterozigóta többletet. Palacknyak hatás után azonban a várhatónál több lokusz fog heterozigóta többletet mutatni. A vizsgált populációk esetében azonban csupán a 2005-ös feketesári (Fes) populációban tudtunk kimutatni szignifikánsan több heterozigóta többlettel bíró lokuszt, mint várható. (3. táblázat: Előjel teszt). Ez a teszt azonban nem veszi figyelembe az egyes lokuszokon tapasztalt heterozigóta többlet nagyságát. Ezt a hiányosságot korrigálja a standardizált differencia teszt, melyben a heterozigóta többletet (DH) a heterozigóta eloszlásának szórásával (SD) korrigálják. Ennek a tesztnek az eredményei azonban még kevésbé voltak egyértelműek, csak a 2005-ös zabanyiki populációban bizonyult közel szignifikánsnak ($P=0,06$) a heterozigóta többlet mértéke (3. táblázat: St.diff.teszt).

Ugyanakkor, a standardizált heterozigóta többlet értékei mutattak bizonyos tendenciákat. Nevezetesen ezek a DH/SD értékek a karszti populációkban átlagosan alacsonyabbnak bizonyultak, mint a bükkiekben (8. ábra). Különösen igaz volt ez akkor, ha nem a földrajzi régiók alapján átlagoltam a populációkat, hanem azt vettem számításba, hogy az allélok eloszlása alapján mely populációkban tételezhettem fel a palacknyak hatást. Ebben az utóbbi csoportosításban zabanyiki 2005-ös mintát, amelyben palacknyak hatást lehet feltételezni az alléleloszlás alapján, nem vettem figyelembe a Karszt populációk átlagában (8. ábra: Karst*). A nagymezői mintát pedig, amely tipikus L-formájú alléleloszlást mutatott, nem vettem figyelembe a bükki populációk DH/SD értékeinek átlagolásánál (8. ábra: Bükk*). A standardizált heterozigóta többlet értékek így számított átlagai szignifikáns különbséget ($F_{1,14}=16,9$; $0,001 < P < 0,01$) mutattak a palacnyak és a tipikus nem palacnyak alléleloszlást mutató populációk között.

Úgy tűnik, hogy a palacknyak hatás kimutatása eléggé nehézkes, amennyiben az egyes populációkat külön-külön vizsgáljuk. Ha viszont a mintákat a bennük lezajló palacknyak esemény valószínűsége szerint csoportosítjuk, akkor feltárhatunk bizonyos tendenciákat.

3. táblázat A bottleneck tesztelésének eredményei. Előjel teszt – Várt: mutáció-drift egyensúlyi helyzetben heterozigóta többletet mutató lokuszok száma; Tapasztalt: ténylegesen heterozigóta többletet mutató lokuszok száma; P: valószínűség; Standardizált differencia teszt – DH: heterozigóta többlet; SD: heterozigótaság eloszlásának standard eltérése; P: valószínűség.

Év	Régió	Pop	Előjel teszt			St.diff.teszt	
			Várt	Tapasztalt	P	DH/SD	P
2002	Karszt	Hac	7,67	10	0,17	0,297	0,12
		HHt	8,01	8	0,60	0,026	0,46
		Dtb	7,94	9	0,39	-0,068	0,40
		Szp	7,58	9	0,32	0,235	0,18
		Szh	7,82	8	0,57	0,144	0,29
		Zab	7,64	10	0,17	0,251	0,17
	Bükk	Zsr	6,78	8	0,34	0,258	0,17
		Klr	6,36	8	0,25	0,349	0,11
2005	Karszt	Hac	7,91	8	0,59	0,122	0,32
		HHt	8,04	9	0,41	0,078	0,49
		Dtb	7,60	7	0,48	-0,051	0,44
		Szp	7,25	8	0,45	0,042	0,24
		Szh	8,13	7	0,37	0,191	0,40
		Zab	6,69	8	0,33	0,434	0,06
	Bükk	Nme	7,51	9	0,30	0,062	0,30
		Fes	6,47	10	0,04	0,434	0,07



8. ábra A standardizált heterozigóta többlet (DH/SD) értékei a vizsgált populációkban. Világos oszlopok: Karszt populációk értékei 2002-ben és 2005-ben; közép szürke oszlopok: Karszt populációk átlagos értékei; Karszt*: a Karszt populációk átlaga a Zab 2005-ös minta kivételével; sötétszürke oszlopok: Bükk populációk; fekete oszlopok: Bükk populációk átlagos értékei; Bükk*: a Bükk populációk átlaga az Nme minta kivételével.

4. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A magyarországi *Aricia artaxerxes issekutzi* populációk meglehetősen polimorfnak bizonyultak, genetikai variabilitásuk mértéke messze meghaladja más vizsgált, Lycaenidae családba tartozó európai fajokét (Schmitt és Seitz 2001, 2002; Schmitt és mtsai. 2002, 2003; De Keyser és mtsai. 2012. Aagaard és mtsai (2002) észak-európai *A. artaxerxes* populációk genetikai variabilitását vizsgálva - a mi eredményeinkkel ellentétben - közepes mértékű polimorfizmust mutattak ki, átlagosan 1,77 allélt találtak lokuszonként. A két analízis eredményei közti szembetűnő eltérést két dolog is magyarázhatja. Okozhatta az elektroforézis során használt gélek szerkezete, illetve az alkalmazott pufferrendszerek közötti különbség, hiszen ezek a tényezők jelentősen befolyásolják a gél felbontóképességét. Ezt támasztja alá, hogy a mindkét csoport által vizsgált enzimlokuszok (*Idh*, *Mdh*, *Pgm* és *Pgi*) esetében

Pecsenye és mtsai (2007) közel kétszer annyi allélt azonosítottak, mint Aagaard és mtsai (2002). Másik magyarázat lehet, hogy a 2 vizsgálatban más-más alfajok analízisét végezték el. Ugyanis Aagaard és mtsai (2002) gyűjtése Nagy-Britanniában és Skandináviában folyt, ahol feltehetően *A. artaxerxes artaxerxes* populációkból gyűjtöttek mintát, míg a Kárpát-medencében másik alfaj, az *A. artaxerxes issekutzi* fordul elő. Valószínűleg a két alfaj eltérő mértékű genetikai variabilitással bír.

A polimorfizmus paraméterei a Bükk-fennsík populációiban alacsonyabbak, mint a karsztiakban, ráadásul ez a különbség az értékek többsége esetében szignifikáns. Míg a lokuszonkénti átlagos allélszámban ez a különbség feltűnően nagy a két régió között (2002: 33%, 2005: 14%), addig a heterozigóta gyakoriságbeli különbség ennél valamivel kisebb (2002: 12%, 2005: 5%). Összességében tehát elmondható, hogy a bükki populációk genetikai variabilitásának mértéke kisebb, mint a karsztiaké.

A genetikai variabilitás szerkezetének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az aggteleki-karszti és a bükki régió mindkét évben differenciálódott egymástól. Ezt igazolják a dendrogramok, és a két régió populációiban megjelenő specifikus allélok számában mutatkozó különbség is erre utal. Azonban az assignment teszt eredménye, az egyedek besorolásának sikerességében megjelenő számottevő különbség világít rá arra, hogy a bükki szerezsenboglárka populációstruktúrájának megértése nem egyszerű feladat. A Mantel-teszt eredményeiből arra következtethetünk, hogy a populációk genetikai összetétele jól megközelíthető a távolsággal arányos izoláció modelljével. Habár a földrajzi differenciálódás és az „isolation by distance” modell között némi ellentmondás érződik, bizonyos körülmények között mindkettő hatással lehet a populációk genetikai struktúrájának kialakulására. Egy lehetséges magyarázatot adhat az Északi-középhegység flóra- és faunaváltozásainak nyomon követése. Körülbelül 3000-4000 évvel ezelőtt a terület erdőborítottsága folytonos volt (Magyari 2002). Ezekben az erdőségekben kellett lenniük kisebb foltokban olyan meszes alapkőzetten kialakuló gyepeknek, amiket az *A. artaxerxes* képes volt benépesíteni. Az emberi hatások (például erdőirtás, mezőgazdasági tevékenység, urbanizáció) fokozódásával ezek az élőhelyek egyre jobban feldarabolódtak, a faj számára kedvezőtlen, nagy kiterjedésű élőhelyek kialakulásával a bükki és a karszti régió elszeparálódását eredményezte.

A vizsgálat konzervációgenetikai szempontból is fontos eredménye azonban, hogy néhány bükki populációban sikerült kimutatni a bottleneck hatás genetikai következményeit. A bükki populációkban (a nagymezői populáció kivételével) a karsztiakéhoz viszonyított

alacsony szintű polimorfizmus, valamint, a ritka és a specifikus allélok alacsony aránya voltak azok a jelek, amik arra engedtek következtetni, hogy valószínűleg palacknyak effektusnak kitett populációkról van szó. De Keyser és mtsai (2012) is hasonló variabilitás csökkenésről számoltak be a Brit-szigeteket kolonizáló *Polyommatus icarus* esetében. Az enzimpolimorfizmus összes mérőszáma szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a brit populációkban, mint az európaiakban. A bükki szerecsenboglárkát ért bottleneck hatás legnyilvánvalóbb bizonyítékát az allélok különböző frekvenciaosztályok közötti eloszlásának vizsgálata nyújtotta. Egy normál, palacknyak hatásnak nem kitett populáció esetében „L-eloszlást” tapasztalunk, míg egy bottleneckkel sújtott populációban ez az eloszlás módosul, a ritka allélok kisebb arányban vannak jelen, és az eloszlás az átmeneti, közepes gyakoriságú allélok irányába tolódik el (Luikart és mtsai 1998). Ilyen mintázattal szembesültünk három bükki (Fes és Klr 2002-ben, Zsr 2005-ben) és egy karszti populáció (Zab 2005-ben) esetében, akárcsak De Keyser és mtsai (2012) az előbb említett *Polyommatus icarus* brit-szigeteki populációiban. A palacknyak hatásra utaló másik „árulkodó” jel a mutáció és drift egyensúlyának fennállása esetén feltételezett értéktől magasabb heterozigóta gyakoriság. Bár szignifikáns heterozigóta többletet csak egy bükki populációban (Fes) tudtuk kimutatni, tendenciájában több heterozigóta jelent meg azokban a populációkban, melyeknek alléleloszlása a palacknyak hatás következményeit mutatta.

A kapott eredmények tehát nem minden tekintetben feleltek meg a várakozásainknak. Azt feltételeztük, hogy a kisebb egyedszámú, izolált bükki populációk azok, amelyeket nagyobb valószínűséggel fenyeget a palacknyak hatás, míg a nagyobb, stabil karszti populációkra ez nem jellemző. A bükki Nagymező (Nme) populációban azonban nem mutatható ki a palacknyak hatás következménye. Ennek oka az lehet, hogy ennek a populációnak az élőhelye nagy kiterjedésű, így egy nagy és stabil populációnak adhat otthont. A Karszton lévő zabanyiki (Zab) populáció szintén a kivételek közé sorolandó. A 2005-ből származó mintán, a másik három bükki populációhoz hasonlóan a palacknyak hatás jelei mutatkoztak. Ez a populáció az Aggteleki-karszt legmelegebb és legszárazabb élőhelyén él, ami feltehetően a faj tűrőképességének határát is jelenti. Ebből adódóan egy aszályos időszak komoly hatással lehet a populáció méretére, annak jelentős csökkenését eredményezve. 2002-ben és 2003-ben a Karszton mért átlaghőmérséklet a szokásosnál magasabb volt, míg az éves csapadékmennyiség alacsonyabb, így ezek a körülmények könnyen eredményezhették a zabanyiki populáció átmeneti hanyatlását, aminek a nyoma a 2005-ből származó mintán is kimutatható volt.

A kutatás eredménye konzervációgenetikai szempontból is jelentős. A faj élőhelyeinek egy részét az emberi tevékenység tartja fenn (pl. fennsíki kaszálók). Ahhoz, hogy ezek az élőhelyek fennmaradjanak, folyamatos kezelés szükséges. Az utóbbi időben jelentősen csökkent az állattartás, és ez maga után vonta a kaszálás elmaradását is, ami a Bükk-fennsíki rétek esetében a fenntartó kezelést biztosította. A kaszálás elmaradásával először a gyepszerkezet változik meg. Az egyszikűek dominálják a gyepet, és ezzel párhuzamosan a kétszikűek visszaszorulnak. A kétszikűek csökkenését követik a hozzá kötődő fitofágok is, mint például az *Aricia artaxerxes*. Fontos tehát ezen élőhelyek megfelelő kezelése. Ezen túlmenően az élőhely-foltok közötti migrációs útvonalak biztosítása is kulcsfontosságú, hiszen a nagyobb, hálózatot alkotó populációk, melyek között génáramlás folyhat, képesek egy magasabb szintű genetikai variabilitás megőrzésére. Ezzel szemben a fragmentálódott élőhelyeken, ahol a populációk közti kapcsolat gátolva van, a genetikai diverzitás jelentősen lecsökkenhet. A csökkenő egyedszám beltenyésztést vonhat maga után, és tovább súlyosbítja a helyzetet, ami egy véget nem érő leromlási folyamat kezdetét jelentheti.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Pecsénye Katalinnak és Dr. Bereczki Juditnak a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségükért, hasznos tanácsaikért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Varga Zoltánnak és Szabó Sándornak a minták begyűjtéséért. Köszönöm Mester Valériának az egyedek elektroforetikus feldolgozását. Kutatásom anyagi háttérét az OTKA (K-84071) pályázat biztosította.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Aagaard K, Hindar K et al (2002) Phylogenetic relationships in brown argus butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae: *Aricia*) from northwestern Europe. Biol J Linn Soc 75: 27-37.
- Allendorf FW, Luikart G (2006) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Malden.
- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? Heredity 87: 257-265.
- Balogh I (1956) Eine neue Lycaenida aus Ungarn. Folia Ent Hung 9: 65-77.
- Beuret H (1954) Die Lycaeniden der Schweiz. Teil II. Entomologische Gesellschaft, Basel, pp. 204-222.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Am J Hum Genet 19: 233-257.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.
- England PR, Osler GHR et al (2003) Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. Conserv Genet 4: 595-604.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hammer Ř, Harper DAT, Ryan PD (2006) Past-paleontological statistics. Version 1.56. <http://folk.uio.no/ohammer/past>
- Hoegh-Guldberg O (1966) North European groups of *Aricia allous* G-Hb. Their variability and relationship to *A. agestis* Schiff. Nat Jutlandica 13: 1-184.
- Hoegh-Guldberg O (1968) Evolutionary trends in the genus *Aricia*. Nat Jutlandica 14: 1-76.
- Hoegh-Guldberg O, Jarvis FVL (1969) Central and North European *Ariciae* (Lep.). Relationships, heredity, evolution. Nat Jutlandica 15:1-106.
- Kaaber S, Hoegh-Guldberg O (1961) *Aricia allous* Hb. ssp. *vandalica* nov. Flora og Fauna 67: 122-128.
- Kames P (1969) *Aricia artaxerxes* spp. nova hercynica. Nat Jutlandica 15: 107-119.

- Keyser RD, Shreeve TG, Breuker CJ, Hails RS, Schmitt T (2012) *Polyommatus icarus* butterflies in the British Isles: evidence for a bottleneck. *Biol J Linn Soc* 107: 123-136.
- Lacy RC (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J Mammal* 78: 320-335.
- Larson S, Jameson R et al (2002) Loss of genetic diversity in sea otters (*Enhydra lutris*) associated with the fur trade of the 18th and 19th centuries. *Mol Ecol* 11: 1899-1903.
- Luikart G, Allendorf F et al (1998a) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89: 238-247.
- Luikart G, Cornuet J-M (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Biol* 12: 228-237.
- Luikart G, Sherwin WB et al (1998b) Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol Ecol* 7: 963-974.
- Magyari E (2002) Holocene biogeography of *Fagus sylvatica* L. and *Carpinus betulus* L. in the Carpathian-Alpine Region. *Folia Hist - Nat Mus Matraensis* 26: 15-35.
- Malicky H (1969) Übersicht über Präimaginalstadien, Bionomie und Ökologie der mitteleuropäischen Lycaenidae (Lepidoptera). *Mitt Entomol Ges* 19: 25-91.
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Nyström V, Angerbjörn A, Dalén L (2006) Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos* 114: 84-94.
- Obraztsov S (1935) *Lycaena (Aricia) allous* Hb. und ihre östlichen Rassen. *Folia Zool Hydrobiol* 8: 141-150.
- Obraztsov S (1936) Weiteres über *Lycaena (Aricia) allous* Hb. *Folia Zool Hydrobiol* 9: 58-61.
- Peakall ROD, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pecsénye K, Bereczki J et al (2007) High level of genetic variation in *Aricia artaxerxes issekutzi* (Lycaenidae) populations in Northern Hungary. *Nota Lepidopterol* 30: 225-234.
- Piry S, Alapetite A et al (2004) GENECLASS2: A Software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95: 536-539.

- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *J Hered* 90: 502-503.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *P Natl Acad Sci-Biol* 94: 9197-9201.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Ausztria, Bécs. <http://www.R-project.org>
- Schmitt T, Gießl 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, Gießl A, Seitz A (2003) Did *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) have distinct glacial refugia in southern Europe? Evidence from population genetics. *Bio J Linn Soc* 80: 529-538.
- Schmitt T, Seitz A (2001) Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *J Biogeogr* 28: 1129-1136.
- Schmitt T, Seitz A (2002) Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): implications for conservation. *Biol Conserv* 107: 291-297.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman WH and Company, San Francisco.
- Thomas CD, Hill JK, Lewis OT (1998) Evolutionary consequences of habitat fragmentation in a localized butterfly. *J Anim Ecol* 67: 485-497.
- Urbahn E (1964) Neuere Auffassungen in der *Maculineaalcon-rebeli*-Frage (Lepidoptera, Lycaenidae). *Entomol Abh* 32: 69-77.
- Varga Z (1961) Zoogeographical survey of the Macrolepidoptera-fauna of the N-Hungarian Karst area (in Hung. with German summary). *Folia Entomol Hung* 14: 345-386.
- Varga Z (1968) Bemerkungen und Ergänzungen zur taxonomischen Beurteilung und Ökologie der im Karpatenbecken vorkommenden Populationen von *Aricia artaxerxes* Fabr. (= *A. allous* G.-Hb., *A. montensis* Vrtý., Lep. Lycaenidae. *Acta biol Debr* 6: 171-185.

7. FÜGGELÉK

1. függelék: *Aricia artaxerxes issekutzi* minták származási helye. N: mintaszám.

Régió	Populáció	Rövidítés	N		Földrajzi szélesség	Földrajzi hosszúság
			2002	2005		
Aggteleki-karszt	Hačava	Hac	29	36	48°39'57.42"É	20°49'11.39"K
	Haragistya	HHt	50	41	48°31'39.43"É	20°32'10.00"K
	Mogyoróskúti rétek	MMr	-	24	48°32'18.24"É	20°32'31.96"K
	Ménes-völgy	MDe	37	-	48°31'59.65"É	20°35'43.87"K
	Dénes-töbör	Dtb	47	39	48°31'36.19"É	20°33'50.33"K
	Szelcepuszta	Szp	26	32	48°31'21.90"É	20°34'59.34"K
	Lófej-völgy	Lof	-	26	48°30'3.09"É	20°32'41.58"K
	Tohonya-völgy	Toh	46	-	48°29'16.58"É	20°33'0.50"K
	Szőlőhegy	Szh	60	26	48°29'11.29"É	20°34'43.30"K
	Zabanyik	Zab	33	15	48°27'26.88"É	20°37'32.54"K
Bükk	Nagymező	Nme	-	56	48° 4'26.66"É	20°29'43.80"K
	Zsidó-rét	Zsr	18	-	48° 4'5.37"É	20°27'45.33"K
	Fekete-sár	Fes	-	12	48° 4'27.42"É	20°26'45.73"K
	Kecskeláb-rét	Klr	19	-	48° 4'48.59"É	20°31'40.97"K

NYILATKOZAT

Alulírott Rác Rita, mint pályázó, az OTDT szabályzata értelmében nyilatkozom arról, hogy a pályamunkában bemutatott eredmények önálló diákköri keretek között végzett kutatások eredményei.

Rác Rita

Rác Rita
pályázó

