

Kárpátokon innen és túl – Genetikai variabilitás közönséges denevér (*Myotis myotis*) kolóniákban

(V. Magyar Denevérvédelmi Konferencia, Pécs – 2005. december 3-4.)

Bücs Szilárd¹ – Nagy Zoltán² – Boldogh Sándor³ – Popescu Octavian¹

¹Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Románia

²Iskola Alapítvány, Kolozsvár, Románia

³Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság

Inside and around the Carpathians – Genetic variability in Greater Mouse-Eared bat *Myotis myotis* colonies

In order to demonstrate the existence of a significant level of genetic variation and differentiation between Greater Mouse-Eared bat *Myotis myotis* colonies across the Carpathian region and to overcome the lack of information about this region in other, Western European studies, we sampled and genotyped 100 individual bats from five representative locations across the Carpathian region for five nuclear microsatellite loci. All colonies show elevated levels of allelic and genetic diversity, with only minor differences between the diversities of colonies located in caves or buildings. Our results indicate a great differentiation (high and significant FST) between colonies, which can point to their different origin from Europe. But using only non-coding microsatellites to conclude facts is misleading, because they are not prone to selective pressure, and therefore in the near future we will analyze these colonies on the mtDNA level, by direct sequencing of the mtDNA control region or partially the *cyt b* gene, and extend the survey to further colonies across the Carpathian region.

Bevezetés

Napjaink biológiai kutatásaiban elhanyagolhatatlan tényezővé nőtte ki magát a molekuláris biológia, mely módszereivel és alkalmazási területének sokféleségével új, eddig még feltáratlan értelmezési tartományokat és nézőpontokat szolgáltathat adataink számára. A természetvédelem és direkt alkalmazásainak jelentős fejlődése maga után vont a természetes populációk, illetve fajok egyre több irányból való megismerésének szükségét, ezek között fontos szerepet tulajdonítva a populáció-, illetve filogenetikai megközelítésnek. A molekuláris biológia módszerei több szerveződési szintre is kiterjedhetnek (egyedi, populációs, faji, fajok közti, stb.), ezáltal egy átfogóbb értelmezést nyújtva azoknak. Mindezen alkalmazások előfeltétele a genetikai módszerek és genetikai markerek ugrásszerű fejlődése volt. Napjainkban

azonban a hangsúly egyre inkább az adatelemzési módszerek fejlődésének irányába tolódik el, az elemzendő adatok szintén nagy változatossága és az adatok egységesítése miatt.

A denevérek (Chiroptera) rendje több mint ezer fajjal az egyik legváltozatosabb rend az emlősök között. Számos denevérfaj veszélyeztetettsége és ez által közvetlen védelmének szüksége a kutatási eredmények tükrében egyre nyilvánvalóbbá válik, mely védelmet Európában (és világszinten) törvények sora és különböző egyezmények biztosítják (Stebbing, 1988). A közönséges denevér *Myotis myotis* egy Európában és a Közel-Keleten általánosan elterjedt faj (Mitchell-Jones et al., 1999). Számos nagy egyedszámú kolóniával rendelkezik, ezért az IUCN nem sorolja a veszélyeztetett denevérfajok közé. Kivételt képeznek a nyugat európai kolóniák, melyek állománya csökkenőben van (Hutson et al., 2001). A faj

alkalmi vándorló és megtalálható úgy barlangi (főképp Dél- és Közép-Európában), mint mesterséges (főleg Észak-Európában) élőhelyeken (épületek, stb.). Keleti elterjedésének határa Európában a Keleti-Kárpátok vonalán található, ettől keletebbre már csak a *M. m. omari* alfaj jelenléte figyelhető meg (Arletta, 1995). A közönséges denevér számos genetikai szintű kutatás alanyát képezte és képezi (Castella & Ruedi 2000, Castella et al., 2000, Ruedi & Castella 2003), mely kutatások elsődleges célja a faj európai populációinak genetikai jellemzése, valamint az utolsó eljegesedés (kb. 18.000 év) utáni rekolonizációs folyamatok és irányvonalak meghatározása. Ezen kutatások 24, főleg nyugat-európai kolóniát tanulmányoztak (Ibériai-félsziget - 6, Alpok - 14, Kelet-Európa - 1, Dél-Európa - 3), a mitokondriális DNS és különböző mikroszatelliták változatosságának mérésével. Az eredmények a faj nagymértékű genetikai változatosságát mutatják, míg a rekolonizációs folyamat vizsgálata az Ibériai félszigetet jelöli meg az Európát benépesítő populációk forrásterületeként. A balkán-félszigeti, illetve olaszországi kolóniák sajátos genetikai mintázatot mutatnak, ami arra enged következtetni, hogy ezek a kolóniák nem vettek részt Európa rekolonizációs folyamataiban. Ezek a tanulmányok, illetve következtetések, főképp a rekolonizációs forrásterület holléte szempontjából figyelmen kívül hagyják a kelet- és dél-európai közönséges denevér kolóniák kisszámú jelenlétét a végső kiértékelésben (4 a 24-ből), annak ellenére, hogy ezek elemzése alátámasztja a fent említett tanulmányok végső következtetéseit.

Célok és módszerek

A létező tanulmányok (Castella & Ruedi 2000, Castella et al., 2000, Ruedi & Castella 2003) hiányosan elemzett területén (Kelet Európa) számos, nagy egyedszámú közönséges denevér kolónia található, melyek eredete különbözhet a nyugat európai kolóniáktól. Az itt található kolóniák becsült populációnagysága jóval meghaladja az 50.000 egyedet, ezen érték pedig jelentős genetikai változatosságot képviselhet a faj európai kolóniái között. További érvek e terület tanulmányozása mellett a Kárpát

medence földrajzi helyzetéből adódik (jelentős kiterjedésű hegyvonulatok veszik körül), mely egy relatív magas fokú genetikai izoláltságot eredményezhet, valamint a Kárpátok hegyvonulatának északi és keleti vonalai (a Tátra északi és a Keleti Kárpátok keleti vonala) és a Kárpát medence különböző evolúciós csoportok találkozási pontjai lehetnek. Jelen tanulmány e hiányosan kiértékelt területeket célozza meg, a faj öt reprezentatív kolóniájának genetikai elemzése által, egyrészt az intrakolóniális genetikai variabilitás mérése, másrészt a különböző kolóniák közötti evolúciós kapcsolatok felderítése révén.



1. ábra. Jelen kutatás alapját képező közönséges denevér *Myotis myotis* kolóniák földrajzi elhelyezkedése a Kárpátok régiójában (eredeti forrás: <http://vmek.oszk.hu>, szerző: Zentai László)

Molekuláris markerként a nukleáris mikroszatellitákat alkalmaztuk, melyek ismétlődő aleggységekből álló, információt nem hordozó DNS szakaszok. Hosszuk átlagosan pár száz bázispár, öröklődésük biparentális. Nagyfokú változatosságuk egy adott populáción, fajon belül a repetitív aleggység ismétlődésének fokából adódik (Jarne & Lagoda, 1996). Ennek ellenére a különböző mikroszatelliták egyediek, mely tény lehetővé tette az ún. DNS-ujjlenyomat módszer kidolgozását és elterjedését az individuális azonosításban és a populációgenetikában is. Jelen tanulmányban a mikroszatelliták hosszának meghatározása standard DNS genotipizálással történt, 5 nukleáris mikroszatelita esetében.

Adatgyűjtés és adatelemzés

Jelen tanulmány alapjául szolgáló közönséges denevér kolóniák elszórtan helyezkednek el a Kárpát medence és a Kárpátok régiójában, a közöttük levő fizikai távolság minden párosítás esetében meghaladja a 250 km-t. Három kolónia Románia, egy Magyarország, egy pedig Lengyelország területén található. Az élőhelyekre vonatkozó jellegzetességeket és a kolóniák jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze (lásd még 1. ábra).

1. táblázat. Jelen kutatás alapját képező közönséges denevér *Myotis myotis* kolóniák paraméterei (jelölések: RO – Románia, HU – Magyarország, PL – Lengyelország, Sz/H – szélesség/hosszság, Tszf. – tengerszint feletti magasság). A barlangok esetében a földrajzi koordináták és magasságok a legközelebbi települést jelzik.

Helység	Típus	Földrajzi elhelyezkedés	Tszf.	Egyedszám
Esküllő (Aștileu)	barlang	Királyerdő (Pădurea Craiului) hgys., RO	366 m	4000-5000
Fusteica	barlang	Vulkán (Vîlcan) hgys., RO	437 m	2500-3000
Vasláb (Voșlăbeni)	épület	Gyergyói (Gheorgheni) medence, RO	977 m	400-500
Kelemér	épület	Borsod-Abaúj-Zemplén megye., HU	345 m	300-400
Krynica	épület	Sadecki Beskid hgys., PL	646 m	200-250

A DNS izolálás standard fenol-kloroform extrakcióval történt. Az elemzett öt fajspecifikus mikrosatelita lókuszt a következők: A13, C113, D9, E24, G25 (Castella & Ruedi, 2000). A lókusztok PCR-al való felsokszorozása Castella & Ruedi (2000) tanulmányának feltételeit követte, az individuális reakcióoptimalizáláshoz szükséges módosításokkal (primer kapcsolódási hőmérséklet, illetve magnézium koncentráció). Minden lókuszt esetében a forward primert fluorescens 6-FAM csoporttal jelöltük. A PCR reakciókat egy Mastercycler (Eppendorf) készülékben végeztük. A PCR termékek elektroforézise egy ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készülékben történt, az allélok hosszát a GeneScan 3.7 program (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg.

Az adatok kiértékelését az ARLEQUIN 2.0 (Schneider et al., 2000) populációgenetikai programcsomag alkalmazásával végeztük. Intrakoloniális szinten meghatároztuk a lókuszonkénti (M_L) és kolóniánkénti (M_I) allélpolimorfizmust, a

A mintavételezés az öt élőhelyen a május-augusztusi periódusban (2004-ben ill. 2005-ben) jelen levő szülőkolóniákból történt, kolóniánként 20-20 egyedből, melyek számottevő aránya adult nőstény volt. A mintavételezés Worthington Wilmer & Barratt (1996) denevérekből való szövetminta vételre vonatkozó protokollját követte. Begyűjtésük után egy-, másfél órával a befogott egyedeket szabadon engedték. A mintákat abszolút alkoholban, -20°C -on tároltuk a további felhasználásig.

géndiverzitást (D_A) (2. táblázat) és teszteltük az esetleges szignifikáns eltéréseket a Hardy-Weinberg egyensúlytól. Interkoloniális szinten meghatároztuk az összallélpolimorfizmust (M_A), az átlagos géndiverzitást (M_{DA}) és a kolóniák közötti differenciálódást (F_{ST}), valamint ennek páronkénti kolóniák közötti értékeit (2. és 3. táblázat).

Eredmények

A 100 individuális denevérminta genotipizálása az 5 mikrosatelita lókuszt nézve összesen 130 különböző allélt eredményezett. Minden kolónia esetében lehetséges volt a különböző allélok azonosítása, egy lókuszt esetében sem találtunk null-allélt. Minden lókuszt polimorf (min. 2, max. 23 allél), együttes elemzésük egy magas összallélpolimorfizmust mutat ($M_A=11.92$). A legnagyobb polimorfizmussal az E24 lókuszt rendelkezik ($M_L=20.2$), míg a legkevésbé polimorf a C113 lókuszt ($M_L=3.8$), valamint a G25 lókuszt. Ez utóbbi főképp a

Vaslábi kolóniában jelen levő megközelítőleg teljes fixálódás miatt (2 allél, 19 homozigóta és 1 heterozigóta). Minden kolónia esetében magas az intrakoloniális allélpolimorfizmus

(min. 9.8, max. 13.2), egy szintén magas összallél-polimorfizmust eredményezve (2. táblázat).

2. táblázat. Az individuális lókuszpolimorfizmus (M_I), az intrakoloniális allélpolimorfizmus (M_I) és az összallélpolimorfizmus (M_A) összefoglalása, az egyes kolóniák allélszámaival. A táblázat utolsó oszlopa az intrakoloniális géndiverzitást (D_A) és az átlagos géndiverzitást (M_{DA}) tartalmazza.

Kolóniák	Lókuszek					M_I	D_A
	A13	C113	D9	E24	G25		
Esküllő	17	3	17	23	6	13.2	0.842308
Fusteica	14	3	13	23	6	11.8	0.805641
Vasláb	18	5	16	20	2	12.2	0.709744
Kelemér	16	5	17	20	7	13	0.846667
Krynica	12	3	13	5	6	9.8	0.797436
M_L	15.4	3.8	15.2	20.2	5	$M_A=11.92$	$M_{DA}=0.8003592$

A vizsgált kolóniák magas átlagos géndiverzitással rendelkeznek ($M_{DA}=0.8003592$), a legdiverzebbek az esküllői ($D_A=0.842308$) és a keleméri ($D_A=0.846667$) kolóniák. A legalacsonyabb (de még mindig megfelelően magas) géndiverzitással a vaslábi kolónia rendelkezik ($D_A=0.709744$) (2. táblázat). A

barlangi és épületlakó kolóniák diverzitási értékeinek átlaga nem mutat számottevő különbséget (0.823974 versus 0.784615). Egyik kolónia esetében sem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a Hardy-Weinberg egyensúlytól.

3. táblázat. Páros F_{ST} értékek a vizsgált kolóniák esetében ($p<0.05$).

	Esküllő	Fusteica	Vasláb	Kelemér	Krynica
Esküllő	0.0000	-	-	-	-
Fusteica	0.02459	0.0000	-	-	-
Vasláb	0.15707	0.11588	0.0000	-	-
Kelemér	0.08655	0.08065	0.10615	0.0000	-
Krynica	0.09855	0.11481	0.19316	0.12791	0.0000

A kolóniák páronkénti differenciálódási értékeit (F_{ST}) a 3. táblázat foglalja össze. A kolóniák közötti különbségek minden párosítás esetében magas értékkel rendelkeznek és szignifikánsak ($p<0.05$). A legnagyobb hasonlóság az esküllői és fusteicai kolóniák között található ($F_{ST}=0.02459$), míg a legnagyobb különbségek a vaslábi kolónia esetében észlelhetők, összehasonlítva ezen kolóniát bármely másikkal (lásd még 3. táblázat). Az egyetlen kivétel a Krynica-Kelemér párosítás esetében tapasztalható, melyek egymástól

való differenciálódási értéke szintén magas ($F_{ST}=0.12791$).

A géndiverzitás jelentős része (90.76%) a kolóniákon belül van elosztva, míg kisebb része (9.34%) tulajdonítható csupán a kolóniák közötti különbségeknek. Ezen értékek szemben állnak a magas átlagos differenciálódási értékkel ($F_{ST}=0.11148$), mely nagyfokú különbségekre enged következtetni a vizsgált kolóniák között.

Következtetések

A közönséges denevért egyes szerzők (Castella & Ruedi 2000, Castella et al., 2000, Ruedi & Castella 2003) mint nemvándorló fajt írják le, ennek ellenére bizonyított egy közepes távolságú (pár 100 km) vándorlási képesség (Mitchell-Jones et al., 1999, Topál, 1956). Ez alapján (és feltételezve egy sikeres szaporodást a célterületen) a különböző földrajzi egységek kolóniáinak genetikai mintázata nagyfokú hasonlóságot kellene mutasson. Castella & Ruedi (2000) tanulmányában a spanyolországi és marokkói kolóniák régiókon belül csak csekély mértékben tértek el egymástól, ezzel szemben a régiók egymással való összehasonlítása szignifikáns differenciálódást mutatott ki a Gibraltár szoros két partja között. A Kárpátok régiójában vizsgált közönséges denevér kolóniák genetikai diverzitása magas és egyenletesen elosztott a mintavételi területen. A magas diverzitás a mikroszatelliták nem kódoló jellegével és ezáltal a szelekciós nyomás hiányával magyarázható. A diverzitásbeli eltérés a barlangi és épületlakó kolóniák között csekély, mely arra enged következtetni, hogy a géndiverzitás független az élőhely típusától vagy korától. A differenciálódás vizsgálata nagyfokú és szignifikáns eltéréseket mutatott ki a különböző kolóniák összehasonlítása esetében. Ezen különbségek korrelálhatóak a kolóniák közötti földrajzi távolságok nagyságával és a faj diszperziós képességével, de alternatív módon feltételezhető egy származásbeli különbség is. Az előbbi esetben a krynicai kolónia és a vaslábi kolónia között tapasztalt legnagyobb különbség a génáramlást akadályozó számos fizikai barrierek (a Tátra és a Keleti Kárpátok vonulata) tulajdonítható. Ezzel ellentétben a Kelemér – Esküllő – Fusteica vonalon tapasztalt magas hasonlóság a fizikai barrierek hiányának vagy csekély jelenlétének és a közöttük levő rövid földrajzi távolságoknak tulajdonítható, főképp a Kelemér – Esküllő párosítás esetében (lásd még 1. ábra). Az alternatív hipotézis (származási különbség) esetében a Kelemér – Esküllő – Fusteica vonal egy evolúciós irányt képviselne, mely a Balkán félszigetről származhat. Továbbá Ruedi & Castella (2003) tanulmánya alapján, a lengyelországi közönséges denevér kolóniák, tehát

feltételezhetően a krynicai kolónia is az Alpok északi vonalán keresztül, az ibériai félszigetről származhat. A vaslábi kolónia esetében, ami a faj keleti elterjedési határán található, az itt tapasztalható legalacsonyabb genetikai változatosság izoláltságot, valamint ezen kolóniának a lengyel kolóniától való szignifikáns különbsége egy Balkán félszigeti származást jelezhet. Mindezen elméletek további kutatást és bizonyítást (vagy cáfolatot) igényelnek, mivel a jelen kutatás eredményei és következtetései levonása kizárólag a mikroszatelliták alkalmazásával részlegesnek mondható. Ezen szekvenciák, nemkódoló jellegükkel fogva nincsenek kitéve szelekciós nyomásnak, továbbá biparentális öröklődésük nem tükrözi a nemek esetleges vándorlási irányát és mértékét. Ez kiküszöbölhető, ha a mikroszatelliták alkalmazása más genetikai markerekkel párhuzamosan történik. A mitokondriális DNS tartalmaz úgy kódoló, mint nem kódoló szekvenciákat is. A kódoló szekvenciákban fellépő esetleges mutációk konkrét fenotipikus következményekkel járhatnak, ezáltal fellép a szelekciós nyomás, a mtDNS nem kódoló szekvenciái pedig hasonló vagy magasabb mutációs rátával rendelkeznek, mint a nukleáris markerek, tehát kellőképpen változatosak populációs szinten. Továbbá, a mtDNS kizárólag anyai ágon öröklődik, ezáltal tanulmányozása egy reális képet adna a faj diszperziós képességéről és az ez által keletkezett evolúciós vonalokról. A jövőben sor kerül további kolóniák elemzésére mikroszatelliták szintjén, valamint a teljes mintaspektrum mitokondriális DNS szintjén való elemzésére, a mtDNS kontrol régió vagy a *cyt b* gén részleges szekvenálása alapján. Végül sor kerül a Kárpát régió és a nyugat európai adatok összehasonlítására, egy átfogó képet nyerve ezáltal a közönséges egérfülű denevér genetikai mintázatáról és a rekolonizációs folyamatokról Európában.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Dóczy Annamáriának, Székely Dénesnek és Tomasz Postawanak, a romániai illetve lengyelországi mintavételben nyújtott segítségükért. Köszönet illeti továbbá Ferencz Beatrixet és Péntes Zsoltot a laboratóriumi és statisztikai elemzésben nyújtott segítségükért. Nagy Zoltán munkáját

2005-ben a Domus Hungarica Junior ösztöndíjjal támogatta. A kutatást részben a BP Conservation Programme finanszírozta.

Irodalom

- Arlettaz R. (1995): Ecology of the sibling Mouse-Eared bats (*Myotis myotis* and *Myotis blythii*): Zoogeography, Niche, Competition and Foraging. Horus Publishers, Martigny, Switzerland
- Castella V., Ruedi M., (2000): Characterization of highly variable microsatellite loci in the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Ecology*, Primer Notes 9:1000-1002
- Castella V., Ruedi M., Excoffier L., Ibanez C., Arlettaz R., Hausser J. (2000): Is the Gibraltar Strait a barrier to gene-flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Molecular Ecology* 9:1761-1772
- Castella V., Ruedi M., Excoffier L. (2001): Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14:708-720
- Hutson A. M., Mickleburgh S., Racey P. (2001): *Microchiropterans Bats: global status survey and conservation action plan*, IUCN, Cambridge, United Kingdom
- Jarne P., Lagoda P. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11, no.10
- Mitchell-Jones A. J., Amori G., Bogdanowitz W., Krystufek B., Reijnders P. J. H., Spitzenberger F., Stubbe M., Thissen J. B. M., Vorhalik V., Zima J. (1999): *The atlas of European mammals*, T & AD Poyser, London, United Kingdom
- Ruedi M., Castella V. (2003): Genetic consequences of the ice ages on nurseries of the bat *Myotis myotis*: a mitochondrial and nuclear survey. *Molecular Ecology* 12:1527-1540
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000): ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. Genetics Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland
- Stebbing R.E. (1988): *Conservation of European Bats*. Christopher Helm, London, United Kingdom
- Topál Gy. (1956): The movements of bats in Hungary, *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 7:477-489
- Worthington Wilmer J., Barratt E. (1996): A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of Chiropterans. *Bat Research News* 37:1-3