

TDK DOLGOZAT

**Morfológia vs. genetika: egyedek és populációk közötti hasonlóság vizsgálata a görög
karsztvipera (*Vipera graeca*) esetében**

Bancsik Barnabás

Állatorvostudományi Egyetem, Ökológia Tanszék

Biológia BSc. III.

Témavezető:

Dr. Mizsei Edvárd

Projektkoordinátor

Kiskunsági Nemzeti Park Igazgatóság,

Posztdoktor

Debreceni Egyetem, Ökológia Tanszék

Konzulens:

Dr. Szabó Krisztián

Tudományos munkatárs

Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék

Tartalom

1. Rövidítések Jegyzéke.....	4
2. Bevezetés	6
3. Célkitűzések.....	8
4. Anyag és módszer	9
4.1. A vizsgált faj és terület	9
4.2. Viperaegyedek morfológiai mintázása.....	10
4.3. Viperaegyedek genetikai mintázása	12
4.4. DNS izolálás, RADseq-könyvtár készítése és szekvenálás	12
4.5. Radseq adatelőkészítés	13
4.6. Statisztikai elemzések	13
5. Eredmények	17
6. Diskusszió	23
7. Magyar nyelvű összefoglaló	25
8. Angol nyelvű összefoglaló	27
9. Köszönetnyilvánítás.....	29
10. Irodalomjegyzék.....	30

1. Rövidítések Jegyzéke

FA: fluktuáló aszimmetria (fluctuating asymmetry)

DA: irányított aszimmetria (directional asymmetry)

AS: antiszimmetria (antisymmetry)

SL: ajakfeletti pajzsok (supralabialia)

IL: ajakalatti pajzsok (infralabialia)

CO: szemkörüli pajzsok (circumocularia)

LO: szem- és orrpajzsok közötti pajzsok (lorealia)

SNP: egyponthoz nukleotid-polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

FA1: fluktuáló aszimmetria index [1]

FA11: fluktuáló aszimmetria index [1]

FA12: fluktuáló aszimmetria index [1]

F_{IS}: beltenyésztettség koefficiens

LAT: földrajzi szélesség (latitude)

HWe: Hardy-Weinberg-egyensúly (Hardy-Weinberg-equilibrium)

MAF: minor allélgyakoriság (minor allele frequency)

NJ: (neighbour-joining)

TO: Tomorr

KU: Kulmak

GR: Griba

TR: Trebeshinë

LU: Lunxhërisë

LL: Llofiz

DH: Dhëmbel

NE: Nemerçkë

TY: Tymfi

LA: Lakmos

AV: Avgo

TM: Tymfristros

VA: Vardoussia

2. Bevezetés

Az élőhelyek átalakulása egyre növekvő számú fajt érint [2], a korlátozott elterjedés pedig jelentősen növeli a kihalás kockázatát [3]. A *Vipera ursinii-renardi* komplex tagjai (a továbbiakban parlagi viperák) kistermetű hüllők, melyek síkvidéki vagy alpin/szubalpin gyepeken fordulnak elő Eurázsia-szerte [4]. Közülük több, főleg alpin gyepekhez alkalmazkodott taxonok populációi erősen fragmentáltak, ebből kifolyólag sokuk kihalással fenyegetett [4]. Az elszigetelt populációknál az idő haladtával várhatóan megnövekedett mértékű lesz a sztochasztikus allélvesztés (genetikai drift), illetve ezáltal a populációkon belüli genetikai változatosság is csökkenhet [5]. A kis méretű populációknál a genetikai sokféleség csökkenése potenciálisan beltenyésztésből fakadó genetikai depresszióhoz vezethet [6, 7].

A konzervációbiológia egyik kiemelt fontosságú célja annak a feltérképezése, hogy mely populációk a legkitettebbek stresszhatásoknak még azelőtt, mielőtt azok alkalmazkodóképessége súlyosan lecsökkenne [8]. A stresszhatások mérésére széles körben használják fel a biótában észlelhető, kvantifikálható változásokat indikátorként (bioindikátorok) [9]. A fejlődési instabilitás mérésével jó képet kaphatunk arról, hogy egyes populációkat milyen mértékű stresszhatások érnek [10–12]. A fejlődési instabilitás a fejlődési homeosztázistól (egy „ideálisnak” tekintett állapotól) való eltérés, a szervezetek fejlődési folyamatában jelentkező perturbációk morfológiai elváltozásokat okoznak; minél kisebb a stabilitás, annál nagyobb a homeosztatikus értéktől való eltérés valószínűsége [13, 14]. A bilaterális szervezetek jó alanyát képezhetik a szimmetrikus tulajdonságokra épülő fejlődési instabilitásra irányuló kutatásoknak, a kétoldali szimmetria lehetővé teszi a közepes értéktől való eltérések értelmezését és az azokat befolyásoló tényezők tanulmányozását [15].

A bilaterális szervezetek kvantifikálható (merisztikus) szimmetrikus tulajdonságai a *jobb - bal* formula alapján egy sűrűségeloszlás formájában ábrázolható. Ezek a sűrűségeloszlások rendszerint három típusú mintázatot követhetnek [16]. A fluktuáló aszimmetria (FA) különbözik a többi, természetben előforduló aszimmetriára utaló jelenségtől: az irányított aszimmetriától (directional asymmetry, DA) és az antiszimmetriától (AS) [1]. DA-ról akkor beszélünk, ha az egyedekből vett mintánkban statisztikailag szignifikáns különbség van a jobb és a bal oldal között, és – a minta egészét tekintve – mindez az egyik oldal javára lesz

nagyobb, a másikra nézve pedig kisebb [1]. A legvalószínűbb, hogy az adott morfológiai bélyegnél szelekciós nyomás következtében alakul ki DA, ezért nem tartják alkalmasnak a fejlődési instabilitás tanulmányozására [1]. AS-ról akkor beszélhetünk, ha az egyedekből vett mintánkban statisztikailag szignifikáns különbség van a jobb és bal oldalon mérhető értékek között, de egy random egyedekből álló csoporton belül az adott karakter az egyik, egy másikon belül, pedig a másik oldalon lesz nagyobb [1]. A fejlődési instabilitás mérésére AS-t sem használják széles körben, mivel nagy valószínűséggel beszélhetünk olyan instabilitásról, ami adaptív evolúcióban játszik szerepet [11, 17, 18]. A FA esetében olyan mintázatról beszélhetünk, ahol az egyedekből vett mintánkban a „jobb – bal” különbségek átlaga nulla, a változó értékei pedig az átlag körül normális eloszlást mutatnak. Az FA kialakulásának módjára sok elképzelés létezik, de mint a fejlődési instabilitás egy lehetséges következményére az utóbbi évtizedekben egyre növekvő figyelem irányult [19]. FA jellemzésére többféle indexet is kifejlesztettek, Palmer összesen 13 különböző FA-indexet gyűjtött össze (FA1 - FA13), melyek legtöbbször más korrekciós módszert használnak a tulajdonságok átlagos értékére vonatkozóan az egyedek vagy a minták szintjén [1]. Az általunk használt háromféle FA-indexről (FA1, FA11, FA12) részletesebben az Anyag és módszer fejezet Statisztikai módszerek alfejezetében lesz szó.

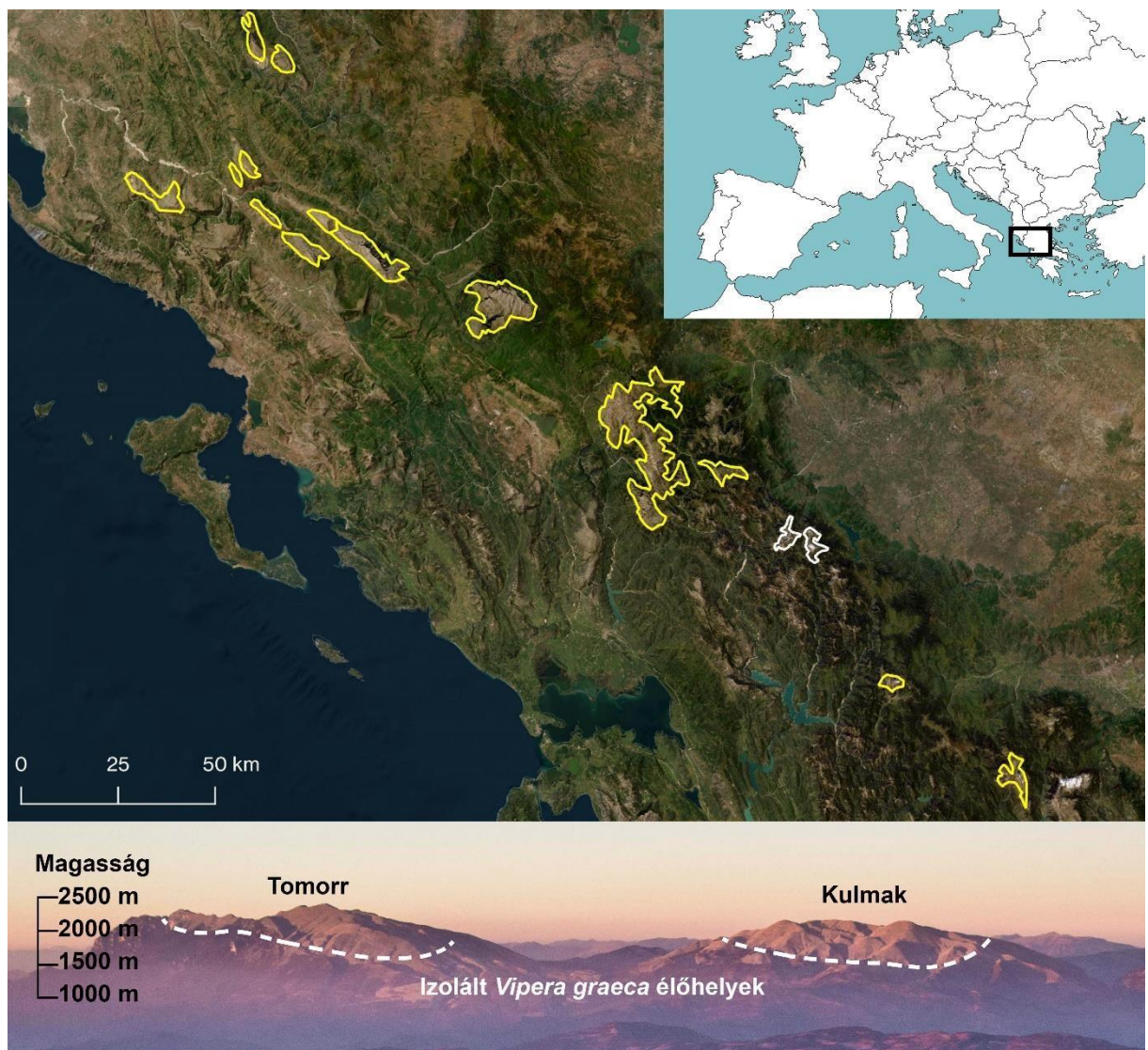
3. Célkitűzések

Dolgozatomban a veszélyeztetett görög karsztvipera (*Vipera graeca*) morfológiai és genomikai (RADseq SNP) adatai alapján vettem össze a populációk elkülönítésének eredményeit. Továbbá megvizsgáltam, hogy a populációk FA-ja függ-e a beltenyésztettség mértékétől, és hogy a földrajzi szélességtől. A vizsgálat fő kérdéseit az alábbiakban határoztam meg: 1) A görög karsztvipera vizsgált populációinak morfológiai és genetikai távolsága között van-e összefüggés? 2) Magyarázza-e a populációk FA-ját a genetikai beltenyésztettség mértéke? 3) A populációk FA-jának van-e valamilyen térbeli mintázata?

4. Anyag és módszer

4.1. A vizsgált faj és terület

A vizsgálatokat a görög karsztvipera (*Vipera graeca* Nilson & Andrén, 1988) populációin végeztük. A *Vipera ursinii-renardi* fajcsoport tagjai – a görög karsztvipera is tartozik – Kelet-Franciaországtól Nyugat-Kínáig terjedtek el különböző füves élőhelyeken, amire valószínűsíthetően az eljegesedéses időszakok (glaciálisok és interglaciálisok váltakozásai) nagy befolyással voltak [20].



1. ábra. Térkép a görög karsztvipera (*Vipera graeca*) elterjedése (fehér és sárga poligonok) és a vizsgált populációk (sárga poligonok)

Az utóbbi időszakban több *V. ursinii-renardi* fajcsoportba tartozó alfaj taxonómiai rangja vált vitatottá. A görög karsztvipérát Nilson és Andrén (1988) *V. u. graeca* néven írták le morfológiai elemzés alapján. Mitochondriális és nukleáris DNS-vizsgálatok segítségével Mizsei faj rangra emelte [21].

A görög karsztvipera ma az IUCN vörös listáján a „veszélyeztetett” besorolás alatt található [22]. Elterjedése Dél-Albániától Görögország középső részéig tartó Hellenidák bizonyos hegycsúcsi régiójában megmaradt szubalpin gyepekre korlátozódik, populációi igen erősen fragmentáltak, a legjobb becslések szerint az élőhelyeinek összkiterjedése nagyjából 252 km² [4, 23–25]. A faj mindössze 18 populációja ismert, ezek a következő hegyeken találhatóak Görögországban: Avgó, Karava, Lakmos-Tzoumerka hegylánc, Tymfi, Tymfistros, Vardoussia, Voutsikaki; és Albániában: Dhëmbel, Kulmak, Llofiz, Lunxhërisë, Griba, Nemerçkë (görögül: Nemertzika), Ostrovicës, Shëndelli, Tomorr és Trebeshinë [22]. Mivel populációi rendkívül kis méretűek és számúak, a faj védelme kiemelt fontosságú [21, 22].

4.2. Viperaegyedek morfológiai mintázása

A morfológiai adatok gyűjtése átfedett a genetikai adatgyűjtés időszakával, ami 2010 és 2019 között zajlott. Összesen $n = 49$ mintavétel történt $n = 15$ populáción. Ezek során összesen $n = 293$ esetben volt sikeres adatfelvétel. Ezen kívül Nilson [4] a rendelkezésünkre bocsátotta az általa mintázott karsztvipera egyedek adatait ($n = 12$), köztük a taxon holotípusát is, így ezeket is fel tudtuk használni a vizsgálatokhoz.

Összesen tehát 305 egyedtől származó morfológiai mintánk volt. Az adatgyűjtés során olyan fényképfelvételeket készítettünk a karsztvipera egyedekről, melyeken kivehetően látszottak a pikkelyeik. Egy fénykép készült az egyedek teljes testének ventrális, valamint dorzális oldaláról, a farkukról ventrális nézetből, illetve a fejről dorzális és laterális irányból.

A teljes testről, a farokról, valamint a fejről készített dorzális nézetű fényképeknek ebben a vizsgálatban nem volt jelentősége, de fontos adatokat szolgáltathatnak a jövőbeni kutatásokhoz (a kígyókra pl. jellemző, hogy a farkhossz és a teljes testhossz aránya ivaronként eltér [26]). A kutatás szempontjából a fejről készült laterális nézetű fényképek voltak a legfontosabbak.



2. ábra. Az általunk vizsgált négy fejpajzsi régióhoz tartozó pikkelyek: 1 - Lorealia (LO), 2 - Circumocularia (CO), 3 - Supralabialia (SL), 4 - Infralabialia (IL)

Ezek segítségével pikkelyszámlálást folytattam négy fejpajzsrégió figyelembevételével. Megszámoltam, hány fejpajzs alkotja a supralabiale (SL), az infralabiale (IL), a lorealia (LO) és circumocularia (CO) régiókat, melyeket a következő képpen definiáltunk: a SL az fejsúcspajzstól (rostrale), azt nem számítva, a szájszegletig és érinti a szájnyílás vonalát. Az IL az állcsúcspajzstól (mentale), azt nem számítva tart a szájszegletig és érint a szájnyílás vonalát. A CO a szemmel határos pikkelyeket foglalja magába, leszámítva a szem feletti pajzsot (supraocularia). A LO a CO és az orrpajzsok (nasale) között laterális elhelyezkedésű pajzsok. Ezek az egyedek jobb és bal oldalára nézve szimmetrikus fejpajzsrégiók, melyek

lehetővé teszik a FA indexek számítását, illetve kompozíciójuk eltéréseit tekintve az egyedek és a populációk közötti történő összehasonlítást.

4.3. Viperaegyedek genetikai mintázása

A rendelkezésemre bocsátott genetikai adatok, Mizsei Edvárd doktori disszertációjának [27] részét képezték, ezért azok feldolgozási módja átfed az itt kifejtettekkel. A gyűjtés során ügyeltünk arra, hogy a mintavétel a lehető legtöbb *V. graeca* populációt lefedje ($n = 18$ populációból $n = 14$). Mivel a faj nehezen megtalálható, kriptikus életmódú, így intenzív keresésre volt szükség, amit minden év viperákra nézve aktív időintervallumában hajtottunk végre. A mintavétel időszaka 2010-től 2019-ig, minden évben áprilistól szeptemberig tartott. A szövetmintákat a hasi pikkelyek bemetszésével vagy a farok végének lecsippentésével gyűjtöttük helyi fertőtlenítést követően. A kezelt egyedeket mindig a befogás pontos helyén engedjük szabadon.

4.4. DNS izolálás, RADseq-könyvtár készítése és szekvenálás

A begyűjtött szövetmintákból a teljes genomi DNS-t egy alkohol-alapú kicsapási módszerrel [28] izolálták. Röviden, a szövetmintákat lízispufferbe helyezték és proteináz K-t (Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, USA) adtak hozzá, majd egy éjszakán át 55°C-on inkubálták. Ezután az ammónium-acetátot adtak hozzá a fehérjék eltávolításához, majd jéghideg izopropanol segítségével kicsapatták a DNS-t. A kicsapódott DNS-t centrifugálással ($15.000 \times g$ 10 percig) pelletizálták. Majd 70%-os etanollal kétszer leöblítették, a pelletet végül 10mM Tris-HCl (pH = 8,5) oldatban oldották fel.

Az izolált DNS mintákat koncentráció (RNS- és fehérjetartalom) és integritás szempontjából 1,5%-os agaróz gélen vizsgálták, majd a kettős szálú DNS (dsDNS) koncentrációját a Thermo Fisher Qubit v.3 fluorométerrel mérték meg a Qubit dsDNS HS Assay alkalmazásával. A RADseq-könyvtár előkészítéséhez minden mintából 210 ng dsDNS-t használtak kiindulási mennyiségként. Ehhez útmutatásként Baird és mtsai [29] által előírt protokollt használták fel néhány kisebb változtatással, melyeket Szatmári és mtsai [30] részleteztek. A közel rokon parlagi vipera *V. ursinii* feltételezett mérsékelt genommérete (2,18 Gbp, <https://goat.genomehubs.org/>) alapján a dsDNS kezdetirestrikciós emésztésére gyakran vágó pstI enzimet (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) alkalmaztak. A végső

könyvtárat egy Illumina NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) készülékkel szekvenálták „single-end” szekvenálási opciót választva a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában.

4.5. Radseq adatelőkészítés

Az nyers NextSeq olvasásokat először a Stack v.2.2 process_radtags moduljával [31] demultiplexálták. A közel rokon faj, a keresztes vipera (*Vipera berus*) „draft” genomja alapján egy referencia-alapú egyszálas nukleotid-polimorfizmus (SNP)-hívást alkalmaztak a Stacks ref_map moduljával az összes alapértelmezett beállítással (bwa 0.7.17) [32]. A filogenetikai elemzésekhez az összes SNP-t variant call formátumba (vcf) exportálták a Stacks populations moduljával, majd tovább szűrték a vcftools v.0.1.16 [33] szoftver segítségével, amelynél egy lókusznak legalább az egyedek 60%-ában jelen kellett lennie, 0,26 minimális minor allélgyakoriság (minor allele frequency, maf) mellett, azaz minden allélnek legalább két egyedben kellett jelen lennie. Ezt az adatkészletet (a továbbiakban „allSNPs”) olyan filogenetikai elemzésekhez alkalmazták, amelyeknél minden SNP-t felhasználtak a Hardy-Weinberg-egyensúlytól (HWe) való esetleges eltérésüktől vagy kapcsolódásuktól függetlenül [34]. Érzékenyebb populációgenetikai elemzés céljából egy második adatkészletet állítottak elő a Stacks populations moduljával, ami csak egyetlen, véletlenszerű SNP-t tartalmazott minden RAD-lókuszból, ezáltal csökkentve a kapcsoltságot (a továbbiakban „rndSNPs”). Az eredményül kapott változatok szintén átestek egy minőségre vonatkozó szűrésen, amelyet a vcftools segítségével hajtottak végre, melynél a lókuszek 40%-os hiányát (site missingness), maf = 0,26-t, 2 és 100 közötti olvasási mélységet kértek, valamint a változatok HWe-t $p = 0,05$ szinten korlátozták. Végül az allSNPs adatkészlet szűrt vcf fájlját vcf2phylip.py Python szkripttel [35] alakították át a későbbi filogenetikai elemzésekhez fasta és nexus formátumokba, az rndSNPs adatkészletet pedig az R (R Core Team) környezetbe importálták a vcfR v.1.10 [36] segítségével.

4.6. Statisztikai elemzések

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a görög karsztvipera populációinak morfológiai és genetikai távolsága között van-e összefüggés, kiszámítottuk a morfológiai és genetikai adatok alapján az egyedek közötti távolságot. A négy morfológiai bélyeg esetében a

távolságmátrixot a stat csomag dist funkciójával hoztuk létre, a „Manhattan” módszert alkalmazva (R Core Team 2023). A morfológiai adatokon alapuló távolságmátrixot a hierarchikus klaszterezéssel ábrázoltuk.

A genetikai távolság méréséhez kiszámítottuk a Nei-féle páronkénti genetikai távolságot [37] a minták között a StAMPP v.1.6.2 szoftverrel [38], majd a távolságot ape v.5.5 csomaggal [39] egy neighbour-joining (NJ) fa létrehozásával vizualizáltuk. A populációk között morfológiai és genetikai távolság közötti összefüggést lineáris modellel vizsgáltuk, ahol a morfológiai távolság volt a függő, és a genetikai távolság volt a magyarázó változó.

Vizsgáltuk, hogy magyarázza-e a populációk FA-ját a genetikai beltenyésztettség mértéke. Ehhez az elemzéshez az FA számítása Palmer útmutatása alapján [1] történt. Az általunk választott FA-index típusok közül kettő (FA11, FA12) több különböző jelleget vesz alapul az elemzésekhez, a mi esetünkben ez a négy fejpajzsrégiót (SL, IL, LO, CO), illetve az azokhoz tartozó pikkelyszámokat jelentette, a harmadik általunk használt FA-index (FA1) a leggyakrabban használt aszimmetria-indexek egyike [1].

FA1: Ez a gyakran használt index egy jelleg jobb és bal oldali értékének abszolút különbségét mutatja meg: $|J-B|$ Előnye az egyszerűsége mellett, hogy egy intuitívan is értelmezhető aszimmetriára vonatkozó számértéket kapunk általa; a minta szórásának becslése torzítatlan marad; jól használható több bélyeg összehasonlítására; nem annyira érzékeny a kiugró értékekre. Hátránya, hogy DA vagy AS adatokra torzított lesz [1].

FA11: egy egyedre vonatkozó aszimmetria $(A_i) = \sum |J - B|$ minden jellegre nézve; a mintára vonatkozó index pedig $\sum A_i / N$, ahol N = a mintában szereplő egyedek száma [40]. Az index előnye, hogy könnyen kiszámolható; kiválasztásában közre játszott továbbá, hogy több jelleg által hordozott információt kombinál, és ezáltal az egy egyedre számolt átlagos szimmetriaértékre pontosabb becslést ad, ahol minden tulajdonság szimmetriától való átlagos eltérése összehasonlítható; minden jellegből származó információt egyetlen, a mintánkra vonatkozó indexben kombinálja. Meg kell jegyezni, hogy az index alkalmazása nem ajánlott, ha DA vagy AS lehetősége merül fel a mintára vonatkozóan, mivel ilyenkor torzított becslést adhat. További hátránya, hogy elfedi a jellegek közötti variabilitásbeli különbségeket; maguk az eredményül kapott értékek nem hasonlíthatók össze más tanulmányokban kapottakkal; és végül torzulhat, ha egy vagy néhány jelleg variábilisabb, mint a többi [1].

FA12: egy egyedre vonatkozó aszimmetria (A_i) = az egyedben lévő aszimmetrikus jellegek összessége, független attól, hogy milyen nagy az eltérés a két oldal között; a mintára vonatkozó index pedig $\sum A_i / N$, ahol N = a mintában szereplő egyedek száma. Szintén könnyen kiszámolható; kiválasztásában közre játszott továbbá, hogy több jelleg által hordozott információt kombinál, és ezáltal az egy egyedre számolt átlagos szimmetriaértékre pontosabb becslést ad; minden jellegből származó információt egyetlen, a mintánkra vonatkozó indexben kombinálja. Kisebb az esélye, hogy torzított lesz néhány szélsőséges értéktől vagy szélsőségesen variábilis jellegtől, mint FA11. FA12 csak merisztikus vagy fenodeviánsként („normálistól” jelentősen eltérő) azonosított jellegekre alkalmazható érvényesen. Az index alkalmazása nem ajánlott, ha DA vagy AS lehetősége merül fel a mintára vonatkozóan, mivel ilyenkor torzított becslést adhat; elfedi a jellegek közötti variabilitásbeli különbségeket. További hátránya, hogy kevésbé képes feltárni az egyedek közötti átlagos aszimmetriakülönbségeket, mint az FA11; illetve maguk az eredményül kapott értékek nem hasonlíthatók össze más tanulmányokban kapottakkal. Palmer javaslata szerint FA12-t FA11-el egyidejűleg érdemes használni, hogy az eredményeink megbízhatóságát növeljük [1].

A genetikai beltenyésztettség mérésére az F statisztikák gyakran használt és számos intézkedést megalapozó mérőszámok. Sewall megkülönböztette az egyedek teljes populációra nézett beltenyésztettségét az egyedek részpopulációra (populációfragmentumra) vonatkoztatott beltenyésztettségétől (F_{IS}) [41]. Ahogy a többi F statisztika, így az F_{IS} is a véletlenszerű párosodástól való eltérést tükrözi (HWe) populációkon belül és között, valamint tükrözi az allélgyakoriságokban jelentkező eltéréseket populációfragmentumok között. Az F_{IS} koefficiens az alábbi egyenlet segítségével adható meg: $F_{IS} = 1 - H_0/H_S$, ahol H_S a HWe alapján várt átlagos heterozigótia a populációfragmentumokban. Ha a populációfragmentumokban a heterozigóták aránya kicsi ($F_{IS} > 0$), akkor nem-random szaporodás miatt kialakuló beltenyésztettségre következtethetünk [42]. A beltenyésztési együttható (F_{IS}) kiszámítását a hierfstat v.0.5-7 verziójával végeztük el [43]. Az FA és a F_{IS} közötti kapcsolat vizsgálatához lineáris modellt alkalmaztunk, amelyekben az FA11 és a FA12 volt a függő változó, míg az F_{IS} a magyarázó változó.

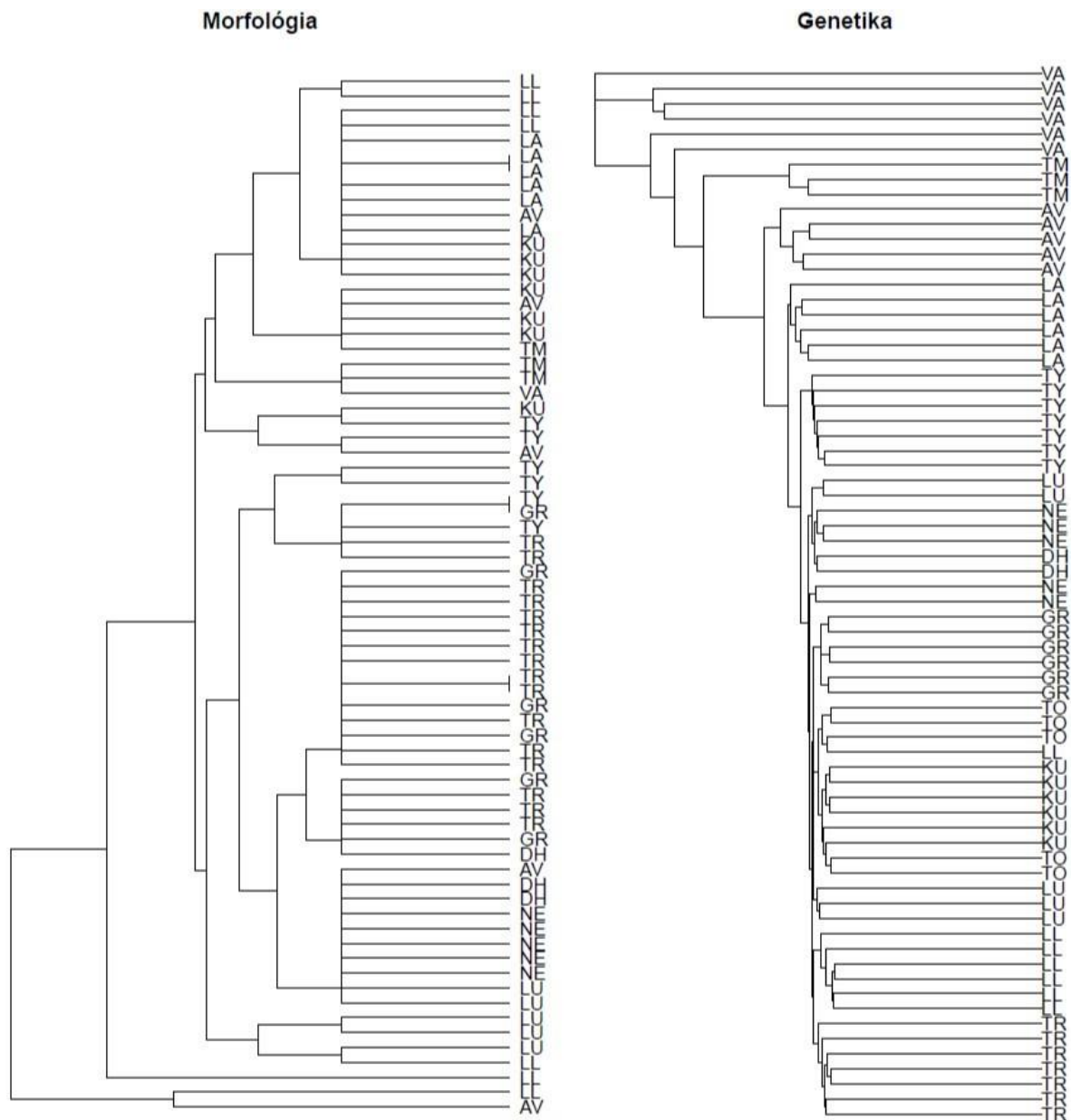
A *V. graeca* állományok egy észak-déli grádiens mentén helyezkednek el, ezért a populációkra jellemző FA értékek térbeli mintázatát a szélességi (LAT) elhelyezkedésük szerint is vizsgáltuk. A FA és a LAT közötti kapcsolat vizsgálatához lineáris modellt alkalmaztunk, amelyekben az FA11 és az FA12 volt a függő változó, míg a LAT a magyarázó változó.

5. Eredmények

A vizsgálat teljes időtartama alatt (2010 és 2019 között) összesen 14 populáción vettünk fel morfológiai adatokat. A következő populációkról sikerült morfológiai adatot gyűjteni: Avgo (7), Dhëmbel (14), Griba (7), Karava (1), Kulmak (23), Lakmos (31), Llofiz (18), Lunxhërisë (25), Nemerçkë (23), Shendelli (1), Tomorr (34), Trebeshinë (75), Tymfi (41), Vardoussia (17). Mindemellett $n=12$ egyed adatait Nilson és mtsai. a rendelkezésünkre bocsátották, a beleértve holotípus adatit is. Így összesen $n = 329$ egyedet fogtunk, de ezek közül csak $n = 305$ egyed adatait tudtuk az elemzésekhez felhasználni (néhány egyednél inkomplett adatfelvétel történt).

A genetikai adatok, amelyeket a RADseq SNP-elemzés során nyertünk, szignifikáns különbséget mutattak a populációk között. Az összesen 14 populációból gyűjtött 70 genetikai és az ugyanezekhez az egyedekhez tartozó morfológiai minták alapján a genetikai és morfológiai távolságok kiszámításával dendrogramot állítottunk fel (3. ábra), előbbihez Manhattan-, utóbbihoz Nei-féle távolságmátrixot használva. A morfológiai távolságok alapján a populációk nem alkotnak önálló klasztereket, a legtöbb klaszterben az egyedek populációtól függetlenül csoportosulnak. Kivévtelt képez a Nemerçkë populáció, ahonnan az egyedek mindegyike egy klaszterben szerepelnek, viszont ebben is előfordulnak más populációk egyedei (Avgo, Dhëmbel, Lunxhërisë).

A genetikai RADseq adatok alapján számolt Nei-féle távolság értékekből létrehozott NJ dendrogramon hat elkülönülő csoportot azonosítottunk, amelyekből öt a populációknak megfeleltethető, ezek a Vardoussia, a Tymfristros, az Avgo, a Lakmos és a Tymfi populációk.

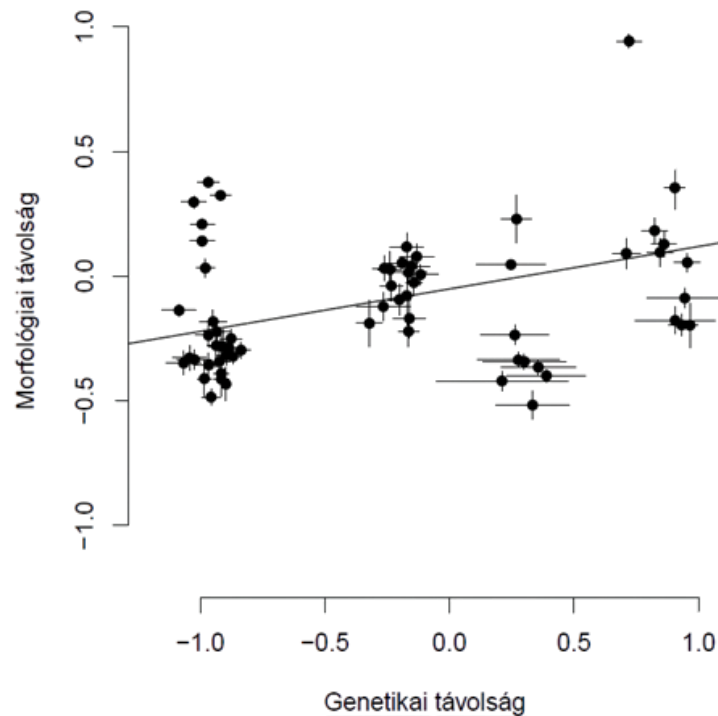


3. ábra. A görög karsztvipera (*Vipera graeca*) morfológiai és genetikai távolságain alapuló dendrogramok. Az ágvégeken a populációk rövidített kódját ábrázoltuk. A morfológiai távolság alapján a populációk nem alkotnak önálló klasztereket, a legtöbb klaszterben az egyedek populációtól függetlenül csoportosulnak. Ezzel ellentétben a genetikai távolság alapján a populációk a legtöbb esetben önállóan alkotnak egy-egy klasztert.

A hatodik csoportot az albániai populációk alkotják, amelyen belül a Griba, a Kulmak, és a Trebeshinë populációk önálló klasztereket alkotnak, míg a Nemerçkë, a Llofiz, a Lunxhërisë, a Tomorr és Dhëmbel populációk egyedei a dendrogram több alcsoportjában is megjelennek.

A populációk közötti átlag Nei-féle genetikai távolság szignifikáns pozitív módon magyarázta (becslés = $0,17020 \pm 0,03448$ SE; $t = 4,936$; $p < 0,0001$) a populációk közötti

morfológiai távolságot (4. ábra), azonban a lineáris modell illeszkedése alacsony volt ($R^2 = 0,253$).

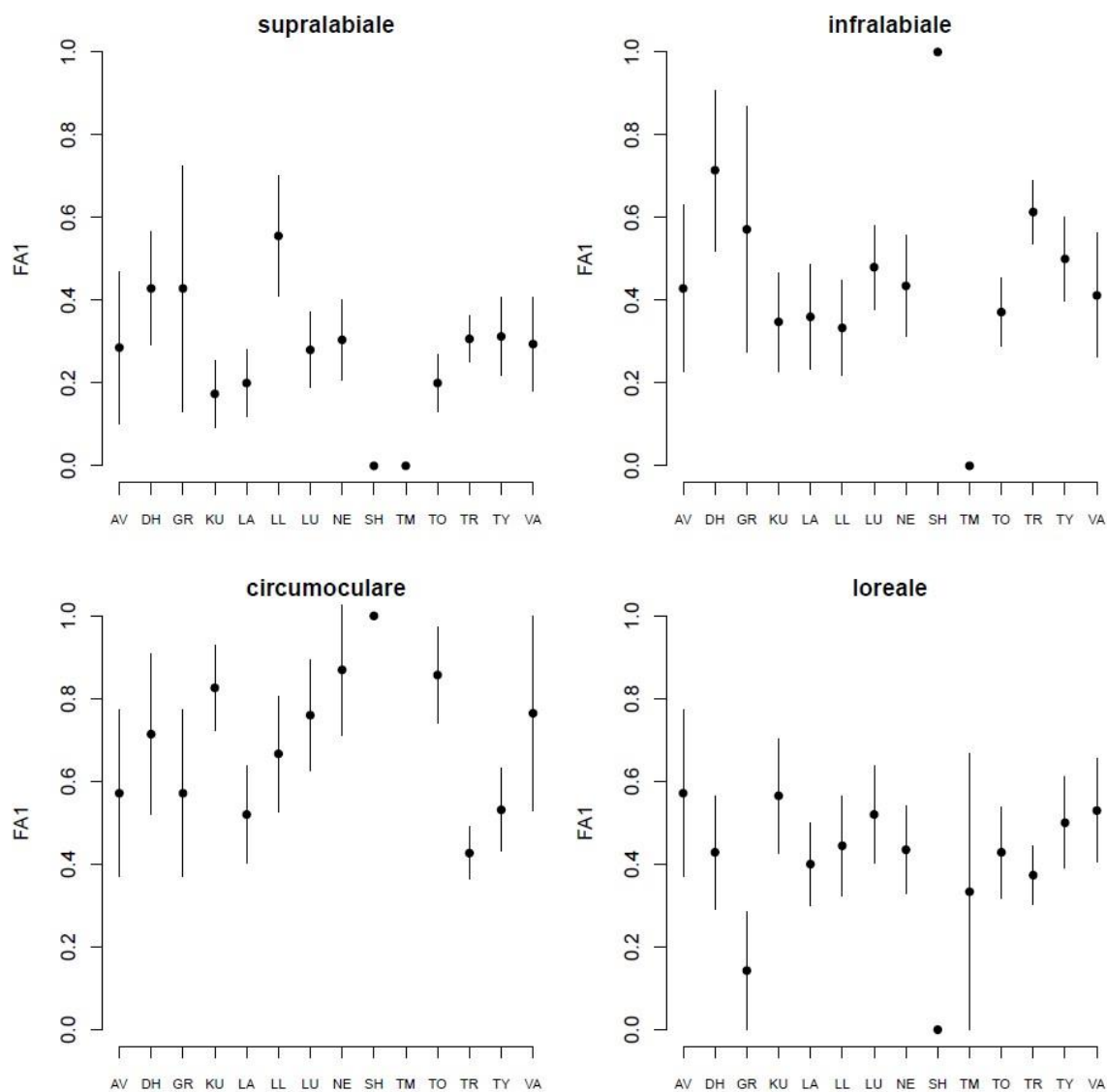


4. ábra. Morfológiai és genetikai távolságok populációpáronként. A genetikai Nei-távolság szignifikáns módon magyarázta a morfológiai távolságot, azonban a lineáris modell illeszkedése alacsony volt.

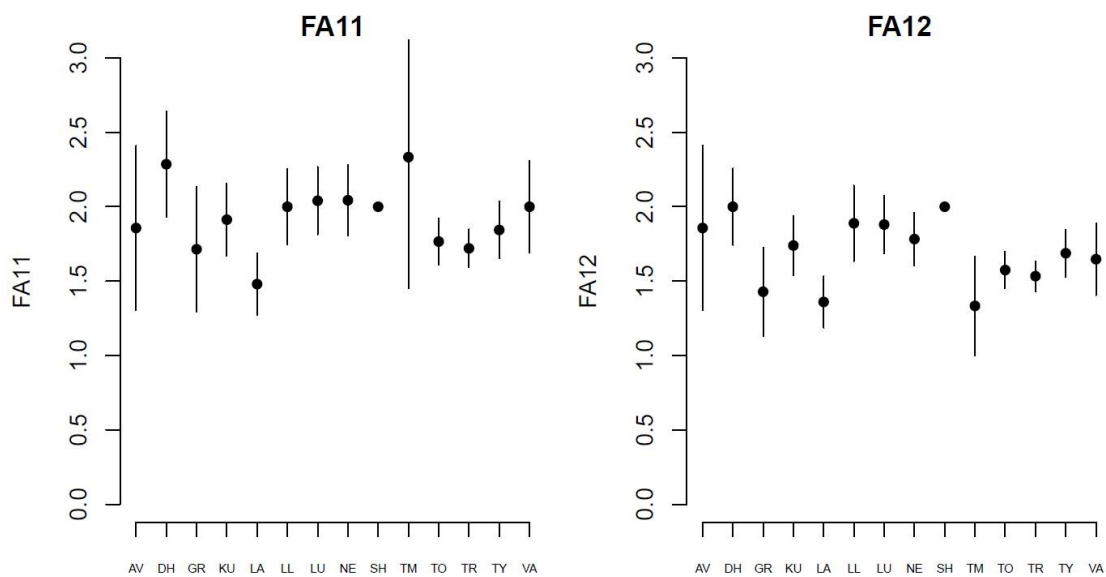
A morfológiai jellegek közül, a SL átlag FA1 értéke a Llofiz populációban volt a legmagasabb, míg az IL FA1 értéke a Dhëmbel populációban volt magas (5. ábra). A CO esetében a Nemerçkë és a Tomorr populációk mutattak magasabb értékeket, a LO esetében pedig az Avgo populáció, bár ennél a morfológiai karakternél a populációk elég hasonló értéket mutattak (5. ábra). A több karaktert is figyelembe vevő FA11 és FA12 esetében a Tymfristros és a Dhëmbel populációk mutatták a legmagasabb értékeket (6. ábra).

A többváltozós morfológiai karakterek alapján számolt FA11 és FA12 értékek nem mutattak összefüggést a RADseq adatokból számított Fis értékekkel (7. ábra, FA11: becslés = $0,3142 \pm 0,9902$ SE; $t = -0,317$; $p = 0,757$; FA12: becslés = $-0,08639 \pm 0,90999$ SE, $t = -0,095$; $p = 0,926$).

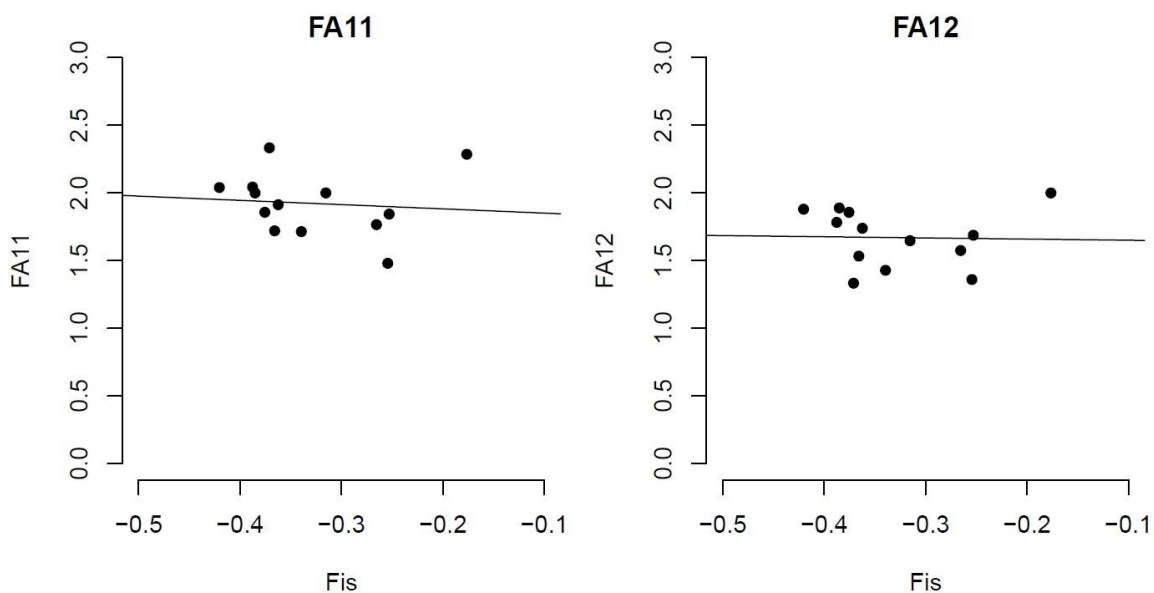
Az FA11 és FA12 értékekre nem volt hatással a populációk földrajzi szélesség szerinti elhelyezkedése (8. ábra, FA11: becslés = $0,003631 \pm 0,116131$ SE; $t = 0,031$; $p = 0,976$; FA12: becslés = $0,03833 \pm 0,11860$ SE; $t = 0,323$; $p = 0,753$).



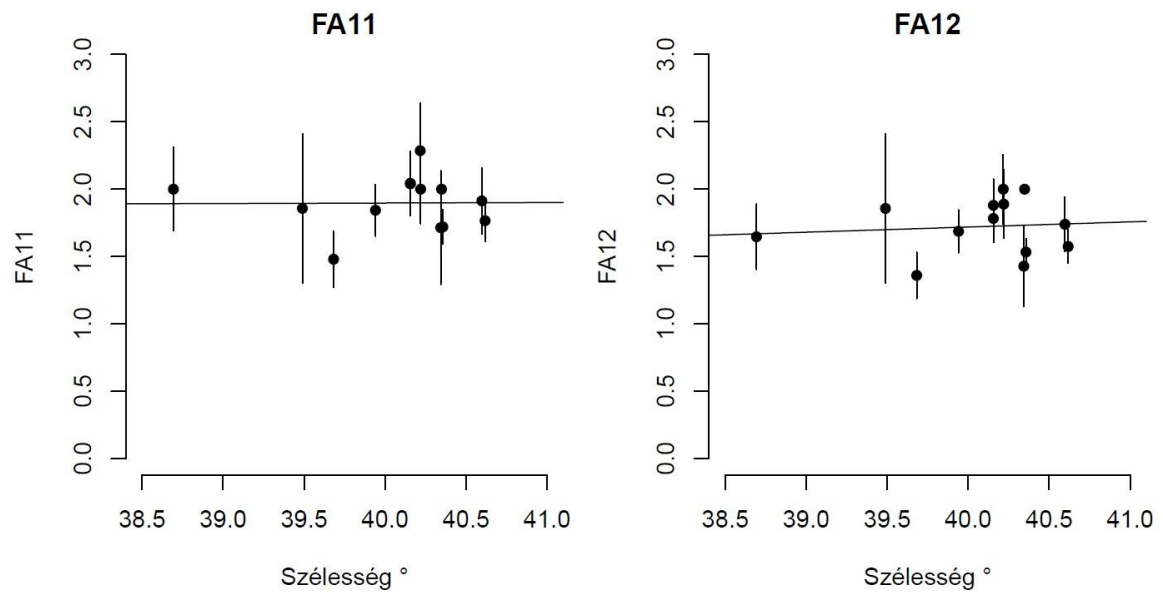
5. ábra. Az FA1 fluktuáló aszimmetria index értéke populációnként külön-külön a négy morfológiai jellegre nézve



6. ábra. Az FA11 és az FA12 fluktuáló aszimmetria indexek populációnként



7. ábra. FA11 és FA12 fluktuáló aszimmetria indexek nem mutattak összefüggést a beltenyésztettség mértékét jelző F_{IS} koefficienssel



8. ábra. Az FA11 és az FA12 fluktuáló aszimmetria indexek nem mutattak összefüggést a földrajzi szélességgel

6. Diszkusszió

Vizsgálataink a görög karsztvipera (*Vipera graeca*) populációk genetikai és morfológiai jellemzőit hasonlították össze. Először is, érdemes megjegyezni, hogy a genetikai és morfológiai távolságok alapján készített dendrogramok különböző eredményeket mutattak. Míg a genetikai Nei-féle távolságok alapján a 13 populáció jól elkülönülő csoportokat alkotott, a morfológiai adatok alapján viszont a populációk nem alkottak szigorúan elkülönülő klasztereket, tehát a genetikai jellemzők erőteljesebben követik a populációk elkülönülését, míg a morfológiai jellemzők nagyobb változékonyságot mutatnak, és nem alkalmasak a populációk elkülönítésére. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy nem volt cél filogenetikai törzsfa felállítása, sem a genetikai, sem a morfológiai távolságokon alapuló dendrogram nem tükrözheti teljes mértékben a leszármazási kapcsolatokat.

Az átlagos Nei-féle genetikai távolság pozitív összefüggést mutatott a morfológiai távolsággal, ami alapján a genetikai és a morfológiai különbségek közötti kapcsolat nem elhanyagolható. Habár a morfológiai távolság alapján nem lehetett a populációkat elkülöníteni, de a genetikailag közelebbi populációk között a morfológiai távolság kisebb volt, tehát a populációk differenciáltsága megmutatkozik a morfológiai bélyegeken is. A lineáris modell illeszkedése alacsony volt, ami azt jelenti, hogy a genetikai különbségek csak részben magyarázzák a morfológiai különbségeket. Ez arra utalhat, hogy más tényezők is befolyásolják a morfológiai változékonyságot, például a környezeti különbségek vagy a természetes szelekció. Az eredmények alapján egy olyan összetett kép rajzolódik ki, amely azt mutatja, hogy a populációk közötti morfológiai különbségek nem egyszerűen a genetikai különbségeken alapulnak. Lehetséges, hogy a populációk közötti különbségeket több tényező is befolyásolja, beleértve a környezeti különbségeket és az adaptációs folyamatokat. Fontos lenne további kutatásokat végezni a populációk közötti különbségek és az ökológiai tényezők közötti kapcsolat jobb megértése érdekében.

A populációgenetika, a környezeti stressz és ezeknek a tényezőknek a kombinációja növelheti a populáció FA-ját [44]. Mivel a görög karsztvipera élőhelyének fragmentumai nem nagy kiterjedésűek, beltenyésztettségéből adódó genetikai depresszió súlythatja. Vollestad (1999) összehasonlítása alapján a heterozigócia és a fejlődési instabilitás között többnyire gyenge negatív korreláció van [45]. Ennek nem teljesen ellentmondva a mi

eredményeinknél az FA11 és FA12 értékek közötti változékonyság nem mutatott szignifikáns összefüggést a genetikai adatok alapján számolt F_{IS} értékekkel, és nem volt hatással a földrajzi szélesség elhelyezkedésére. Ezért feltételezzük, hogy a genetikai háttér, vagy a hőmérsékleti viszonyok helyett más környezeti hatások befolyásolják a FA mértékét. Kizárólag genetikai diverzitás általában nem magyarázza az eredményül kapott FA értékeket [46], így az általunk vizsgált morfológiai jellemzők aszimmetriáját is magyarázhatják egyebek mellett a populációk közötti különbségek, amelyek más, pl. élőhelyi tényezők miatt alakulhatnak ki.

Előfordul, hogy kevés jelleggel operáló kutatások nem kapnak eredményül összefüggést a fejlődési instabilitás és a heterozigócia között. Ismert, hogy a fejlődési instabilitás mértéke eltérhet a jellegek között [47], ezért mi több (négy) jellegre számoltunk FA-indexeket, de még több jelleget vizsgálva valószínűleg még pontosabb képet kaphatnánk. A vizsgálatban pontatlansághoz vezethet, hogy nem minden populációról sikerült kellő mennyiségű morfológiai mintát gyűjteni, így ezek értelmezésekor óvatosan kell eljárunk. Tovább növelhetné a pontosságot, ha az FA értékeket, illetve a morfológiai klaszterezést geometrikus morfometriával is vizsgálnánk. A geometrikus morfológia egy erőteljes kvantitatív eszköz, melyet előszeretettel alkalmaznak élőlények különböző morfológiai karaktereinek varianciájának és más változókkal való kovarianciájának összehasonlítására [48, 49].

Ezen eredmények hozzájárulhatnak a görög karsztvipera populációk állapotának jobb megértéséhez. Az ökológiai és evolúciós kontextusban ez az információ segíthet megérteni, hogyan alkalmazkodik a faj különböző környezeti feltételekhez és esetlegesen, hogy milyen lépéseket tehetünk a faj hosszútávú megőrzése érdekében.

7. Magyar nyelvű összefoglaló

Morfológia vs. genetika: egyedek és populációk közötti hasonlóság vizsgálata a görög karsztvipera (*Vipera graeca*) esetében

Az élőlények változatosságának jellemzésére széleskörben alkalmazunk morfológiai és genetikai adatokat. Veszélyeztetett populációk esetében különösen fontos a változatosság feltárása, a jelentősen elkülönülő és genetikai leromlással fenyegetett populációk azonosítása, mert az ilyen információk nélkül nehezebbé válik a természetvédelmi beavatkozások tervezése. A genetikai vagy genomikai módszerek elterjedése előtt kizárólag morfológiai bélyegek alapján próbálták a populációk állapotát és esetleges különbözőségeit megbecsülni. Már ekkor is ismert volt a konzervációbiológusok előtt, hogy az alacsony változatosságú, esetleg beltenyésztett populációk fokozott figyelmet érdemelnek, ezért ennek indikátoraként megjelent a fluktuáló aszimmetria (FA) vizsgálata. A kétoldali szimmetriával rendelkező állatok embrionális fejlődését zavaró környezeti vagy genetikai hatások összefüggésben állnak az alapvetően szimmetrikus morfológiai bélyegek aszimmetriájának mértékével.

Dolgozatomban a veszélyeztetett görög karsztvipera (*Vipera graeca*) morfológiai és genomikai (RADseq SNP) adatai alapján vetem össze az egyedek és populációik elkülönítésének eredményeit. Továbbá megvizsgálom, hogy van-e összefüggés a FA és a beltenyésztettség között, és hogy az élőhelyek klimatikus viszonyokkal kapcsolatban álló földrajzi szélesség befolyásolja-e ezeket a mérőszámokat.

16 karsztvipera-populáció 305 egyedében végeztünk FA-méréseket (négy morfológiai bélyegen), és 72 egyed SNP adatait bocsátották rendelkezésemre ezekből a populációkból. A morfológiai és genetikai hasonlóság vizsgálatához Euklidészi és Nei-féle távolságmátrixokat hoztunk létre, és klaszterezést alkalmaztunk. A FA jellemzésére három indexet, a beltenyésztettség mérésére pedig F_{IS} értékeket számítottunk.

Az egyedek a morfológiai bélyegek alapján nem mutattak populációk szerinti klasztereződést, míg a genomi adatok alapján a populációk zöme külön ágat alkotott. A populációk közötti morfológiai és genomi távolságmátrixok között nem találtam összefüggést. Az egyedek és populációk aszimmetriája nem mutatott összefüggést a beltenyésztettségük mértékével a populációk földrajzi (latitudinális) helyzetével.

Az eredmények alapján, a görög karsztvipera esetében a vizsgált morfológiai bélyegek szerint nem különülnek el olyan jól a populációk, míg a genomi adatok egyértelműen alkalmasak az elkülönítésre. A FA mértékét valószínűleg nem a populációk genetikai állapota, hanem inkább az embriók fejlődését zavaró környezeti tényezők (pl. klimatikus viszonyok) befolyásolhatják.

8. Angol nyelvű összefoglaló

Morphology vs genetics: Exploring similarities between individuals and populations in the case of the Greek Meadow Viper (*Vipera graeca*)

Morphological and genetic data are widely employed in characterizing the diversity of organisms. This exploration of diversity is particularly crucial for endangered populations, as it aids in identifying significantly distinct populations that may be threatened by genetic deterioration. Without such information, conservation efforts become more challenging to plan.

Before the invention of genetic and genomic methods, state and divergence of populations could only be assessed based on morphological traits. Even before the widespread use of molecular genetic techniques, conservation biologists recognized the importance of low diversity or potentially inbred populations. Consequently, assessment of fluctuating asymmetry (FA) emerged as an appropriate indicator. FA, which pertains to asymmetry in morphological traits in bilaterally symmetric animals, has been associated with environmental or genetic factors that perturb embryonic development and is linked to the extent of asymmetry in basic morphological traits.

In this study, we compared the results of differentiating individuals and populations of the endangered Greek Meadow Viper (*Vipera graeca*) based on morphological and genomic (RADseq SNP) data. Additionally, we investigated whether there is a correlation between FA and inbreeding. Furthermore, we examined the influence of habitat size and temperature on the latter values.

We collected morphological FA data from 305 viper individuals across 16 populations, focusing on four morphological traits. Furthermore, we obtained RADseq SNP data from 72 individuals belonging to these populations. To assess morphological and genetic similarity, we constructed Euclidean and Nei distance matrices and employed clustering methods. We calculated three indices for characterizing FA (FA1, FA11, FA12) and measured genomic inbreeding using F_{is} values derived from genomic data.

Based on the morphological traits, individuals did not cluster according to populations, while the genetic data clearly separated most populations into distinct branches. No correlation was found between morphological and genomic distance matrices among populations. FA values

for individuals and populations did not show a correlation with inbreeding values, but both were influenced by the geographic (latitudinal) position of populations.

In conclusion, in the case of the Greek Meadow Viper, the examined morphological traits are not suitable for distinguishing populations, whereas genomic data are highly effective for this purpose. The presence of FA is likely influenced not by the genetic state of populations but rather by environmental factors that disrupt embryonic development, such as climatic conditions.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Mizsei Edvárdot az adatgyűjtés és a vizsgálat részleteinek kidolgozásában és végrehajtásában nyújtott hatalmas segítségéért; konzulensem, Dr. Szabó Krisztiánt, aki a kevés rendelkezésre álló idő ellenére hasznos tanácsokkal tudott szolgálni. Köszönöm továbbá a terepi adat- és mintagyűjtésben résztvevő több, mint 20 önkéntes kutató és hallgató munkáját; Dr. Göran Nilsonnak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az általa gyűjtött *V. graeca* egyedek morfológiai adatait; illetve köszönöm azoknak a személyeknek és szervezeteknek, akik a genomikai vizsgálat labormunkálatait lehetővé tették és elvégezték.

10. Irodalomjegyzék

1. Palmer AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow TA (ed) *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 335–364
2. Brooks T, Kennedy E (2004) Biodiversity barometers. *Nature* 431:1046–1047
3. Malcolm JR, Liu C, Neilson RP, Hansen L, Hannah L (2006) Global Warming and Extinctions of Endemic Species from Biodiversity Hotspots. *Conservation Biology* 20:538–548. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00364.x>
4. Nilson G, Andrén C (2001) The Meadow and steppe vipers of Europe and Asia - The *Vipera* (Acridophaga) *ursinii* complex. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 47:87–267
5. Miles LS, Rivkin LR, Johnson MTJ, Munshi-South J, Verrelli BC (2019) Gene flow and genetic drift in urban environments. *Molecular Ecology* 28:4138–4151. <https://doi.org/10.1111/mec.15221>
6. Keyghobadi N (2007) The genetic implications of habitat fragmentation for animals This review is one of a series dealing with some aspects of the impact of habitat fragmentation on animals and plants. This series is one of several virtual symposia focussing on ecological topics that will be published in the Journal from time to time. *Can J Zool* 85:1049–1064. <https://doi.org/10.1139/Z07-095>
7. Madsen T, Stille B, Shine R (1996) Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* 75:113–118. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00067-4](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00067-4)
8. Clarke GM (1995) Relationships Between Developmental Stability and Fitness: Application for Conservation Biology. *Conservation Biology* 9:18–24. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.09010018.x>
9. Holt EA, Scott WM Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education* (2):8
10. Leung B, Forbes MR, Houle D Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Stress: Comparing Efficacy of Analyses Involving Multiple Traits
11. Leary RF, Allendorf FW (1989) Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Stress: Implications for Conservation Biology. 4:
12. Said A, Ross M, Trout K, Zhang J (2007) Simulation of Surface Water for Un-Gauged Areas with Storage-Attenuation Wetlands. *J Am Water Resources Assoc* 43:546–556. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2007.00043.x>
13. Klingenberg CP A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms

14. Zakharov VM, Pankakoski E, Sheftel BI, Peltonen A, Hanski I (1991) Developmental Stability and Population Dynamics in the Common Shrew, *Sorex araneus*. *The American Naturalist* 138:797–810
15. Palmer AR, work(s): CSR (1986) Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:391–421
16. Valen LV (1962) A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution* 16:125.
<https://doi.org/10.2307/2406192>
17. Graham JH, Freeman DC, Emlen JM Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica* 89, 121–137 (1993).
<https://doi.org/10.1007/BF02424509>
18. McKenzie JA, Clarke GM (1988) Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *lucilia cuprina*. *Genetics* 120:213–220.
<https://doi.org/10.1093/genetics/120.1.213>
19. Dongen SV (2006) Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *J Evolution Biol* 19:1727–1743.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01175.x>
20. Ferchaud A, Ursenbacher S, Cheylan M, Luiselli L, Jelić D, Halpern B, Major Á, Kotenko T, Keyan N, Behrooz R, Crnobrnja-Isailović J, Tomović L, Ghira I, Ioannidis Y, Arnal V, Montgelard C (2012) Phylogeography of the *Vipera ursinii* complex (Viperidae): mitochondrial markers reveal an east–west disjunction in the Palaearctic region. *Journal of Biogeography* 39:1836–1847.
<https://doi.org/10.1111/j.13652699.2012.02753.x>
21. Mizsei E, Jablonski D, Roussos SA, Dimaki M, Ioannidis Y, Nilson G, Nagy ZT (2017) Nuclear markers support the mitochondrial phylogeny of *Vipera ursinii*–renardi complex (Squamata: Viperidae) and species status for the Greek meadow viper. *Zootaxa* 4227:.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4227.1.4>
22. IUCN (2017) *Vipera graeca*: Mizsei, E., Szabolcs, M., Dimaki, M., Roussos, S.A. & Ioannidis, Y.: The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T53789650A53790137
23. Dimitropoulos A (1985) First records of Orsini's viper, *Vipera ursinii* (Viperidae) in Greece. *Annales Musei Goulandris* 319-323.
24. Nilson G, Andren C (1988) A new subspecies of the subalpine meadow viper, *Vipera ursinii* (Bonaparte) (Reptilia, Viperidae), from Greece. *Zool Scripta* 17:311–314.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.1988.tb00106.x>
25. Mizsei E, Üveges B, Vági B, Szabolcs M, Lengyel S, Pfliegler WP, Nagy ZT, Tóth JP (2016) Species distribution modelling leads to the discovery of new populations of one of the least known European snakes, *Vipera ursinii graeca*, in Albania. *Amphib Reptilia* 37:55–68. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003031>

26. Shine R, Olsson MM, Moore IT, LeMaster MP, Mason RT (1999) Why do male snakes have longer tails than females? *Proc R Soc Lond B* 266:2147–2151. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0901>
27. Mizsei E (2021) A görög karsztvipera (*Vipera graeca*) bizonyíték-alapú védelmét megalapozó multidiszciplináris kutatások
28. Cserkész T, Aczél-Fridrich Z, Hegyeli Z, Sugár S, Czabán D, Horváth O, Sramkó G (2014) Rediscovery of the Hungarian birch mouse (*Sicista subtilis trizona*) in Transylvania (Romania) with molecular characterisation of its phylogenetic affinities. *Mammalia* 0: <https://doi.org/10.1515/mammalia-2013-0167>
29. Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3:e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
30. Szatmári L, Cserkész T, Laczkó L, Lanszki J, Pertoldi C, Abramov AV, Elmeros M, Ottlecz B, Hegyeli Z, Sramkó G (2021) A comparison of microsatellites and genomewide SNPs for the detection of admixture brings the first molecular evidence for hybridization between *Mustela eversmanii* and *M. putorius* (Mustelidae, Carnivora). *Evolutionary Applications* 2286–2304
31. Rochette NC, Rivera-Colón AG, Catchen JM (2019) Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology* 28:4737–4754. <https://doi.org/10.1111/mec.15253>
32. Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM
33. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, McVean G, Durbin R, 1000 Genomes Project Analysis Group (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27:2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
34. Leaché AD, Oaks JR (2017) The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 48:69–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022645>
35. Ortiz EM *vcf2phylip v2.0: convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis*
36. Knaus BJ, Grünwald NJ (2017) *VCFR : a package to manipulate and visualize variant call format data in R*. *Molecular Ecology Resources* 17:44–53. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12549>
37. Nei MNR (1972) Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106:283–292
38. Pembleton LW, Cogan NOI, Forster JW (2013) *St AMPP : an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations*.

- Molecular Ecology Resources 13:946–952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12129>
39. Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
 40. Leary RF, Allendorf FW, Knudsen KL (1985) Developmental instability and high meristic counts in interspecific hybrids of salmonid fishes. *Evolution* 39:1318–1326. <https://doi.org/10.1111/j.15585646.1985.tb05697.x>
 41. Wright s (1951) Fisher and Ford on “the Sewall Wright effect.” *American Scientist* 39:452–458, 479
 42. Frankham R, Ballou JD, Ralls K, Eldridge M, Dudash MR, Fenster CB, Lacy RC, Sunnucks P (2017) Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations, 1st ed. Oxford University PressOxford
 43. Goudet J (2005) Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical Fstatistics. *Molecular Ecology Notes* 5:184–186. <https://doi.org/10.1111/j.14718286.2004.00828.x>
 44. Lens L, Van Dongen S, Galbusera P, Schenck T, Matthysen E, Van De Castele T (2000) Developmental instability and inbreeding in natural bird populations exposed to different levels of habitat disturbance. *J Evolution Biol* 13:889–896. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00232.x>
 45. Vollestad LAsbj, Hindar K (1999) A meta-analysis of fluctuating asymmetry in relation to heterozygosity. *The Genetical Society of Great Britain* 83:206–218
 46. Goessling JM, Rebois K, Godwin JC, Birkhead R, Murray CM, Hermann SM Differences in Fluctuating Asymmetry Among Four Populations of Gopher Tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Herpetological Conservation and Biology*
 47. Palmer AR, Strobeck C (1997) Fluctuating asymmetry and developmental stability: heritability of observable variation vs. heritability of inferred cause. *J evol biol* 39–49
 48. Lele S, Bookstein FL (1999) Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. *Journal of the American Statistical Association* 94:340. <https://doi.org/10.2307/2669711>
 49. Kaliontzopoulou A (2011) Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation in amphibians and reptiles. *bah* 25:5–32. <https://doi.org/10.11160/bah.11016>

Témavezetői nyilatkozat TDK dolgozathoz

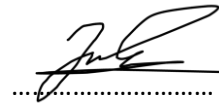
Dr. Mizsei Edvárd

Alulírott , mint témavezető nyilatkozom, hogy (név) Bancsik Barnabás, III.

évfolyamos hallgató „Morfológia vs. genetika: egyedek és populációk közötti hasonlóság vizsgálata a görög karsztvipera (*Vipera graeca*) esetében” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi

Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. év 10. hó 23. nap



témavezető