

**RAGADOZÓ-INDUKÁLT PLASZTIKUS VÁLASZOK BARNA
VARANGY (*BUFO BUFO*) EBIHALAK KÉMIAI VÉDEKEZÉSÉBEN ÉS
VISELKEDÉSÉBEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette: Kurali Anikó

Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport
Növényvédelmi Intézet
Agrártudományi Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

Állatrendszertani és Ökológiai Tanszék
Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezetők:

Hettyey Attila PhD
tudományos főmunkatárs

Tóth Zoltán PhD
tudományos főmunkatárs

ELTE Biológia Doktori Iskola
Iskola vezető: Prof. Erdei Anna

Zootaxonómia, Állatökológia, Hidrobiológia Doktori Program
Programvezető: Prof. Török János



Budapest
2018

Tartalomjegyzék

Áttekintés	3
Bevezetés.....	4
Célkitűzések	12
Vizsgálati módszerek	16
1. Első fejezet: A leadott mérég mennyiségi meghatározása és a mérég újratermelődési sebességének megállapítása a barna varangy ebihalakban	21
1.1. A kényszerített mérgelegadás rövidtávú hatása a barna varangy ebihalakra	21
1.1.1. <i>Anyag és módszer</i>	21
1.1.2. <i>Statisztikai elemzés</i>	23
1.1.4. <i>Értékelés</i>	26
1.2. Bufadienolid mérgeanyagok újratermelődésének sebessége barna varangy ebihalakban.....	27
1.2.1. <i>Anyag és módszer</i>	27
1.2.2. <i>Statisztikai elemzések</i>	29
1.2.3. <i>Eredmények</i>	31
2. Fejezet: A kémiai védekezés lehetséges költségeinek és egyéb, ragadozók elleni védelmi mechanizmussal való csereviszonyának vizsgálata.....	41
2.1. <i>Anyag és módszer</i>	41
2.2. <i>Statisztikai elemzés</i>	43
2.3. <i>Eredmények</i>	44
2.4. <i>Értékelés</i>	48
3. Fejezet: Barna varangy ebihalak kémiai védekezése a természetben: környezeti faktorok szerepe a populációk közötti eltérésekben	52
3.1. <i>Anyag és módszer</i>	52
3.2. <i>Statisztikai elemzések</i>	56
3.4. <i>Értékelés</i>	64
4. Fejezet: A viselkedési plaszticitás időbeli változásának vizsgálata ragadozóveszély és táplálékforrás függvényében barna varangy ebihalaknál	69
4.1. <i>Anyag és módszer</i>	69
4.2. <i>Statisztikai elemzés</i>	70
4.3. <i>Eredmények</i>	70
4.4. <i>Értékelés</i>	73
Eredményeink összegzése és értékelése	76
Köszönetnyilvánítás	80
Irodalomjegyzék.....	81
A doktori értekezés alapját képező publikációk listája	102
Összefoglaló	104
Summary	106

Áttekintés

A disszertáció négy vizsgálatra épül. Az egységes bevezető fejezet egy elméleti áttekintő résszel kezdődik, amit egy specifikusabb altémákra lebontott rész követ. Az anyagok és módszerek részben is egy rövid egységes rész vezet fel a külön fejezeteket, melyekben a négy témakört külön tárgyalom, és e négy rész mindegyike a módszertannal, a vizsgálatok leírásával kezdődik, majd az eredmények közzlése után az adott vizsgálat eredményeinek értékelése következik. A disszertáció lezárásaként a főbb eredményeket, valamint a tanulmány eredményeiből levonható következtetéseket pontokban összefoglaltam.

Bevezetés

Az evolúcióbiológia egyik fő feladata annak megértése, hogy a környezet változása által indukált, egy generáció alatt lezajló, valamint a generációk sorozatában kialakuló, több faktor által befolyásolt genetikai változások miként kapcsolódnak egymáshoz. Az utóbbi évtizedben kirajzolódott egy új, a klasszikus evolúciós felfogást kiegészítő, kiterjesztett evolúciós szintézis elmélet (pl.: West-Eberhard 2003, Pigliucci és Müller 2010, Laland *et al.* 2015), ami ellenkező szemszögből láttatja az evolúciót, miszerint a genom evolúció egy reflexió a fenotípuson ható szelekcióra, tehát nem a fenotípus követi a géneket, hanem fordítva. Míg a modern szintézis szerint az evolúció alapegységei a természetes szelekció, genetikai sodródás, rekombináció és génáramlás és az összes újítás forrása a véletlenszerű mutáció, addig a kiterjesztett evolúciós elmélet szerint ezekhez hozzáadódik a fenotípusos plaszticitás (Pigliucci *et al.* 2006, Pigliucci és Müller 2010), extra-genetikus és epigenetikus „örökség” (pl.: Bonduriansky és Day 2009), niche konstrukció (Laland *et al.* 2015, Laubichler és Renn 2015) és a fejlődési torzítás (pl.: Arthur 2002). Eszerint a felfogás szerint az adaptív evolúció a fenotípusban bekövetkező, generációkon átívelő változás, ami magába foglalja a gén- vagy allélfrekvencia változást, mely a fenotípusos változatosság örökölhető hányadán ható szelekció eredménye.

Doktori témám az egy fajon belüli, természetben megfigyelhető, egyedek és populációk közötti változatosság evolúciós ökológiai hátterével foglalkozik. Kísérleteinkben főként az egyedfejlődés alatti környezet által indukált változatosságot, illetve a plasztikus válasz kiváltásában szerepet játszó környezeti tényezők együttes hatásait vizsgáltam. A fenotípusos plaszticitás a genotípus azon képessége, hogy adott környezeti tényezők változásaira az egyedfejlődés során (azaz egy egyed élettartamán belül) a kifejeződő fenotípus megváltozásával válaszoljon. A plaszticitás egy ősi, univerzális tulajdonsága az élőlényeknek; a fajon belüli alternatív formák kutatása terén egyre több kísérletes bizonyíték utal arra, hogy az élőlények széles köre képes megváltoztatni külső jellegeik vagy életmenet-tulajdonságaik egy részét az aktuális, illetve helyi környezeti viszonyoknak megfelelően, mely válasz a rátermettségre való befolyása alapján lehet adaptív, vagy nem adaptív (Ghalambor *et al.* 2007). Az adaptív plaszticitás egyik alapfeltétele, hogy a fenotípusos változást kiváltó környezetekben növelje a fitneszt; ugyanakkor bizonyos szinten költséges is, különben állandóan és minden egyedben egyformán fejeződne ki a környezeti és életmódbeli heterogenitástól függetlenül (Dewitt *et al.* 1998). A természetes szelekció a fenotípusos plaszticitás kialakulásának és fennmaradásának kedvez olyan populációk esetében, melyek véletlenszerűen változó

környezetben élnek, ahol az indukált fenotípus megemelkedett rátermettséget biztosít az indukáló környezetben (Agrawal, 2001; Pigliucci, 2005; Ghalambor *et al.*, 2007). Ezen képesség az emberi tevékenység és a klímaváltozás következtében intenzíven változó környezetben kiváltképp fontos lehet olyan élőlényeknél, melyek kevésbé mozgékonyak. Az indukálható védelem (*inducible defence*) olyan plasztikus válaszreakció, mely ragadozók, versenytársak, vagy kórokozók térben és/vagy időben változatos nyomásának kitett populációkban alakul ki (Auld és Relyea, 2011). Az indukálható védelem sokféle lehet, morfológiai (Kusch, 1993, DeWitt, 1998; Ab Ghani 2016), fejlődésbeli (Van Buskirk és Schmidt, 2000), viselkedési (Peluc *et al.* 2008, Green 2009), vagy akár kémiai válaszok (Kubaneck *et al.* 2002, Kicklighter 2012) formájában is megmutatkozhat.

A kétéltűek a fenotípusos plaszticitás kutatásának gyakori modellorganizmusai. Ezen kutatások jelentős része a plaszticitás egyik legalapvetőbb formáját, a ragadozók elleni védekezési mechanizmusokat és hátterüket igyekszik feltárni, azokat, amiket én is vizsgáltam doktori munkám keretein belül. A kétéltűekre jellemző a bifázisos fejlődésmenet, azaz különböző környezetben fejlődnek lárvalakban és átalakulás után, továbbá életmódjukból adódóan víztestek széles skáláját használhatják szaporodási helyként. Ezekből adódóan utódaik ellenségek változatos formáival és egyedsűrűségeivel találhatják szembe magukat (Relyea 2002; Van Buskirk és Arioli 2005). A kétéltűek lárvális egyedfejlődésük során képesek életmenet-jellemzőiket az aktuális környezetben fennálló ragadozóveszélyhez igazítani. Ez a fenotípusos alkalmazkodás megnyilvánulhat a viselkedés, morfológia, növekedési ráta vagy fejlődési sebesség változásában (pl.: Skelly és Werner 1990, Relyea és Werner 1999, Lardner 2000, Relyea 2004), mely azonban költségekkel járhat, amelyek azonnal, vagy későbbi életszakaszokban egyaránt jelentkeznek (McCollum és Buskirk 1996, Van Buskirk 2000, Relyea 2002, Steiner és Van Buskirk 2007, Hettyey *et al.* 2011, Ferrari *et al.* 2015).

Kémiai védekezés

A biológiailag aktív másodlagos metabolitok használata széles körben elterjedt a természetben, az egysejtű organizmusoktól kezdve egészen a zárvatermő növényekig és a gerinces állatokig. Ezek a vegyületek többszörös ökológiai funkciót töltenek be, a ragadozók (Crossland és Alford 1998; Gunzburger és Travis 2005), versenytársak (Crossland és Alford 1998, Crossland és Shine 2012, Licht 1967), valamint a paraziták és kórokozók ellen nyújtanak védelmet, de a préda megölésére/ártalmatlanítására is szolgálhatnak (Brodie 2009). Az állat- és növényvilágban megfigyelhető biodiverzitás a mérgek esetében is nagymértékű változatosságot eredményezett, mely a kémiai vegyületek széles körét foglalja magában, a kis molekuláktól,

például az aminoktól egészen a nagy és komplex fehérjéig vagy szteránvázas vegyületekig.

A kétéltűek igen figyelemre méltó gerinces csoport, a bőrükben található mirigyekben előállított vegyületek (peptidek, proteinek, biogén aminok, szteroidok, valamint vízdoldékony és zsírodékony alkaloidok) meglepően nagy változatosságot mutatnak, akár egy fajon belül is. Ezek a vegyületek inkább csak „ártalmasnak”, mintsem mérgezőnek kategorizálhatók, habár nagy mennyiségben a mérgek komponensek mindegyike mérgező. A kétéltűek évszázadok óta mérges állatokként élnek a köztudatban és valóban, többségükről kiderült, hogy tartalmazznak „ártalmas” vagy mérgező anyagokat, és ezen biológiailag aktív vegyületek vizsgálatával szignifikáns filogenetikai összefüggés is kimutatható (Daly *et al.* 1987). A varangyok például jellemzően kardiotoxikus hatású szteránvázas vegyületeket, ún. bufadienolidokat szintetizálnak koleszterinből (Porto és Gros 1971), melyek membrán Na^+/K^+ -ATP-áz antagonisták hatásuk miatt erősen mérgezőek (Daly 1995). A bufadienolidok jelen vannak az emlősök szöveteiben, ahol vérnyomásszabályozó és jelátviteli szerepet töltenek be (Fedorova *et al.* 2015). Hasonlóan a bőrpeptidekhez, a bufadienolidok is bírnak antimikrobiális funkcióval a kétéltűek bőrében (Cunha Filho *et al.* 2005, Tempone *et al.* 2008), ugyanakkor taszítóan rosszízűvé, vagy mérgezővé teszik tulajdonosukat a ragadozók számára (Gunzburger és Travis 2005), melyre fő funkcióként tekint a tudomány. Ezen vegyületek a kísérletünkben használt modellfajban, a barna varangyban (*Bufo bufo*), az egészen korai egyedfejlődési stádiumtól kezdve, már a petékben is megtalálhatóak (pl. Benard és Fordyce, 2003, Mebs *et al.* 2007, Hagman *et al.* 2009, Hayes *et al.* 2009a, Crossland *et al.* 2012, Sciani 2013).

A kémiai védekezésben megmutatkozó plaszticitás jelensége jól ismert növényekben (Ahuja *et al.* 2012, Mithöfer és Boland 2012, War *et al.* 2012, Fürstenberg-Hägg *et al.* 2013), és korábbi kutatások néhány állatfajról is kimutatták, hogy rendelkezik e tulajdonsággal, vagyis mérgermelésüket képesek az adott környezeti viszonyoknak megfelelően szabályozni (áttekintő tanulmány: Hettyey *et al.* 2014). Habár a védekezésre szolgáló mérgek természetét és funkcióját már intenzíven vizsgálták bizonyos taxonokban (Fritz és Simms 1992; McClintock és Baker 2001), arról, hogy a különböző környezeti tényezők hogyan befolyásolják a kémiai védekezés költségeit és nyereségét, igen keveset tudunk, különösen a gerincesek esetében (Hettyey *et al.* 2014). A mérgermelés mechanizmusának részletesebb vizsgálata azonban fontos, mivel a toxicitáshoz köthető élettani kényszerek és korlátok alapvetően befolyásolhatják a mérgek hatékonyságát, valamint az egyéb, morfológiában, fejlődésben vagy viselkedésben megmutatkozó védekezési formákkal való csereviszonyát.

A mérgermelés idő- és energiaigényéről tehát igen keveset tudunk, márpedig a természetes környezetükben élő állatok, valamint a mérgermelés plasztikusságát kutató

vizsgálatok eredményeinek értelmezése szempontjából egyaránt fontos tényező, hogy egy ragadozó-, vagy egyéb stresszhelyzet- kiváltotta méregleadás után mennyi idővel válnak újra védetté az egyedek bőrméreg-tartalékaik újra-feltöltődésének köszönhetően, valamint hogy a mérgek újratermelődése mennyire költséges. Az optimális védekezés elmélete, melyet eredetileg növények kártevőkkel szembeni védekezésével foglalkozó vizsgálatok alapján állítottak fel, azt jósolja, hogy a kémiai védekezés típusa és mértéke függ a védekezés szükségessége és költségessége közötti csereviszonyoktól (Fritz és Simms 1992, McCall és Fordyce 2010). A méregtermelés és raktározás speciális biokémiai szerveződést, illetve sejt- és szövet szintű struktúrákat igényel, melyek feltételezhetően költségesek a fejlődő kételtű lárvák számára. Egyrészt, az állandó környezet várhatóan a konstitutív védekezési formákra szelektál, ahol az ellenségeikkel gyakrabban érintkező egyedek (vagy testrészeik) mérgezőbbé válnak. Másrészt, a kevésbé kiszámítható tér- és időbeli változatosság esetén, a költségességnek és a befektetés sztochasztikusan változó szükségességének kombinációja kedvező körülményeket teremthet a fenotípusos plaszticitás kialakulásához és fennmaradásához (Hettyey *et al.* 2014), különösen, ha a populációk közti génáramlás akadályozza a lokális genetikai adaptációt (Sultan és Spencer 2002), vagy ha időbeli változatosság miatt az adott jelleget tekintve nem alakul ki lokális adaptív csúcs (pl.: egy jelleg optimuma évről évre változik). Ilyenkor a méregtermelésbe csak akkor fektetnek energiát az élőlények, ha az ebből származó várható előnyök mértéke meghaladja a költségeket; tehát indukálható védekezést eredményeznek. Az azonban még nagymértékben felderítetlen, hogy miként alkalmazható ez az elmélet a gerincesek kémiai védekezésére, mely csoport esetén a védelmi mechanizmusok komplex de jól ismert sora jelenik meg a viselkedés, morfológia és életmenet-tulajdonságok (Hettyey és munkatársai, 2014) és a mérgezőség (Arbuckle *et al.* 2013, Daly 1995, Ligabue-Braun és Carlini 2015) területén is.

Az, hogy az állatok miként jutnak hozzá a mérgekhez, nagymértékben befolyásolja az indukálható kémiai védekezéshez kapcsolódó potenciális költségeket és korlátokat. Az állatok önmaguk képesek lehetnek szintetizálni a defenzív vegyületeket (másodlagos metabolitok), de más szervezetek által termelt toxinokat is felvehetnek és tárolhatnak (pl.: szimbiotikus mikrobáktól: Flórez *et al.* 2015, mérgező növények és állatok fogyasztásával: Daly 1998, Saporito *et al.* 2007, áttekintő tanulmány: Mebs 2001). Például számos tengeri és szárazföldi állatról ismert, hogy egy rendkívül mérgező neurotoxint, tetradotoxint (TTX) tartalmaznak ragadozókkal szembeni védekezés céljából, azonban ezt a vegyületet az esetek túlnyomó többségében az állatok nem maguk termelik, hanem vagy szimbióta organizmusoktól, vagy a táplálékukból szerzik be (Magarlamov *et al.* 2017, Chau *et al.* 2011; Bane *et al.* 2014; de lásd:

Bucciarelli *et al.* 2017). A mérgező alkaloid vegyületek táplálékból való kinyerésének talán a nyílméregbékák a legismertebb példái, melyek méreganyagaik prekursorait ízeltlábú prédáikból veszik fel (Daly 1998, Saporito *et al.* 2007, Santos *et al.* 2016). Azok az állatok, melyek más organizmusok méreganyagait használják védekezésüként, számos élettani kihívással szembesülnek, hiszen a felvett méreganyagot egyrésztől közömbösíteniük kell, hogy ne jelentsen veszélyt számukra, ugyanakkor mérgező képessége is megmaradjon. Olyan fajokban, ahol méregkomponensek *de novo* bioszintézise komplex metabolikus úton történik, és specifikus enzimek játszanak szerepet a mérge termelésében, számos kémiai reakció közvetítésével, a mérgetermelés élettani korlátai könnyebben meghatározhatóak lehetnek. Ilyen korlátok lehetnek az idő és az energia, amely ahhoz szükséges, hogy fokozott enzimaktivitást indukáljanak a toxin prekursorok gyors *de novo* toxinszintéziséhez, vagy biotranszformációjához (akár saját enzimekkel, akár bakteriális biotranszformációval, Hayes *et al.* 2009b), hogy elérjék a környezetileg indukált, fokozott toxinszintet. Azonban ezen másodlagos metabolitok bioszintézise komplikált és gyakran kevésbé feltárt. Például a barna varangyok bőrében is megtalálható bufadienolidokról ismert, hogy bioszintézisük útja a koleszterinnel kezdődik, viszont az intermedier komponensek és a szintetizálásban résztvevő enzimek ismeretlenek. A rendelkezésünkre álló csekély információk egyike például, hogy emlősökben, a „savas” epesav útvonal feltehetően része a marinobufagenin, egy szintén endogén Na⁺/K⁺-ATP-áz inhibitor szintézisének (Fedorova *et al.* 2015).

Azoknál a fajoknál, ahol a kémiai védekezés plasztikusnak bizonyult, ritkán, vagy soha nem tanulmányozták a toxintermeléssel kapcsolatos élettani korlátokat. A környezeti heterogenitás a mérgetermelés különböző optimális szintjeit eredményezheti, például a toxinprekursorok elérhetőségének különbségei miatt (pl.: Darst *et al.* 2005), vagy a célszervezet (pl. ragadozó, vagy egyéb ellenség) érzékenységéhez való lokális adaptáció által. Sok esetben különböző vegyületekre lehet szükség a különböző mérge rezisztenciával rendelkező ellenségekkel szemben (pl.: Barlow *et al.* 2009, Crossland és Alford 1998).

A mérgetermelés szempontjából a ragadozók jelenléte és abundanciája mellett ugyancsak meghatározó lehet az erőforrások elérhetősége, mely szabályozhatja a különböző indukált védekezési formák kifejeződését (Alford és Harris 1988, Newman 1994, 1998, Laurila *et al.* 1998, Winkler és Van Buskirk 2012). A toxicitás költségessége az erőforrás-allokáció korlátaitól is függhet (pl. a nagyobb mértékű kémiai védekezés bizonyos lepkéknél kisebb zsírraktárokat eredményez a diapauzát követően; Fordyce *et al.* 2006), de ezen csereviszonyok erősségét a bőséges táplálékforrás gyengítheti. Az optimális allokációs hipotézis szerint a kémiai védekezésnek növekednie kell az elérhető táplálék mennyiségének növekedésével,

habár bizonyos tényezők és csereviszonyok (pl. genetikai korrelációk) korlátozhatják a plaszticitás mértékét és kifejeződését még a kedvező forrásellátottságú helyeken is (pl. Scheiner *et al.* 1991, DeWitt *et al.* 1998, Auld *et al.* 2010). Továbbá, a források kémiai védekezésbe való allokációja különösen költséges lehet azoknál a kétéltű fajoknál, melyeknél az ebihalaknak fel kell gyorsítaniuk a fejlődésüket, például amikor a vízi élőhely korai kiszáradása fenyeget (Richter-Boix *et al.* 2011). Ennek megfelelően, mind a lokális adaptáció következtében, mind plasztikus válaszok túlsúlya esetén az ebihalak csökkent kémiai védekezését várjuk az olyan tavakban, melyek hajlamosabbak a kiszáradásra.

Az indukált védekezés költségességére és korlátaira számos empirikus bizonyítékot lehet találni különböző taxonok esetében, ami főként egy forrás-szabályozott, a védekezésbe és az egyéb biológiai funkciókba (pl. növekedés és szaporodás) való befektetés csereviszonyaként („trade-off”) nyilvánul meg (Berenbaum és Zangerl, 1994, Tollrian és Harvell, 1999, Fordyce *et al.* 2006, Hammill *et al.* 2008). A kémiaileg védekező állatokban, a méreganyagok kimerülése befolyásolhatja az egyéb ragadozó-indukált válaszokat egyrészt az újratermelés energetikai költsége miatt, másrészt azért, mert mérgek hiányában az egyedeknek más védekező képességekre kell támaszkodniuk. Az összetett életmenettel rendelkező fajoknál, mint a kétéltűek, az indukált védekezési mechanizmusokból adódó költségek számszerűsítése módszertani nehézségekkel járhat, mivel a kapcsolódó költségek nem feltétlenül jelentkeznek a védekező válasszal egyidejűleg (Scheiner és Berrigan, 1998, Tollrian és Harvell, 1999, Van Buskirk és Saxer 2001, Benard 2004, Steiner 2007). Például, a lárvakorban tapasztalt ragadozóveszély kihatással lehet az átalakulás utáni morfológiára (Van Buskirk 2000, Van Buskirk és Saxer 2001), vagy a fiatal átalakult egyedek méregtermelésére (Benard és Fordyce 2003, Hagman *et al.* 2009), valamint a későbbi fejlődési stádiumokban negatívan hathat a fitneszre (Smith 1987, Semlitsch *et al.* 1988). Ha lehetséges lenne egyidőben csak egy ragadozó elleni válaszreakciót manipulálni kísérletesen, akkor vizsgálható lenne, hogy az egyik tulajdonságba való megnövelt befektetés hogyan befolyásolja egy másik életmenet jellemző kifejeződését és az ezekkel kapcsolatos fitnesz csereviszonyokat. Ezen kérdések megválaszolása segítené jobban megérteni azokat az alapvető evolúciós mechanizmusokat, amelyek fontos szerepet játszanak a fenotípusos változatosság fenntartásában a természetben.

A méregtermelés, valamint az ehhez köthető költségek és korlátok vizsgálatának alapvető feltétele, hogy a méregleadás mesterségesen kontrollálható legyen a kísérletekben. A norepinefrin, mely egy ér- és simaizom összehúzó hatású katekolamin-hormon és neurotranszmitter, kétéltűek bőrmirigyváladék-ürítésének stimulálására számos *in vitro* (Benson és Hadley 1969, Castillo és Orce 1997) és *in vivo* (Dockray 1975, Rollins-Smith 2005,

Quagliata *et al.* 2008, Giuliani és Rinaldi 2010, Gammill *et al.* 2012) tanulmányban sikerrel használták. A kísérleteinkben használt specifikus *in vivo* módszert élő barna varangy ebihalakon már korábbi tanulmányban tesztelték (Maag *et al.* 2012).

A növekedés-mortalitás csereviszony: változik-e a védekezési stratégia az egyedfejlődés során?

A táplálék keresése és a potenciális ragadozók elkerülése egy alapvető konfliktus a zsákmányállatok életében, mivel két létfontosságú, de egymással ellentétes irányba ható erő szerint kell optimalizálniuk, alakítaniuk a viselkedésüket (Milinski és Heller 1978, Werner és Gilliam 1984, McNamara 1987, Lima és Dill 1990, Anholt és Werner 1995). Amint azt korábban említettem, az egyszerű allokációs modell szerint egy magas forrásellátottságú élőhelyen a préda állatok több energiát tudnak ragadozóellenes védekezésbe fektetni (Harvell 1990, Werner és Anholt 1993), míg a forráshiányos körülmények között élő egyedeknek kockázatvállalóbbnak kell lenniük (pl. Milinski és Heller 1978, McNamara 1987, Anholt és Werner 1995), hogy fenntartsák az alapvető életfunkcióikat a védekezési mechanizmusok elhanyagolása mellett. Ha kevésbé kockázatvállalóak, akkor viszont a csökkent táplálkozási aktivitással járó csökkent energianyereséggel kell számolniuk (pl. Cowlshaw 1997; áttekintő tanulmány: Brown és Kotler 2004). Az allokációs modellel ellentétben, a “védekezés-növekedés” modell szerint (Myers és Bazely 1991) a védekezésbe fektetett energiának magasabbnak kell lennie táplálékszegény környezetben. Ha a növekedési ráta alacsony forrásellátottság mellett csökken, a zsákmányállatoknak annál több időt kell a kiszolgáltatott élethelyzetben tölteniük (Arendt 1997), ahol a veszélyes környezet miatt szükség van a fokozott védekezésre. Magas táplálékellátottság mellett azonban az egyedek gyorsan növekedhetnek, sok esetben lehetővé téve számukra, hogy minél hamarabb elkerüljék a ragadozóveszélyt. Ez kételtűek esetében vagy a korábbi átalakulással lehetséges, vagy olyan testméret minél előbbi elérésével, mely már védelmet nyújt egy olyan ragadozóval szemben, amely csak adott testméretnél kisebb zsákmányt tud elfogyasztani (Kishida és Nishimura 2004). Míg az előző két modell egymásnak ellentmondó hipotézist állít fel, addig a “növekedési-differenciálódási” modell ezeket kombinálja (pl. Steiner és Pfeiffer 2007). Az ebihalak viselkedésében megmutatkozó, táplálkozási aktivitás és ragadozó-elkerülés csereviszonya nagymértékben függhet nemcsak a rendelkezésre álló táplálék mennyiségétől (pl., Skelly 1995; Laurila *et al.* 1998), hanem minőségétől is (pl. Eklöv és Werner 2000; Eklöv és Halvarsson 2000),

befolyásolva a növekedési sebességet és az átalakuláskori testméretet (Kupferberg 1997; Laurila *et al.* 1998; Winkler és Van Buskirk 2012), valamint a kifejlett állatok túlélését és szaporodási sikerét (Alford és Harris 1988; Cabrera-Guzmán *et al.* 2013).

A lárvális viselkedés alakulását tovább „bonyolítják” az egyedfejlődésbeli és a testméretbeli változások (Werner és Anholt 1993). A viselkedés változhat a korról a ragadozóveszélytől függetlenül (Laurila *et al.* 1997), vagy éppen azzal erős összefüggést mutatva (Skelly és Werner 1990; Jara és Perotti 2010; Hettyey *et al.* 2011). Nagyszámú kísérletes bizonyíték utal arra, hogy a ragadozóveszélynek való kitettség, valamint a viselkedési megfigyelések hossza és időzítése alapvetően befolyásolja a mért eredményeket az ebihalak viselkedésével foglalkozó vizsgálatokban (Eklöv és Werner 2000, Wilson és Krause 2012, Hossie és Murray 2012, Touchon *et al.* 2013, Bateman és Fleming 2015). Mindazonáltal arról, hogy az egyedfejlődés és a táplálékellátottság egymással kölcsönhatásban formálja-e az ebihalak ragadozó elleni viselkedését, igen keveset tudunk (de lásd: Laurila *et al.* 1998, Bennett *et al.* 2013). Ez azért fontos kérdés az evolúciós ökológiában, mivel a nagyfokú fejlődési plaszticitás, amely kihat a viselkedésre is, növelheti az evolúciós potenciált, előidézve új interakciókat jellegek közt, ami a rátermettségre is kiható csereviszonyokat alakítva evolúciós diverzifikációhoz vezethet.

Célkitűzések

Kísérleteink célja a barna varangy ebihalak indukált védekezésének, elsősorban a viselkedést és méregtermelést befolyásoló tényezők, illetve a plaztikus válaszok mértékének és a hozzájuk köthető költségek és korlátok vizsgálata volt.

Specifikus kérdéseim a következők voltak:

- A lárvakori méregtermelésben feltételezeten megnyilvánuló plazticitásnak milyen korlátai vannak (újratermelés sebessége)?
- Ha fokozható a méregtermelés, akkor annak milyen költségei lehetnek?
- Természetes populációk között van-e jelentős különbség a méregtermelésben? Mely környezeti tényezők állhatnak a változatosság hátterében?
- Változik-e a ragadozó-jelenlétre adott viselkedési válasz az egyedfejlődés során? A különböző környezeti tényezőknek (ragadozó jelenléte, táplálékellátottság) mekkora befolyása van a viselkedésre különböző életkorokban?

A kényszerített méregleadás hatásának, intenzitásának és újratermelési sebességének megállapítása a barna varangy ebihalakban

A méregtermelés intenzitásának megállapítása fontos, hiszen ezek a kémiai védekezés hatékonyságának és a benne megmutatkozó plazticitásnak meghatározó tényezői. Jelenleg a méregtermelés idő- és energiaigényéről igen keveset tudunk; az eddigi, kételtűek bőrében található mirigyek váladék-újratermelő képességével foglalkozó kutatások ritkák és egymásnak ellentmondóak (Toledo *et al.* 1992, Jared *et al.* 2014), ebihalak esetében pedig semmi információ nem áll rendelkezésre.

Ebben a vizsgálatban egy olyan kíméletes, az állatok elpusztítását nem igénylő módszer kidolgozása volt a cél, mely lehetővé teszi a A kivonható méreg mennyiségének mérését és a méregkivonás után az állatok további vizsgálatát, akár ismételt méregmintavételét is. Egy ilyen szemi-invazív módszernek ugyanakkor etikai és természetvédelmi előnyei is vannak, hisz nem jár az állatok elpusztításával. Ehhez norepinefrin-bitartrát vizes oldatának hatását teszteltük az ebihalak testtömegére és viselkedésére nézve, hogy felmérjük, milyen mértékű károsító hatást jelent az állatok számára, befolyásolja-e a rövid időléptékben mérhető viselkedést (főleg táplálkozási aktivitást), alkalmas-e az ebihalak méregtermelésével, vagy patogének ellen termelt bőrszekrétumaikkal kapcsolatos vizsgálatok jövőbeli kivitelezésére.

Ezt a kísérletet követően egy kvantitatív és kvalitatív kémiai elemzést is magában foglaló vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy az általunk alkalmazott hormonális stimulus kiváltja-e a környezetbe történő teljes méregleadást. Feltételezve, hogy az alkalmazott eljárással indukálható a méregleadás a barna varangy ebihalaknál, azt is teszteltük, hogy a mesterségesen leadott méregtartalékok újratermelése milyen mértékben és milyen sebességgel következik be. Azt feltételeztük, hogy az általunk végzett stimulálás hatására bekövetkezik a méregleadás, majd ezt követően néhány napon belül újra feltöltődnek a méregtartalékok.

A kémiai védekezés lehetséges költségeinek és egyéb, ragadozók elleni védelmi mechanizmussal való csereviszonyának vizsgálata

Ebben a tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy a barna varangy ebihalak bőrében lévő méregraktárak manipulálása hogyan befolyásolja a ragadozó-indukált életmenet jellemzők (pl.: túlélés, fejlődési sebesség, átalakuláskor mért testtömeg) kifejeződését, és hogyan hat az ezekhez kapcsolódó fitness csereviszonyokra.

A különböző módon kezelt ebihalak lárvális fejlődésének hosszát, metamorfózisig elért testtömegét és túlélését vizsgáltuk, melyek kétélűeknél korrelációban állnak az egyedi fitnessszel (Smith, 1987; Semlitsch *et al.*, 1988; Altwegg és Reyer, 2003), majd ezekből becsültük a kezelések által indukált válaszok potenciális költségeit. A méregraktárak gyakori ürítése esetleg elnyújtott lárvális fejlődést, azaz későbbi átalakulást, alacsonyabb átalakuláskor mért testtömeget, vagy csökkent túlélést eredményezhet a kezelt ebihalak csoportjaiban a kontroll csoporthoz képest, főleg, ha azok forrásszegény környezetben lettek nevelve. Ebben az esetben a méregtermelés a barna varangy ebihalaknál egy olyan tulajdonság lenne, ahol ragadozóveszély esetén az állatok főként a mérgek biztosította védelemre támaszkodnak, melyek fokozott szintetizálása viszont költséges. Egy másik lehetőség, hogy a méregtartalékok mesterséges ürítését követően az ebihalak egyéb védekezési formába fektetnek több energiát (mint amilyen a felgyorsult fejlődés- és növekedési sebesség) annak érdekében, hogy minél előbb elhagyják a vízi élőhelyet és elérjék azt a testméretet, ami már védelmet nyújt bizonyos ragadozókkal szemben, mindeközben pedig a csökkentett forráselérhetőség feltehetően limitáló faktorként van jelen.

Barna varangy ebihalak kémiai védekezése a természetben: környezeti faktorok szerepe a populációk közötti eltérésekben

Vizsgálatunkban a barna varangy ebihalak kémiai védekezésében mutatkozó természetes változatosságot és annak a különböző környezeti faktorokkal való összefüggését kívántuk feltárni. Kutatásunkban a bőrben termelt mérgek mennyiségében és összetételében mutatkozó változatosság mértékét vizsgáltuk populációk között, finom (egy tájegységen belül) és durva (több száz km-es távolságban) térbeli skálán, valamint az ökológiai faktorok függvényében. A terepi felmérés során elsősorban azokra a tényezőkre összpontosítottunk, melyek nagy valószínűséggel befolyásolhatják azt, hogy adott környezetben a kémiai védekezés mennyire kifizetődő. A ragadozók jelenléte és abundanciája mellett, a különböző indukált védekezési formák kifejeződését szabályozhatja az erőforrások elérhetősége (Alford és Harris 1988, Newman 1994, 1998, Laurila *et al.* 1998, Winkler és Van Buskirk 2012), a vízi élőhely korai kiszáradásának veszélye (Richter-Boix *et al.* 2011), földrajzi távolság (Daly 1995, Hanifin *et al.* 2003), vagy a versenytársak jelenléte (Crossland és Shine 2012, Hettyey 2014, Licht 1967).

A viselkedés plaszticitásának időbeli változásai ragadozóveszély és a táplálékellátottság függvényében barna varangy ebihalaknál

Az ebihalakon különböző fejlődési stádiumokban végzett ismételt megfigyelésekkel vizsgáltuk, hogy ragadozóveszély hatására milyen mértékben csökkentik le táplálkozási aktivitásukat és mennyi időt töltenek rejtőzködve, melyek a kétéltű lárvánál leggyakrabban megfigyelt ragadozók elleni viselkedési válaszok (Eklöv és Werner 2000, Richardson 2001, Jara és Perotti 2010). Megvizsgáltuk továbbá, hogy a táplálék-limitáltság gyengíti-e ezeket a védekezési válaszokat. Végül teszteltük, hogy a ragadozó veszély és a táplálékellátottság ebihalak viselkedését formáló kölcsönhatása hogyan változik az egyedfejlődés során. Azt feltételeztük, hogy a táplálékhiány befolyásolni fogja a viselkedésben kifejezett ragadozók elleni védekezést (pl. Almeida *et al.* 2011, Nunes *et al.* 2014). Mivel az ebihalak táplálkozási hatékonysága a korról nő (Hensley 1993, Hentschel 1999), azt is feltételeztük, hogy a kor előrehaladtával csökkenő tendenciát figyelhetünk meg az ebihalak táplálkozási aktivitásában. Az ebihalak ragadozó elkerülő viselkedése miatt felmerülő költségek csökkenhetnek az egyedfejlődés során (Werner és Anholt 1993, Urban 2007b, Cressler *et al.* 2010), tehát ennek megfelelően is fokozottabb rejtőzködő magatartást vártunk a fejlettebb ebihalaknál. Meg kell említeni, hogy a kísérlet kimenetele nagyban függhet a kísérletben használt ragadozó fajától, mely alapvetően meghatározhatja az ebihalak viselkedési válaszát (Hossie *et al.* 2017). Kísérletünkben olyan

ragadozót használtunk, mely morfológiai adottságai miatt bizonyos méret fölötti prédát nem képes zsákmányolni és elfogyasztani, ezért arra is számíhattunk, hogy a ragadozó-elkerülő viselkedés az ebihalak korával csökken, vagy akár el is tűnik (Kishida és Nishimura 2005, Urban 2007a, Urban 2007b), miután az ebihalak elérték azt a méretet, amelyet a ragadozó már nem képes elejteni. Végül azt is teszteltük, hogy a táplálékhiány az állatok megnövekedett aktivitásához vezet-e, és hogy a ragadozó-ellenes védekezésnek ezen formája mérséklődik-e a táplálék hiányában megnövekedett költségei miatt (Anholt és Werner 1995, Anholt *et al.* 2000, Bridges 2002).

Vizsgálati módszerek

A kérdésekre barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalakon végzett laboratóriumi kísérletek és terepen végzett vizsgálat keretében kerestem a választ. A vizsgálatokban szereplő állatokat természetes populációkból gyűjtöttük. Ennek oka, hogy a hazai kétéltűeket lehetetlen nagyobb számban nevelni, mivel az ivarérettséget évek után érik csak el, tartásuk hely-, munka- és költségigénye egyaránt nagy, ugyanakkor ezek biztosítása esetén is nagyarányú lenne a mortalitás. A vizsgálatokba bevont kétéltű fajok, a pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*) és a barna varangy Magyarországon általánosan elterjedtek, a Budai-hegység, Pilis- és Visegrádi-hegység területén és környékükön is sokfelé nagy, több száz egyedet számláló populációkkal rendelkeznek. A befogott felnőtt egyedek mindegyikét és a petékből fejlődő fiatal állatok nagy részét is a kikelés után, vagy legkésőbb a kísérletek befejezése után, a befogás helyszínén szabadon engedjük, így az általunk okozott zavarást összességében elhanyagolhatónak tartjuk.

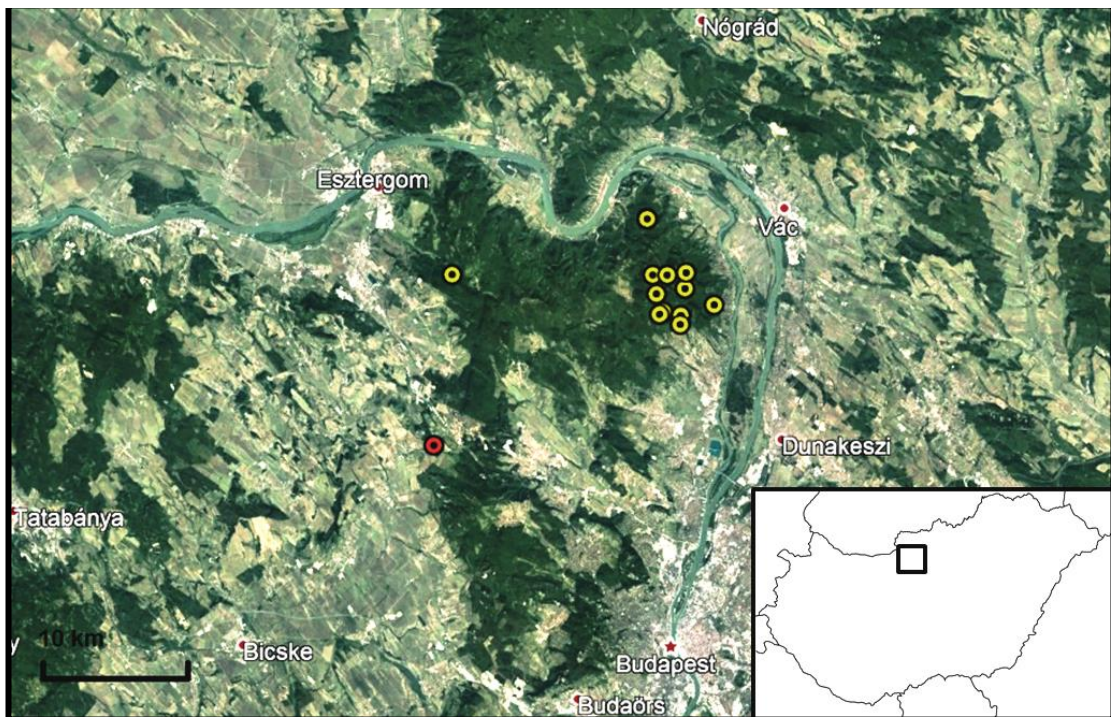
Etikai nyilatkozat

Minden, az állatok bevonásával történő terepi és laboratóriumi munka a magyarországi hatályos jogszabályoknak megfelelően, Pilisi Parkerdő Zrt., a természetvédelmi hatóságok (Közép-Duna-Völgyi KTVF:10350-2/2012, KTF:603-3/2014, KTF:3596-7/2016), a NÉBIH (Állatkísérlet végzésére szóló engedély, PEI/001/389-4/2013) és az MTA ATK NÖVI Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának jóváhagyásával történt. A kísérletek során az összes intézeti, nemzeti és nemzetközi irányelvet és szabályt követtük, valamint a kísérleteket csak a Kísérletvezetői Tanúsítvánnyal (SZIE Állatorvos-tudományi Kar, Laborállat-tudományi Osztály által szervezett tanfolyam, mely kielégíti az EU-nak, a 63/2010 a kísérletre és más tudományos célra használt állatok védelmével foglalkozó irányelvben leírtakat) rendelkező személyek irányították.

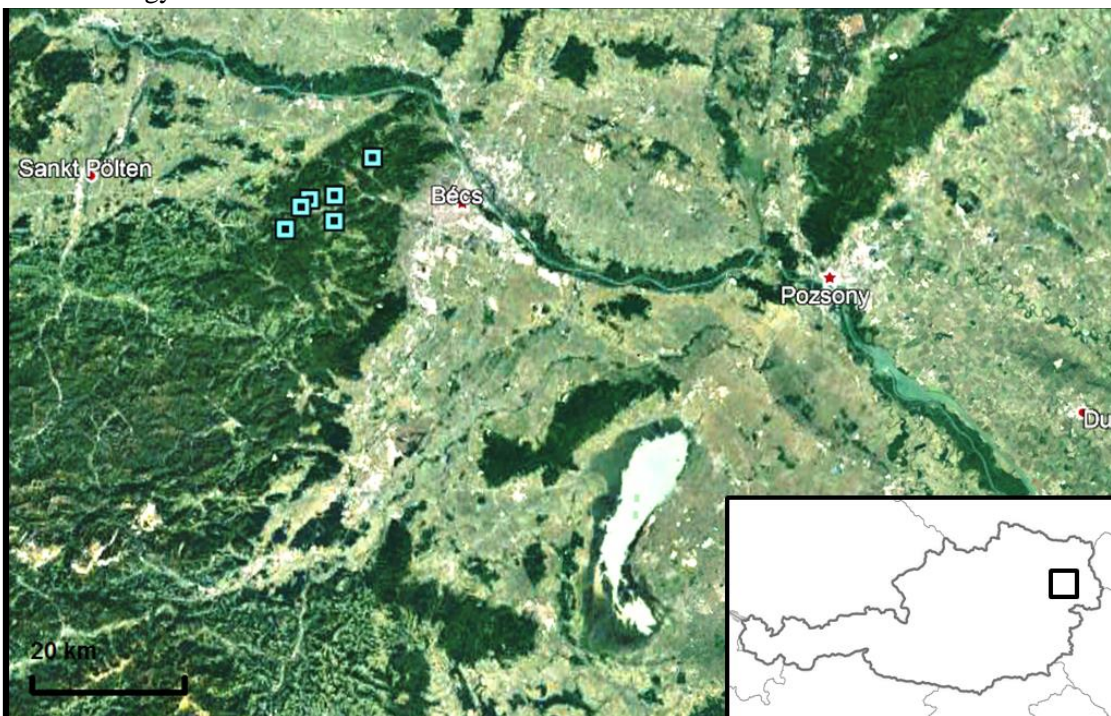
Mintavételi terület

Laboratóriumi kísérleteinkben erős predációs nyomásnak kitett barna varangy populációból származó egyedeket használtunk. A kísérleteinkhez szükséges barna varangy petezsinórokat egy állandó vizű halastóból, a Garancsi-tóból (47°37'26"É, 18°48'27"K), a pettyes göte hímeket pedig a Visegrádi-hegység 3 kistavából gyűjtöttük (1. táblázat, 1. ábra). A populációs felmérésből származó adatokat a Pilis-Visegrádi-hegység 16 és az ausztriai Wienerwald 3

kisvizének mintavételezésével gyűjtöttük (1. táblázat, 1. és 2. ábra)



1. ábra. A Pilis-Visegrádi-hegységben elhelyezkedő, barna varangy ebihalak laboratóriumi kísérletes (piros) és terepi vizsgálatában (sárga) érintett kisvizetek. A pontok száma az átfedések miatt nem egyezik a tavak számával.



2. ábra. Az Ausztriában, Bécst közelében elhelyezkedő, barna varangy ebihalak terepi vizsgálatában érintett kisvizetek elhelyezkedése.

1. táblázat. A vizsgálatokban érintett élőhelyek és kételtűfajok listája.

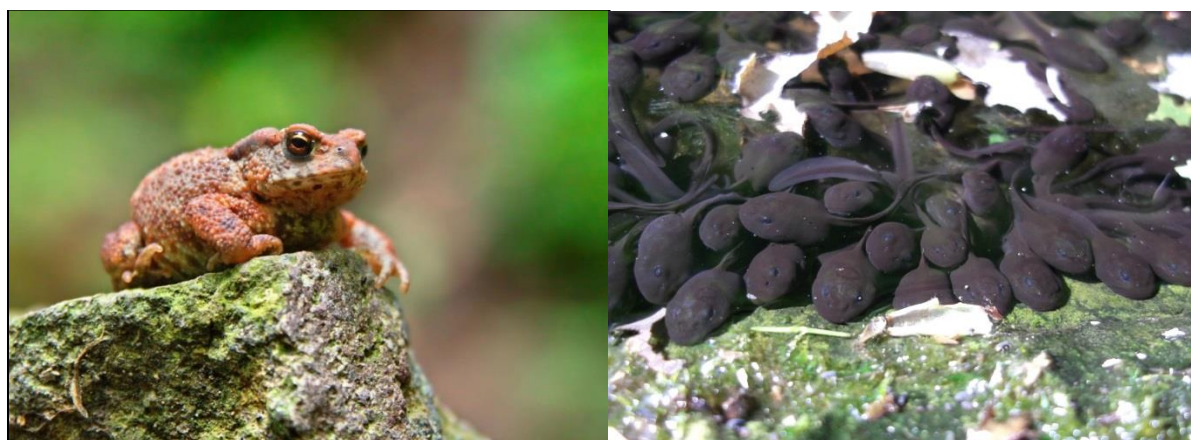
	É	K	Pettyes göte (<i>L. vulgaris</i>)	Barna varangy (<i>B. bufo</i>)
Laborkísérletek				
Garancsi tó	47°37'25"	18°48'27"		x
Ilona-tó	47°42'48"	19°02'25"	x	
Katlan	47°42'42"	19°02'40"	x	
Mélymocsár	47°42'27"	19°02'24"	x	
Terepi tófelmeréses vizsgálat				
Magyarország				
Alsóhosszúréti tó	47°42'55"	19°01'23"		x
Csíkos-tó	47°43'15"	19°04'19"		x
Felsőhosszúréti-elülső	47°43'36"	19°00'58"		x
Ilona-tó	47°42'48"	19°02'25"		x
János-tó	47°42'49"	19°01'11"		x
Mélymocsár	47°42'27"	19°02'24"		x
Németszéna	47°43'51"	19°02'36"		x
Orlováci-rét	47°42'54"	19°03'40"		x
Papréti-középső	47°44'20"	19°00'43"		x
Sóstói tó	47°46'31"	19°00'16"		x
Szárazfarkas-belső	47°44'04"	18°49'08"		x
Vértes-Észak	47°44'28"	19°02'38"		x
Zánkói rét	47°44'21"	19°01'33"		x
Ausztria				
Frauenwarth	48°10'22"	16°7'38"		x
Haitzawinkel	48°11'16"	16°3'35"		x
Irenental	48°12'22"	16°7'26"		x
Méhes-tó (Oberkniewald)	48°9'24"	16°1'57"		x
Schneiderwiese	48°15'36"	16°11'32"		x
Weidlingbach	48°11'55"	16°4'32"		x

Vizsgált faj

A barna varangy (*Bufo bufo*, Linnaeus, 1758) az egyik leggyakoribb, egész Európában széles körben elterjedt, generalista kételtűfaj (Gasc *et al.* 1997, Sillero *et al.* 2014). Szaporodásához és peterakásához választott édesvizek köre az efemer pocsolyáktól az állandó vízállású tavakig terjed, melynek következtében a barna varangy ebihalak vízi egyedfejlődésük során az őket körülvevő biotikus és abiotikus környezet kiszámíthatatlanul nagy változatosságának lehetnek kitéve, beleértve a ragadozókat, a kórokozókat és a versenytársak abundanciáját is.

A barna varangy ebihalak ragadozó szimulált jelenlétében képesek változtatni életmenetükön (pl. fokozódott fejlődési sebesség, lásd: Laurila *et al.* 1998, Lardner 2000, Almeida *et al.* 2011), morfológiájukon (Buskirk 2009, Nunes *et al.* 2014) és különösen viselkedésükön (Marquis *et al.* 2004, Nunes *et al.* 2013, de lásd Richter-Boix *et al.* 2007), ezen védekezési válaszok többsége azonban a többi békafaj ebihalaihoz képest kevésbé kifejezett

(Laurila *et al.* 1997, Lardner 2000). Ebből arra következtethetünk, hogy esetükben a kémiai védekezés igen hangsúlyos, bár ezt kísérletes bizonyítékok eddig nem támasztották alá.



3. ábra. A barna varangy (*Bufo bufo*, Linnaeus, 1758) az egyik leggyakoribb, egész Európában széles körben elterjedt, generalista kétéltűfaj (bal fotó: Dr. Laczi Miklós, jobb fotó: Tóth Zsófia).

A barna varangy ebihalak kültakarójában méregtermelésre és leadásra képes mirigysejtek vannak (Delfino *et al.* 1995, Regueira *et al.* 2015), melyekben *de novo* mérgezés történik (Ujszegi *et al.* 2017, Üveges *et al.* 2017) és többek között a ragadozók elleni védelemben van szerepük (Reading 1990). A lárvális fejlődés hossza laboratóriumban átlagosan 30-40 nap között változik (Kurali *et al.* 2016), melynek középszakaszában (kb. 35-ös lárvastádium, Gosner 1960) a legmagasabb az ebihalakban mérhető teljes bufadienolid-tartalom (Üveges *et al.* 2017). A barna varangyok bőrében megtalálható bufadienolidokat a szteránváz C3 hidroxilcsoport észtereződése szerint általában két nagy csoportra osztják, a „szabad” típusra és a „konjugált” típusra (Rodriguez *et al.* 2017). A „szabad” típusú bufadienolidok, más néven bufogeninek szabad C3 hidroxilcsoporttal, és tipikusan kisebb molekulasúllyal rendelkeznek (Meng *et al.* 2016). A konjugált típusú bufadienolidok, másnéven bufotoxinok ezzel szemben a C3-OH csoportok konjugációjával képződött különböző észterekkel (Wang *et al.* 2011), ezáltal nagyobb molekulatömeggel is jellemezhetőek (>700 m/z érték, mely a molekulasúly és az iontöltés hányada), habár egyes szulfát-konjugátumok kisebb, 400 körüli m/z értékkel is rendelkezhetnek (Meng *et al.* 2016). Több tucat bufadienolid ismert, és feltételezhető, hogy az összetettebb és az egyszerűbb molekulák toxicitásában különbségek vannak. Számos tanulmány vizsgálta a bufadienolidok szerkezet-aktivitás közti összefüggést, melyekből kiderült, hogy a kisebb molekulasúlyú, egyszerűbb bufogeninek általában hatásosabbak, mint a nagyobb molekulasúlyú bufotoxinok (pl. Kamano *et al.* 1998, Meng *et al.* 2016). Az is

feltételezhető, hogy a bufotoxinok mintegy raktározási formaként szolgálnak, és a varangyok ezekből hasítják szükség esetén (pl.: ragadozóveszély) a hatékonyabb kisebb mérégmolekulákat. Fontos még megjegyezni, hogy a barna varangy filopatikus (Reading *et al.* 1991), mely lehetőséget teremt a kémiai védekezésbeli lokális adaptáció evolválódásához, bár az efféle, a természetben előforduló adaptációkat sem vizsgálták még ezelőtt.

A kísérletekben használt ragadozó

A pettyes götte (*Lissotriton vulgaris*, Linnaeus, 1758) az egyik leggyakoribb farkos kétéltűfaj Európában (Gasc *et al.* 1997). A magyarországi sík- és dombvidéki kistavakban a szaporodási időszakban rendkívül gyakran fordul elő együtt a barna varanggyal, melynek ebihalait zsákmányolja is, ezért kísérleteinkhez megfelelő ragadozó modellként szolgál.

1. Első fejezet: A leadott mérge mennyiségi meghatározása és a mérge újratermelődési sebességének megállapítása a barna varangy ebihalakban

1.1. A kényszerített mérgeleadás rövidtávú hatása a barna varangy ebihalakra

1.1.1. Anyag és módszer

Kísérletünkhöz a Garancsi-tóból (47°37'25"É, 18°48'27"K) 2013 márciusában 5 barna varangy petezsinórból gyűjtöttünk 30-30 petét, melyeket a Magyar Tudományos Akadémia Júliannamajorban levő kísérleti telepére (MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet) szállítottuk. Két nappal azután indítottuk a kísérletünket, hogy a kikelt lárvák elérték a szabadon úszó stádiumot (kb. 25-ös lárvastádium; Gosner 1960). Minden családból (5 db) 20-20 ebihalat véletlenszerűen kiválasztottuk, majd egyesével szétosztottuk 2 literes nevelődobozokba, melyek 7 dl mesterséges lágy vizet (RSW, APHA 1985), valamint búvóhelyként szolgáló, 3-3 bükklevelet tartalmaztak. A mesterséges lágyvizet a csapvíz reverz ozmózis szűrését, majd UV-fényes fertőtlenítését követő viaszosításával (48 mg/l NaHCO₃, 30 mg/l CaSO₄×2 H₂O, 61 mg/l MgSO₄×7H₂O és 2 mg/l KCl) állítottuk elő. A hőmérséklet a laborban 22°C (nappal) és 17 °C (éjjel) között ingadozott, 13-11 órás fény-sötét ciklusok mellett, mely megfelel a lárvák környezetében mérhető természetes értékeknek. A kísérletben használt ragadozó stimulus előállításához 15 pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*) hímet gyűjtöttünk be a Pilis-hegység 3 tavából (lásd: mintavételi terület). A befogott gőtéket egyesével, 5 l-es műanyag tartódobozokban helyeztük el a laboratóriumban. Minden doboz 2 l mesterséges lágyvizet tartalmazott és egy agyag edényt, mely búvóhelyül és vízfelszín feletti pihenőhelyül szolgált. Az állatokat csövíjő féreggel (*Tubifex spp.*) etettük és minden nap cseréltük a tartóvizüket. A kísérlet lezárását követően az összes állatot a befogási helyükön szabadon engedték.

A kísérletet térbeli random blokk elrendezésben állítottuk fel, 100 barna varangy ebihal felhasználásával: a 4 kezelési kombináció (ragadozó jelenléte vagy hiánya, valamint hormon kezelés alkalmazása vagy hiánya, mint kontroll-kezelés) mindegyikébe családonként 5 szabadon úszó ebihal került, külön dobozokban elhelyezve, egyesével. A „ragadozóveszély” jele fajtársak homogenizátumából (100 ml RSW-ben 1,9 g botmixerrel homogenizált ebihal) és 30 l gőtéktől származó tartóvíz keverékéből állt. A vízi állatok a ragadozóveszélyt nagyon gyakran kemorecepció útján mérik fel (Tollrian és Harvell 1999, Schoeppner és Relyea 2009, Hettyey *et al.* 2010) és sok békafaj lárvája – beleértve kísérletünk modellfaját is – arról ismeretesek, hogy a sérült fajtársaktól és ragadozóktól származó kémiai jelek keverékére

érzékenyen reagálnak (Marquis *et al.* 2004, Hagman *et al.* 2009, Schoeppner és Relyea 2009, Nunes *et al.* 2013, Hettyey *et al.* 2015). A fent leírt szuszpenzióból naponta 25 ml-t adagoltunk a „ragadozóveszélynek” kitett csoport ebihalainak tartódobozába, míg a többi csoport tartóvizéhez ezzel megegyező mennyiségű RSW-t adtunk.

Az ebihalakat naponta, finomra darált nyúltáp és haleledel 4:1 arányú keverékével etettük *ad libitum*, mely testtömegük 9 %-ának megfelelő mennyiséget jelentett minden etetés alkalmával. Ezt a mennyiséget két hét után 12 %-ra emeltünk. Mivel az állatok a kísérlet során növekedtek, a beadandó pontos mennyiségeket 9 naponta korrigáltuk kezelési kombinációnként 5 véletlenszerűen kiválasztott ebihal testtömeg-átlagának megfelelően. A tartóvizet minden harmadik napon teljesen lecseréltük.

A méregtartalékok leadását *in vivo* hormonális kezeléssel kényszerítettük ki: a norepinefrin-kezelési csoport egyedeit 3 ml, 100 μ M norepinefrin-bitartrát (CAS 3414-63-9, Sigma-Aldrich, USA) vizes oldatával feltöltött 5 ml-es Eppendorf-csővekbe helyeztük 15 percre (lásd Maag *et al.* 2012). A 15 perc leteltével az ebihalakat óvatosan kivettük a homonoldatból és 1 percre áthelyeztük egy 700 ml RSW-vel feltöltött dobozba, hogy az állatok kültakaróját leöblítsük, mielőtt visszahelyeznénk őket tartóedényeikbe. A kontroll csoport ebihalaival ugyanezeket a lépéseket végeztük el annyi különbséggel, hogy hormonális oldat helyett minden lépésben mesterséges lágyvizet használtunk (kontroll). A fent leírt kezeléseket a kísérlet kezdetétől számított 20. napon végeztük az összes ebihalon.

A kezeléseket után 1 (kísérlet indításától számított 21. napon) valamint 5 nappal (25. napon) feljegyeztük a kezelési csoportokon belül az ebihalak túlélését, valamint napi 8 alkalommal megfigyeltük az ebihalak viselkedését. A viselkedési adatok gyűjtése során óvatosan közelítettük meg egyenként a tartóedényeket, majd az állatok láthatóságát feljegyeztük. Egy állatot „rejtőzködőnek” ítéltünk, ha a falevelek alatt teljesen láthatatlan volt és láthatónak, ha bármely testrésze látható volt. Minden alkalommal ugyanaz a 2 megfigyelő végezte az adatgyűjtést, és ők nem voltak tisztában azzal, hogy mely ebihalak milyen kezeléseket kaptak, így teljesült a vakon történő mintavétel kritériuma (Milinski 1997). A 28. napon lemértük az összes ebihal testtömegét (mg pontossággal), lezártuk a kísérletet, majd az ebihalakat a származási populáció élőhelyén szabadon engedték.

1.1.2. Statisztikai elemzés

A kezelések rövidtávú hatásának elemzését az ebihalak testtömegére lineáris kevert modellel (LMM) végeztük, melyhez az “nlme” csomag “lme” függvényét használtuk, mert ez lehetővé teszi az egymásba ágyazott random struktúrát a modellben. Prediktorként a hormonkezelés és a ragadozó-kezelés, valamint interakciójuk szerepelt, mint fix-faktorok. Az ebihalak viselkedésének elemzéséhez általánosított kevert modellt használtunk, melyet a “glmmADMB” csomag “glmmadmb” függvényével végeztünk (Fournier *et al.* 2012, Skaug *et al.* 2013). A ‘láthatóságot’, mely az ebihalak rejtőzködő viselkedését jellemző változó, azon esetek számával jellemeztük, melyekben az ebihal a napi 8 vizsgálat alatt láthatónak volt kategorizálva (0-tól 8-ig terjedő skála). A GLMM-et binomiális hibaeloszlással illesztettük, a láthatóságot függő változóként, míg a mintavételi időpontot, a hormonkezelést, valamint a ragadozó-kezelést és ezek interakcióját fix faktorokként vittük be a modellbe. Annak érdekében, hogy a pszeudo-replikációra kontrolláljunk (beleértve az egyedi változatosságot, a származást és a térbeli elhelyezkedést a laborban), az egyéni identitást és a családokat és a térbeli blokkokat is szerepeltettük beágyazott random hatásként a modellekben (egyedi identitás a családba, a család pedig a blokkba ágyazva). Azért egymásba ágyazott random struktúrát alkalmaztunk, mert a kísérlet felállításánál hibásan randomizáltunk, ezért voltak olyan blokkok, ahova bizonyos családok kezelési kombinációi nem kerültek be. Az időt is random hatásként adtuk hozzá a modellhez, lehetővé téve azt, hogy kontrolláljunk a kezelésekre adott viselkedési válaszok időbeli mintázatának egyedek közötti különbségeire. Az *a priori* felállított modelleket AICc (Akaike-féle információs kritérium) értékük szerint rangsoroltuk és a legalacsonyabb AIC értékű modellt választottuk. Ennek eredményeképpen a viselkedést leíró GLMM-ben végül csak a család és az egyedi identitás szerepelt, mint random factor, míg a testtömeg elemzéséhez használt LMM-ben a blokkba ágyazott család szerepelt. Minden teszt kétoldalas statisztikai próbára épült, az alfát 0,05-re állítottuk be, becsléseink Restricted Maximum Likelihood-on alapulnak. Elemzéseinket R környezetben (3.4.3. verzió, R Core Team 2014) végeztük.

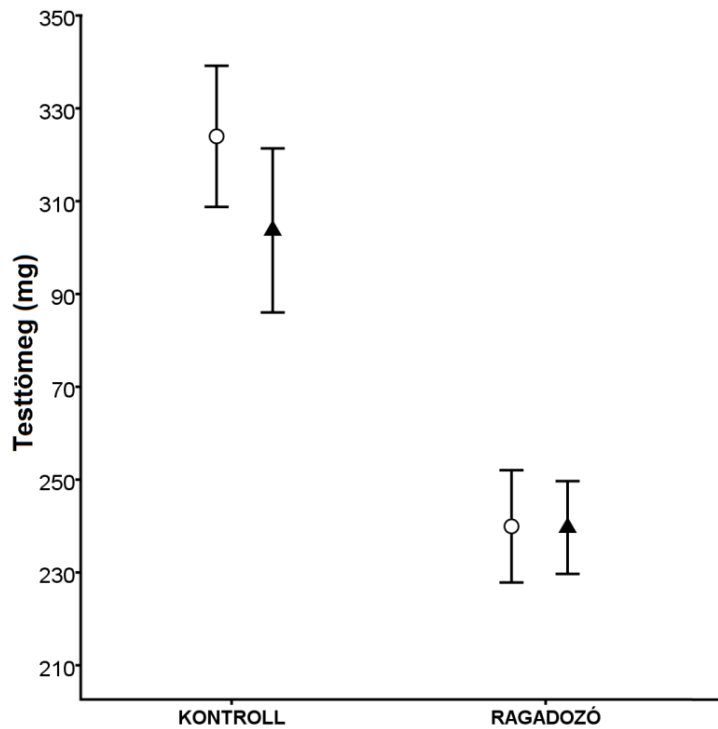
1.1.3. Eredmények

A norepinefrin-oldattal való kezelés nem befolyásolta az ebihalak túlélését, sőt, a mesterséges lágyvízben kezelt csoportokban magasabb volt a mortalitás (10%-os a 25. napon), mint a norepinefrin-oldattal kezelt csoportokban, ahol csupán az ebihalak 6%-a pusztult el a kísérlet során. A szimulált ragadozóveszély jelenlétében nevelt ebihalak testtömege jelentősen alacsonyabb volt a kontroll csoportokban mért értékeknél (4. ábra, 2. táblázat). A hormonkezelés nem volt számottevő befolyással a testtömeg változásra, habár, a kezelési csoportok között mért eltérés marginálisan szignifikáns volt ($P=0,061$, 2. táblázat).

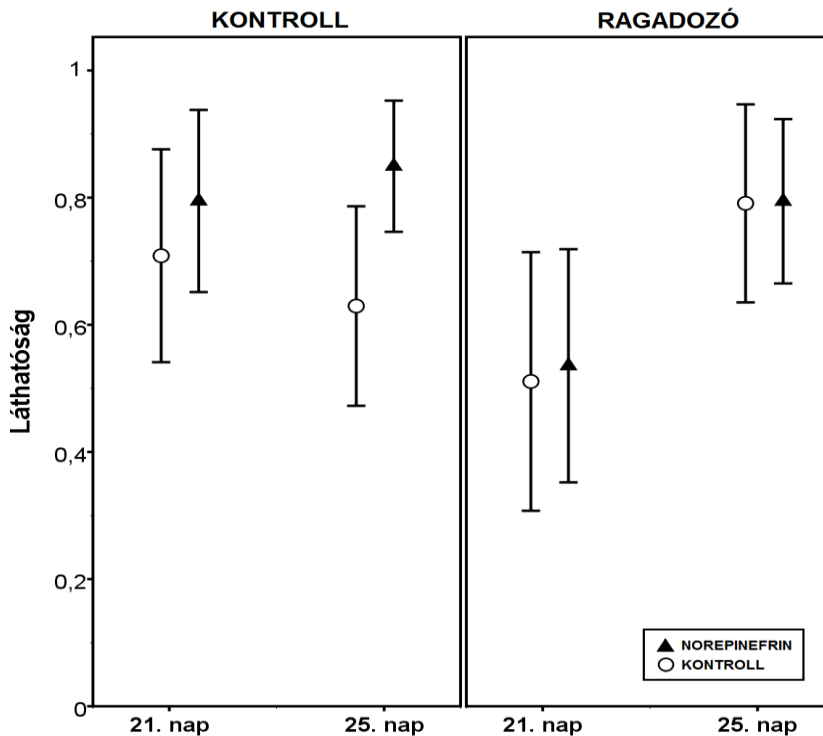
Az előbbiekhöz hasonlóan az ebihalak láthatóságában sem mutatkozott szignifikáns hatása a hormon-kezelésnek. Ez esetben is a szimulált ragadozóveszély és a mérések időpontja, valamint ezek kölcsönhatásban voltak erőteljes befolyással a mért értékekre (2. táblázat, 5. ábra).

2. táblázat. A hormon-kezelés (“KEZELÉS”), a szimulált ragadozóveszély (“RAGADOZÓ”) és a mintavétel időpontjának (“IDŐ”) hatása az ebihalak testtömegére, valamint viselkedésére (“láthatóság”). A táblázatban az illesztett modell (GLMM és LMM) tesztstatisztikáit látjuk. GLMM binomiális hibaeloszlással lett illesztve.

Függő változó	Modell	Prediktorok	X^2	df	P
Testtömeg	LMM	RAGADOZÓ	160,357	1	<0,001*
		KEZELÉS	3,501	1	0,061
		RAGADOZÓ × KEZELÉS	3,136	1	0,076
Láthatóság	GLMM	RAGADOZÓ	9,786	1	0,002*
		KEZELÉS	2,4521	1	0,117
		IDŐ	6,816	1	0,009*
		RAGADOZÓ × KEZELÉS	0,838	1	0,359
		RAGADOZÓ × IDŐ	5,146	1	0,023*
		KEZELÉS × IDŐ	2,797	1	0,094
		RAGADOZÓ × KEZELÉS × IDŐ	1,307	1	0,252



4. ábra: A hormon-kezelések és a ragadozó szimulált jelenlétének hatása a kísérlet 25. napján mért testtömege (átlagok \pm 95% Konfidencia Intervallum). A teli háromszög reprezentálja a hormonkezelést kapott egyedeket, míg az üres kör reprezentálja a sima vízben kezelt egyedeket



5. ábra: Az ábrán a kezelések hatását láthatjuk az ebihalak viselkedésére (átlag \pm 95% KI) a kísérlet 21., valamint 25. napján. A “láthatóság” a megfigyelések azon hányadát fejezi ki, mikor az ebihalak láthatóak voltak. A teli háromszög reprezentálja a hormonkezelést kapott egyedeket, míg az üres kör reprezentálja a sima vízben kezelt egyedeket

1.1.4. Értékelés

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a barna varangy ebihalakon norepinefrin-bitartrát oldatával végzett, *in vivo* méregleadás stimulálása nem károsítja nagymértékben az állatokat, legalábbis az általunk mért rövid időbeli léptékben. Ebből kifolyólag, alkalmas módszer lehet olyan tanulmányokban, melyekben az ebihalak a méregleadást követően további *in vivo* vizsgálatoknak vannak alávetve. Ilyen kutatások lehetnek pl. viselkedésvizsgálatok, életmenet jellemzők mérése, vagy a mérég újratermelés és járulékos költségeinek vizsgálata. Ezen módszer általánosan alkalmazható kétéltű lárvák bőrmirigyeinek mesterséges ürítésére, de előttünk még senki nem használta lárvális kétéltűek mérégtermelésének kutatásához, amire alkalmas módszernek bizonyult.

1.2. Bufadienolid méreganyagok újratermelődésének sebessége barna varangy ebihalakban

1.2.1. Anyag és módszer

Kísérletünkhöz 2016 kora márciusában a Garancsi-tóból 10 barna varangy petezsinórból gyűjtöttünk petéket. A petezsinór darabokat külön-külön, néhány cm mély vizet tartalmazó dobozokba helyeztük és ott tartottuk az embriók kikeléséig. Két nappal azt követően, hogy a lárvák elérték a szabadon úszó stádiumot, 2 literes tartódobozokba helyeztük őket egyesével, melyeket 7 dl mesterséges lágy vízzel töltöttünk fel. A hőmérséklet a laborban 21°C (nappal) és 18 °C (éjszaka) között ingadozott, 13-11 órás fény-sötét ciklusok váltakozása mellett. Az ebihalakat *ad libitum* tápláltuk, heti két alkalommal adagoltunk tartóedényeikbe Spirulina alga (NaturPiac, Budapest, Hungary) és spenót, 1:100 arányú, finomra darált és felfőzött keverékét. A tartóedények vizét minden harmadik napon közel teljes mértékben lecseréltük, gondosan ügyelve arra, hogy ez minimális stresszhatással járjon a kísérleti állatok számára. Ezt egy műanyag leszívócső segítségével végeztük, mely lehetővé tette, hogy gondosan szabályozzuk a leszívott víz mennyiségét, valamint elkerüljük az ebihal mechanikai stresszelését.

A kísérletet randomizált blokk elrendezésben állítottuk fel, két fő faktor szerint: kezelési típus (4 különböző kezelés) és a mintavétel időpontja (7 mintavételi időpont). Mind a 10 családból véletlenszerűen kiválasztottunk 36 szabadon úszó ebihalat, beleértve (i) a kezelési csoportok ebihalait (280 ebihal), (ii) családonként 1-1 ebihal a kiindulási méregmennyiségek becsléséhez (10 ebihal), (iii) valamint családonként további 7-7 "tartalék" ebihal (kezelésenként 1-1 (4), valamint 3 további, összesen 70 ebihal) az esetleges mortalitási veszteségek pótlására, így kapva az összesen 360 kísérletben nevelt egyedeket. Minden család egyedei egy vertikális blokkot képeztek (1-1 polcoszlop a laboratóriumban), ami 10 blokkot eredményezett.

A kísérlet kezdetétől számított 14. napon (ami átlagosan megfelelt a 35-ös fejlődési stádiumnak, Gosner 1960) a kiindulási méregtartalom meghatározásához minden családból 1-1 egyed (összesen 10) 70 %-os metil-alkoholban konzerváltunk. Ezután a kontroll csoport egyedeit kivéve (negatív kontroll) az összes kísérletben lévő ebihalat 3 kezelés egyikének tettük ki: norepinefrines hormon-oldatba helyeztük őket 15 percre, sima vízbe helyeztük őket 15 percre (pozitív kontroll), vagy üvegbottal stresszeltük őket. A negatív kontroll csoport ebihalait minimális zavarás (melyet csupán a vízcserék és az etetések jelentettek) mellett neveltük a mintavétel időpontjáig. A méregtartalékok kényszerített leadását az előző kísérletben leírtak szerint, *in vivo* hormonális kezeléssel váltottuk ki: a norepinefrin-kezelési csoport egyedeit 3 ml, 100 µM norepinefrin-bitartrát vizes oldatába helyeztük 15 percre, majd a kezelést követően

az ebihalakat 1 percre áthelyeztük 700 ml mesterséges lágyvízbe és ezt követően visszakerültek a tartódobozaikba. A pozitív kontroll kezelési csoport ebihalain a fent leírtak szerint végeztük a kezelést annyi különbséggel, hogy norepinefrines oldat helyett sima 3 ml mesterséges lágyvizet használtunk. Az állatok üvegbotos ijesztése során egy tompa végű üvegbotot az állat testéhez érintettünk egy pillanatra, gondosan ügyelve arra, hogy az állat kültakaróján ne okozzunk sérülést. Ezzel stresszes állapot előidézése volt a célunk, melynek során szövetsérülés nem történik, de ha arra képesek az ebihalak, „akaratlagosan” leadhatják a mérget. A kezeléseket után 0, 12, 24, 48, 72, 96, és 120 órával minden család minden kezelési csoportjából 1-1 ebihalat (=40 ebihal/ mintavételi időpont) véletlenszerűen kiválasztottunk és 70%-os metil-alkoholban fixáltunk.

Bufadienolidok kémiai elemzése

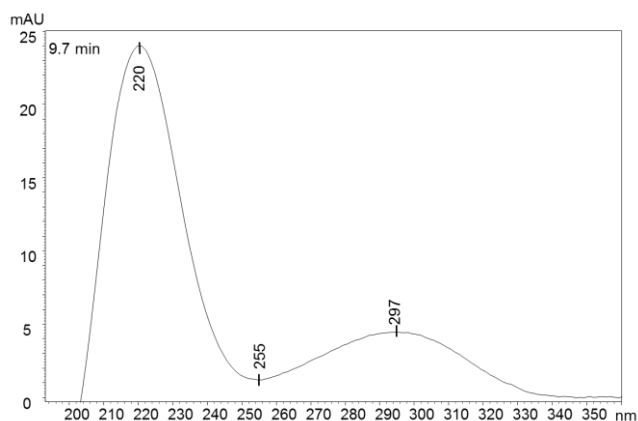
A minták feldolgozása a Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Intézetében történt (Kóréletani Osztály, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15). Az ebihalakat tartalmazó metil-alkoholos mintáinkat homogenizálást követően (VWR VDI 12 homogenizátor és IKA S12N-7S diszpergáló eszköz) forgópárológatóval (Büchi Rotavapor R-134, Flawil, Switzerland) 45 °C hőmérsékleten és folyamatosan növelt vákuum mellett kiszárítottuk, majd szárazanyag-tömegüket Ohaus Pioneer PA-114 analitikai mérlegen, 0.0001 g-os pontossággal lemértük. Ezt követően a mintáinkat 1 ml HPLC tisztaságú metil-alkohollal feltöltöttük és rövid ultrahang-kezelésnek vetettük alá. Végül, FilterBio műanyag fecskendővel és szűrővel (pórusméret= 0.22 µm) HPLC-eluenstartó üvegcsékbe szűrtük át a mintákat.

Az ebihalakban található méregkomponensek elkülönítését és relatív tömegmennyiségét nagy teljesítményű diódasoros detektorral felszerelt folyadékkromatográfiával (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, Shimadzu LC-MS-2020) kapcsolt elektropray ionizációs tandem tömegspektrometriával (HPLCDAD-MS) határoztuk meg: a HPLC-MS műszer bináris grádiens oldószer szivattyúval, vákuumos eluens gáztalanító egységgel, automatizált mintavevővel, oszloptermosztáttal, diódasoros detektorral és elektropray ionizációs tömegspektrométerrel (ESI-MS) volt felszerelve. A különböző méregkomponensek retenciós idejét és molekulásúlyát bufalin, bufotalin és arenobufagin standard oldatok (Biopurify Phytochemicals, Chengdu, China) segítségével határoztuk meg, majd a kromatogramok által felvett UV spektrum alapján 21 különböző komponenst tudtunk elválasztani a folyadékkromatográfiai elmezés során.

A kromatográfiás elválasztás 35 °C-on, C18 2.6 µm átmérőjű kolonnában (Kinetex, 100 mm × 3 mm), valamint sorba kötött C18 védőoszlopokban (4 mm × 3 mm) történt, 10 µl minta injektálással. A mozgó fázis 0,05 %-os hangyasav HPLC-tisztaságú vizes oldata volt (A oldószer), valamint 0,05 %-os hangyasav acetonitriles oldata (B oldószer). Az ESI az alábbi körülmények között működött: 250 °C “Desolvation line” (DL) hőmérséklet; 400 °C fűtő-blokk hőmérséklet; szárító N₂ gáz 15 l/perc; porlasztó N₂ gáz 1.5 l/perc; pozitív ionizációs mód. Az adatokat a LabSolutions 5.42v (Shimadzu) programmal nyertük és elemeztük ki. A bufadienolidokat a kromatogramok által felvett UV spektrumuk alapján választottuk el (6. ábra).

1.2.2. Statisztikai elemzések

A minták kvantitatív értékelése a tömegspektrometriás adatokon alapult. A bufadienolid komponensek számát minden ebihalban kiszámoltuk, azt feltételezve, hogy adott komponens jelen van, ha area értéke nagyobb volt, mint 0. A bufadienolid komponensek mennyiségét a bufotalin standard kalibrációs görbéje alapján számoltuk a kromatogram csúcsainak area-értékeiből becsülve a mennyiségeket. Azért a bufotalin kalibrációs görbét használtuk viszonyítási alapként, mert ezeket a bufotalin ekvivalens mennyiségeket később a statisztikai analízis során használtuk (3. táblázat). Ahhoz, hogy az egyedi tömegekre számolt relatív méregkoncentrációkat megkapjuk, ezeket az értékeket elosztottuk az ebihalak szárazanyag-tömegével (ng/mg; hasonló módszert lásd: Fordyce 2003, Hagman *et al.* 2009).



6. ábra. Egy példa a szteroid bufadienolidok UV-spektrumára. A bufadienolidok azonosítását csúcs retenciós idők összehasonlításával, valamint az m/z-értékek (a molekulasúlyt jelző érték) standardok, valamint 2 referencia komponens-keverékben található csúcsokhoz való viszonyításával kaptuk meg

3. táblázat. A barna varangy ebihalakban kimutatott bufadienolid vegyületek retenciós ideje és tömege, valamint a kezelések előtti és utáni előfordulási gyakoriságuk (%-ban kifejezve) a mintázott egyedekben.

Komponens	Retenciós idő (perc)	m/z	Kezelés előtti gyakoriság (%; N=10)	Kezelés utáni gyakoriság (%; N=280)
Ismeretlen komponens 1	23,5	365	20	18,93
Ismeretlen komponens 2	22,2	367	100	97,14
Ismeretlen komponens 3	11,98	401	0	6,79
Ismeretlen komponens 4	6,44	415	100	78,93
Arenobufagin	4,756	417	10	45,71
Ismeretlen komponens 5	5,236	417	100	100
Ismeretlen komponens 6	2,56	433	100	88,21
Bufotalin	10,2	445	50	74,29
Ismeretlen komponens 7	20,78	571	100	99,29
Ismeretlen komponens 8	19,5	573	60	94,64
Ismeretlen komponens 9	25,1	601	80	80,36
Marinobufotoxin	12,2	713	100	99,64
Ismeretlen komponens 10	17,7	713	100	100
Ismeretlen komponens 11	13,5	715	100	98,57
Ismeretlen komponens 12	10,5	715	100	100
Ismeretlen komponens 13	7,4	727	100	100
Ismeretlen komponens 14	6,8	729	100	100
Ismeretlen komponens 15	9,2	729	100	99,64
Ismeretlen komponens 16	9,9	729	100	100
Ismeretlen komponens 17	5,8	731	100	99,29
Ismeretlen komponens 18	17	757	100	100

Minden egyedre kiszámoltuk a bennük található teljes bufadienolid mennyiségét is, az egyes komponensek becsült mennyiségének összegzésével. Ezt a megközelítést már számos munkánkban alkalmaztunk (Bókony *et al.* 2016, 2017, 2018, Ujszegi *et al.* 2017, Üveges *et al.* 2017)

Minden elemzést R-környezetben végeztünk (R Core Team 2014). Annak elemzését, hogy a kezelések és a különböző mintavételi időpontok hogyan befolyásolták az ebihalakban kimutatott komponensek számát, a "MASS"-csomag segítségével (Venables és Ripley 2002), általánosított lineáris kevert modellt (GLMM) alkalmazva, „penalized quasi-likelihood” (PQL) becsléssel és kvázi-poisson hibaeloszlással végeztük. Ezt a modellt azért használtuk a komponensek számának elemzésére, mert az általános GLMM-ben észlelt jelentős alulszóródás volt megfigyelhető poisson hibaeloszlás feltételezése mellett (becsült szórásparaméter: 0,12). Lineáris kevert modelleket (LMM) használtunk a kezelések és a különböző mintavételi időpontok méregtartalomra való hatásának elemzésére, az R program

'nlme' csomagjának (Pinheiro *et al.* 2014) alkalmazásával. Ez utóbbi modellekben a teljes bufadienolid mennyiség, vagy az egyes komponensek mennyisége szerepelt, mint függő változó. A teljes bufadienolid mennyiség és 7 komponens esetében négyzetgyök-transzformációt alkalmaztunk, míg egy komponens esetében \log_{10} transzformációt, annak érdekében, hogy javítsunk a modellreziduálisok eloszlásán. Négy komponens esetében a kezdeti modellek reziduális-diagnosztikája nem mutatott elégséges illeszkedést az erősen oldalra tolt eloszlások miatt; ezen esetekben rangsorolt függő változókat használtunk az illesztett modellekben. Három komponens nem volt jelen a vizsgált egyedek több mint 50% -ánál; ezeket a komponenseket nem elemeztük külön, hanem csak a teljes bufadienolid mennyiség számításánál vettük figyelembe. A kezelési típust és a mintavételi időt és azok interakcióját fix változóként vittük be az összes modellbe, továbbá hozzáadtuk az ebihalak száraz tömegét is, mint potenciális zavaró változót.

A teljes bufadienolid mennyiségre illesztett modellben a komponensek számának mediántól való eltérését kovariánsként szerepeltettük, amellyel a komponensek számában lévő, egyedek közötti különbségekre kontrolláltunk. A családot random faktorként minden modellbe beépítettük, ugyanakkor az LMM-ekben a kezelések közötti variancia-különbségekre kontrolláltunk a "weights" paraméter "varIdent"-el történő hozzáadásával. P-érték alapú modellegyszerűsítést alkalmaztunk a végső modellek kiválasztására. A tesztstatisztikákat (χ^2) és a hozzájuk tartozó P-értékeket a "car" R csomagban (Fox és Weisberg 2011) található "Anova" függvény használatával számoltuk ki, 3-as típusú négyzetösszegek alapján. Az LMM feltételeinek teljesülését diagnosztikus ábrák segítségével ellenőriztük. Hogy összehasonlítsuk az egyes mintavételi időpontokon belül a kezelések közötti bufadienolid mennyiségeket, az "lsmeans" csomag (Lenth 2016) segítségével Tukey-féle post-hoc tesztek használtunk. Valamennyi teszt kétoldali, az α értéke 0,05 volt.

1.2.3. Eredmények

Összesen 21 bufadienolid vegyületet találtunk az ebihalakban, amelyek közül hármat egyértelműen bufotalin, arenobufagin és marinobufotoxinként azonosítottunk (3. táblázat). A mintavételi időpont szignifikánsan befolyásolta az egyedekben kimutatott komponensek számát ($\chi^2_6=35.98$, $P < 0.001$, 4. táblázat), viszont az alkalmazott kezelések hatásai között nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget (sem önmagában, sem a mintavételi időponttal kölcsönhatásban (mind $P \geq 0.502$, 4. táblázat). Közvetlenül a kezelést követően (0. óra) a bufadienolid komponensek száma kisebb volt, mint a legtöbb mintavételi időpontban, viszont

hasonló volt a második (12. óra) és a negyedik (48. óra) mintavételi időpontban mértekhez. Emellett a komponensek száma a harmadik (24. óra) és a negyedik (48. óra), valamint a negyedik és a hatodik (96. óra) mintavételi időpont között is különbözött (5. és 6. táblázat). A többi összehasonlítás nem adott szignifikáns különbséget (mind $P \geq 0.097,5$, táblázat). A komponensek száma az ebihalak száraz tömegével szintén növekedett ($\beta \pm SE=0.002 \pm 0.0007$, 4. táblázat), azt mutatva, hogy a nehezebb ebihalak a kísérlet során több bufadienolid komponenszt állítottak elő.

4. táblázat. A vizsgált magyarázó változók hatása a komponensek számára és a teljes bufadienolid mennyiségre. A végső modellek félkövéren vannak feltüntetve. A nem-szignifikáns prediktorokra vonatkozó statisztikákat úgy számoltuk ki, hogy azokat egyesével a végső modellekbe visszahelyeztük. Prediktorok jelmagyarázata: IDŐ (mintavételi időpont), TÖMEG (ebihalak homogenizálását és szárítását követően mért szárazanyag tömege), KEZELÉS (kezelés fajtája), Δ KSZ (komponensek számának mediánjától való eltérés). A random hatások SD \pm 95 % konfidencia intervallummal vannak megadva.

Függő változók	Modell	Random hatás (család)	Prediktorok	χ^2	df	P
Komponensek száma	GLMM, PQL és quasi-Poisson hiba eloszlással	0,04 [0,03-0,07]	INTERCEPT	14759,0	1	<0,001
			TÖMEG	8,49	1	0,004
			IDŐ	35,98	6	<0,001
			KEZELÉS	1,75	3	0,626
			IDŐ \times KEZELÉS	17,31	18	0,502
Teljes bufadienolid mennyiség*	LMM	12,99 [8,01-21,06]	INTERCEPT	370,23	1	<0,001
			Δ KSZ	9,58	1	0,002
			IDŐ	36,51	6	<0,001
			KEZELÉS	22,21	3	<0,001
			IDŐ \times KEZELÉS	33,18	18	0,016
			TÖMEG	0,75	1	0,388

*négyzetgyök-transzformált

5. táblázat. A különböző mintavételi időpontokban mért bufadienolid komponensek számára illesztett GLMM-ek páros összehasonlítása. A *P*-értékeket Tukey HSD-tesztel számítottuk; a szignifikáns kontrasztokat félkövér betűvel jelöltem.

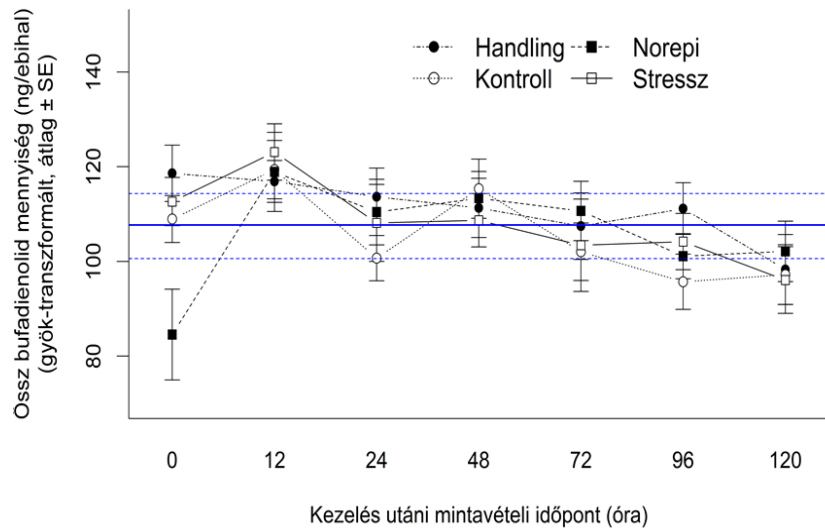
Kontraszt	Estimate	SE	df	<i>t</i>	<i>P</i>
0 hr vs. 12 óra	-0,030	0,016	263	-1,85	0,513
0 hr vs. 24 óra	-0,074	0,016	263	-4,53	<0,001
0 hr vs. 48 óra	-0,017	0,016	263	-1,05	0,941
0 hr vs. 72 óra	-0,053	0,016	263	-3,31	0,018
0 hr vs. 96 óra	-0,069	0,016	263	-4,28	0,001
0 hr vs. 120 óra	-0,055	0,016	263	-3,42	0,013
12 óra vs. 24 óra	-0,044	0,016	263	-2,72	0,097
12 óra vs. 48 óra	0,013	0,016	263	0,81	0,984
12 óra vs. 72 óra	-0,023	0,016	263	-1,42	0,788
12 óra vs. 96 óra	-0,038	0,016	263	-2,39	0,207
12 óra vs. 120	-0,025	0,016	263	-1,53	0,729
24 óra vs. 48	0,057	0,016	263	3,51	0,009
24 óra vs. 72 óra	0,021	0,016	263	1,28	0,860
24 óra vs. 96 óra	0,005	0,016	263	0,32	1
24 óra vs. 120	0,019	0,016	263	1,16	0,908
48 óra vs. 72 óra	-0,036	0,016	263	-2,25	0,272
48 óra vs. 96	-0,052	0,016	263	-3,22	0,024
48 óra vs. 120	-0,038	0,016	263	-2,36	0,219
72 óra vs. 96 óra	-0,015	0,016	263	-0,97	0,960
72 óra vs. 120	-0,002	0,016	263	-0,11	1
96 óra vs. 120	0,014	0,016	263	0,86	0,978

Az ebihalakban található teljes bufadienolid-mennyiséget szignifikánsan befolyásolta a kezelések és a mintavételi idő kölcsönhatása ($\chi^2_{18}=33.18$, $P = 0.016$; 4. táblázat): közvetlenül a kezelés után azokban az ebihalakban, amelyeket norepinefrinnel kezeltünk, a teljes bufadienolid mennyiség csökkent a többi kezeléstípushoz képest, de ez a különbség a második mintavételi időponttól, azaz 12 óra elteltével, eltűnt (6. táblázat, 7. ábra). Emellett a teljes bufadienolid mennyiség alacsonyabb volt a negatív kontroll csoport ebihalaiban, mint a pozitív kontroll csoportban, a harmadik (24 óra), illetve a hatodik (96 óra) mintavételi időpontban. Az összes többi páronkénti összehasonlítás nem adott szignifikáns különbséget (mind $P \geq 0.400$, 6. táblázat). A komponensek számának mediánjától való eltérés pozitív összefüggést mutatott a teljes bufadienolid mennyiséggel ($\beta \pm SE=2.27 \pm 0.73$, 4. táblázat), az ebihalak száraz tömegének viszont nem volt jelentős hatása a teljes bufadienolid-mennyiségre (4. táblázat).

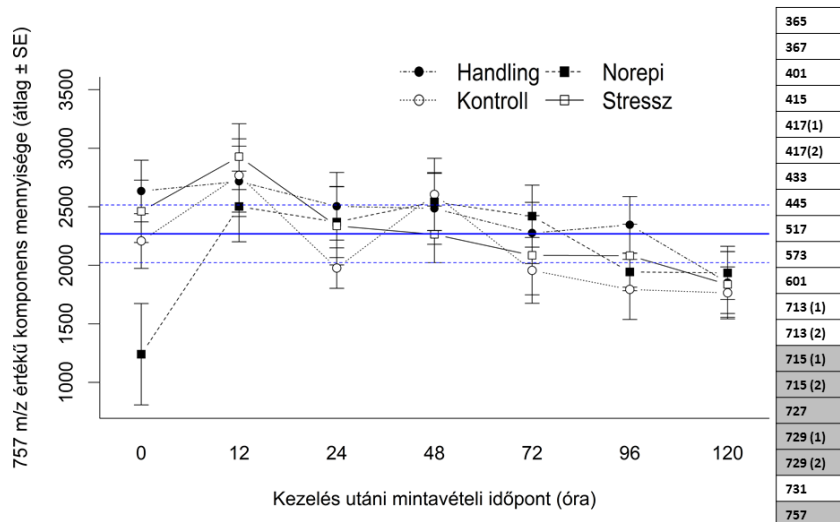
6. táblázat. A kezelések hatására bekövetkező, az ebihalakban mért teljes bufadienolid mennyiség változása a különböző mintavételi időpontokban. Az egyes mintavételi időpontokban (1: 0. óra, 2: 12. óra, 3: 24. óra, 4: 48. óra, 5: 72. óra, 6: 96. óra, 7: 120. óra) a kezelések közötti páros összehasonlítások eredményei láthatóak. Kezelések: NOREPI: norepinefrines hormon-oldatba merítés, POZITÍVK.: állatok kifogásával és kezelésével együtt járó zavarás (pozitív kontrol), STRESSZ: stressz-válasz kiváltása egy tompa üvegbottal való érintéssel, KONTROLL: negatív kontrol.

Mintavételi időpont	Kontraszt	Becslés	SE	df	t	P
1	KONTROLL - POZITÍVK.	-7,83	5,78	242	-1,36	0,528
	KONTROLL - NOREPI	25,09	7,07	242	3,55	0,003
	KONTROLL - STRESSZ	-2,54	6,43	242	-0,40	0,979
	POZITÍVK. - NOREPI	32,93	7,15	242	4,61	<0,001
	POZITÍVK. - STRESSZ	5,29	6,50	242	0,81	0,848
2	NOREPI - STRESSZ	-27,64	7,69	242	-3,59	0,002
	KONTROLL - POZITÍVK.	1,12	5,76	242	0,19	0,997
	KONTROLL - NOREPI	-1,34	7,10	242	-0,19	0,998
	KONTROLL - STRESSZ	-3,94	6,42	242	-0,61	0,927
	POZITÍVK. - NOREPI	-2,46	7,14	242	-0,34	0,986
3	POZITÍVK. - STRESSZ	-5,06	6,50	242	-0,78	0,864
	NOREPI - STRESSZ	-2,60	7,71	242	-0,34	0,987
	KONTROLL - POZITÍVK.	-15,69	5,81	242	-2,70	0,037
	KONTROLL - NOREPI	-11,10	7,08	242	-1,57	0,400
	KONTROLL - STRESSZ	-8,12	6,42	242	-1,26	0,586
4	POZITÍVK. - NOREPI	4,59	7,15	242	0,64	0,918
	POZITÍVK. - STRESSZ	7,57	6,53	242	1,16	0,653
	NOREPI - STRESSZ	2,97	7,69	242	0,39	0,980
	KONTROLL - POZITÍVK.	2,48	5,77	242	0,43	0,973
	KONTROLL - NOREPI	2,00	7,07	242	0,28	0,992
5	KONTROLL - STRESSZ	6,21	6,42	242	0,97	0,768
	POZITÍVK. - NOREPI	-0,49	7,16	242	-0,07	1,000
	POZITÍVK. - STRESSZ	3,73	6,50	242	0,57	0,940
	NOREPI - STRESSZ	4,21	7,69	242	0,55	0,947
	KONTROLL - POZITÍVK.	-6,08	5,75	242	-1,06	0,716
6	KONTROLL - NOREPI	-9,75	7,08	242	-1,38	0,515
	KONTROLL - STRESSZ	-3,86	6,47	242	-0,60	0,933
	POZITÍVK. - NOREPI	-3,67	7,14	242	-0,51	0,956
	POZITÍVK. - STRESSZ	2,22	6,52	242	0,34	0,986
	NOREPI - STRESSZ	5,89	7,70	242	0,76	0,870
7	KONTROLL - POZITÍVK.	-15,69	5,75	242	-2,73	0,034
	KONTROLL - NOREPI	-4,72	7,07	242	-0,67	0,909
	KONTROLL - STRESSZ	-8,03	6,42	242	-1,25	0,595
	POZITÍVK. - NOREPI	10,96	7,14	242	1,53	0,418
	POZITÍVK. - STRESSZ	7,65	6,50	242	1,18	0,641
7	NOREPI - STRESSZ	-3,31	7,69	242	-0,43	0,973
	KONTROLL - POZITÍVK.	-1,32	5,75	242	-0,23	0,996
	KONTROLL - NOREPI	-5,14	7,07	242	-0,73	0,886
	KONTROLL - STRESSZ	-0,23	6,43	242	-0,04	1,000
	POZITÍVK. - NOREPI	-3,82	7,14	242	-0,54	0,950
7	POZITÍVK. - STRESSZ	1,09	6,50	242	0,17	0,998
	NOREPI - STRESSZ	4,91	7,70	242	0,64	0,920

Páros összehasonlítások: Tukey HSD-teszt, a *P*-érték becslések és a standard hiba (SE) transzformált skálán (négyzetgyök) vannak kifejezve.



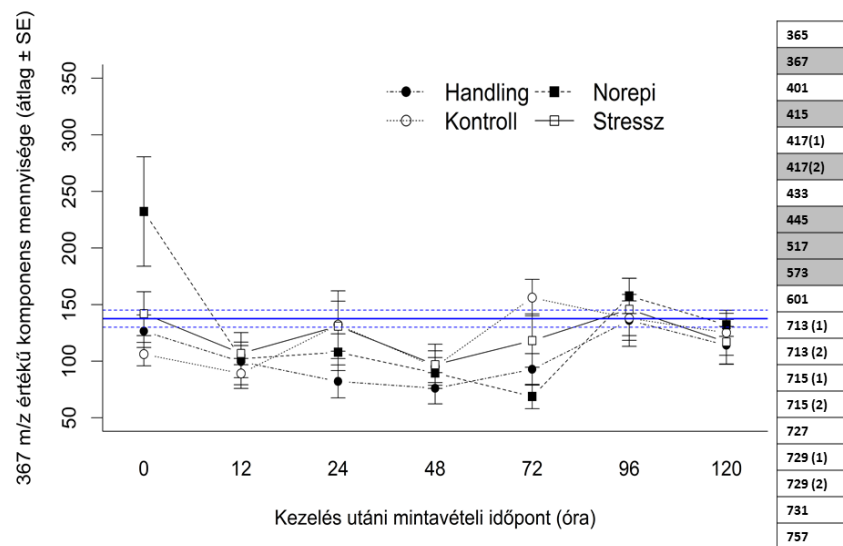
7. ábra. A teljes bufadienolid-mennyiség változása a kiindulási átlagértékhez (kék vonal) képest, a mintavételi időpont és a kezelések függvényében.



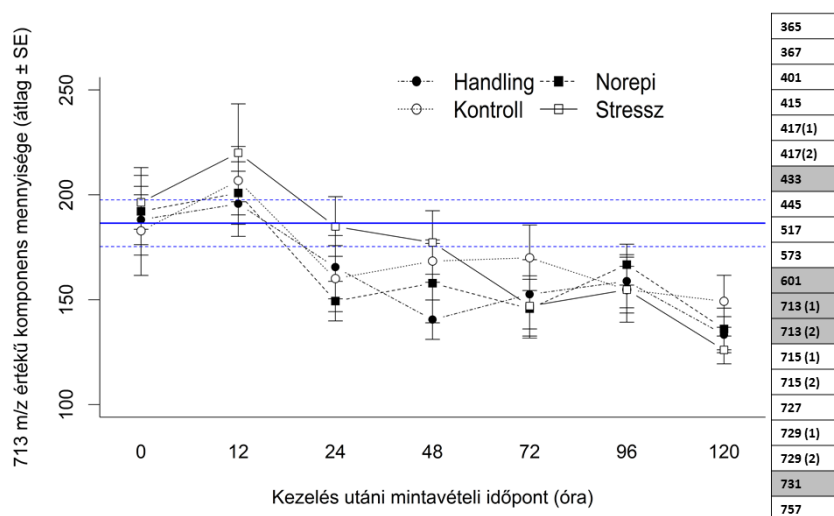
8. ábra. Példa egy olyan komponensre, melynek mennyisége a kiindulási értékekhez (kék vonal) képest szignifikánsan csökkent a kezelés után az ebihalakban. Az ábra melletti oszlopban az összes bufadienolid komponens molekulatömege van feltüntetve, szürkével az ábrához nagyon hasonló mintázatot mutató komponensek (6 db).

A 18 egyedileg elemzett, azonosítatlan bufadienolid komponens közül 12 komponens mennyisége jelentősen függött a kezelés típusa és a mintavételi időpont közötti kölcsönhatástól (4. és 7. táblázat). Ezek közül a vegyületek közül hat olyan komponens volt, melynek a norepinefrines kezelés hatására lecsökkent a mennyisége a többi kezelési csoporthoz képest, majd 12 órán belül láthatóan helyreállt a kiindulási, stimulus előttihez hasonló mennyiség, a teljes bufadienolid mennyiség változásához hasonlóan (8. ábra). Mindezek a komponensek >700 m/z értékkel jellemezhetőek, a bufotoxinok közé sorolhatóak. A másik hat komponens

ellentétes mintázatot mutatott: ezeknek a komponenseknek a mennyisége közvetlenül a kezelést követően szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportban, miközben ez a különbség 12 óra elteltével eltűnt (9. ábra). Ezekre a komponensekre <math><600\text{ m/z}</math> érték volt jellemző, tehát mind a kisebb molekulásúlyú bufogeninek kategóriájába sorolhatóak. A többi bufadienolid komponens mennyiségét nem befolyásolták szignifikánsan a kezelések ($P \geq 0.066$, 7. táblázat, 1. melléklet).



9. ábra. Példa egy olyan komponensre, melynek tömege a kiindulási értékekhez képest szignifikánsan nőtt a kezelés hatására az ebihalakban. Az oszlopban szürkével azon komponensek vannak jelölve, melyek az ábrához hasonló mintázatot mutattak (6 db).



10. ábra. Példa olyan komponensre, melynél a kezeléseknak semmilyen hatását nem tapasztaltuk. Az oszlopban szürkével azon komponensek vannak jelölve, melyek az ábrához hasonló mintázatot mutattak.

1.2.4. Értékelés

Kísérleti bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a norepinefrin-oldattal való kezelés hatására a bőrmirigyekben található méregtartalékok leadása megtörtént, valamint 12 óra elteltével az eredeti mennyiségi viszonyok helyreálltak, ami extrém gyors újratermelőésre vagy a komponensek egymásból való átalakulására utal. Ezt a változást azonban csak a hormonkezelt egyedeknél figyeltük meg. Az ebihalakban található komponensek számára azonban, a kezdeti feltételezéseinknek megfelelően nem volta hatással a kezelés. Fontos azonban kiemelni, hogy a komponensek nem azonos módon reagáltak a norepinefrin-oldatos kezelésre: a nagyobb méretű, összetett oldalláncokkal rendelkező bufotoxin-jellegű komponensek, és a kisebb, egyszerűbb bufogenin-jellegűek többségének mennyiségére ellentétesen hatott a kezelés. E mintázat magyarázatára több hipotézist vethetünk fel.

Ha a bufogeninek valóban hatékonyabb vegyületek toxicitás szempontjából (Meng *et al.* 2016, lásd Shimada *et al.* 1985, 1986, 1987), akkor a barna varangy ebihalak a bufadienolidokat feltehetően bufotoxinok formájában tárolják, hogy megkönnyítsék az *in situ* szállításukat és gátolják a tárolás során bekövetkező esetleges önmérgezést. A szekréció során ezek a vegyületek enzimatis katalízis során aktív bufogeninekké alakulnak át (akár saját specifikus enzimjeik, akár bakteriális biotranszformáció útján, Hayes *et al.* 2009b) és úgy kerülnek leadásra bőr felületén, hogy ott erős toxikus hatást fejtsenek ki. Mivel a mérgezőbb vegyületek általában jobban lipofilek (mely lehetővé teszi, hogy lipoproteinekkal szállítódjanak a vérben és gyorsan felszívódjanak a lipidmembránokon keresztül, Dekant 2009), ezek a komponensek védelmet nyújtanak az őket termelő egyedeknek, amíg a kültakaróra kiválasztott mérgek eltávolítódnak a bőrrel. Ezt az elképzelést támasztja alá az a tény is, hogy az ebihalakban alapállapotban a <500 m/z-értékű vegyületek sokkal kisebb mennyiségben voltak jelen a toxin keverékben, mint a >700 m/z bufadienolidok (átlag \pm SD: $343,2 \pm 62,2$, szemben $11032,6 \pm 4604,3$ bufotalin ekvivalens ng/ebihal; Wilcoxon-teszt: $V=55$, $N=10$, $P=0,002$).

Egy másik magyarázat lehet, hogy az alacsonyabb m/z-értékekkel jellemezhető bufadienolidok valójában az összetettebb, konjugált, bőrmirigyekben tárolt bufotoxinok prekursorai, és mennyiségüket a kísérletben megnövelték az alkalmazott hormonkezelés okozta gyors *de novo* szintézis miatt. A hormonális kezelés hatására ürül az összes komponens, míg a kis molekulásúlyú „építőkövek” a kezelés 15 perce alatt gyorsan újratermelődtek. Ezen lehetséges magyarázat kapcsán viszont felvetődik a kérdés, hogy lehetséges-e az ebihalak szervezetében az ilyen gyors *de novo* bufadienolid szintézis.

A bőrmirigyek bufadienolid bioszintézisének és biotranszformációjának sebességéről hiányosak az ismereteink; emellett a mesterségesen indukált mérgeleadással foglalkozó korábbi kísérletek általában invazívabb módszereket alkalmaztak, és juvenilis vagy felnőtt egyedeken, elnagyoltabb időskálákban lettek kivitelezve. Például egy dél afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett kísérletben norepinefrines-oldat alacsony koncentrációjú dózisének bőr alá injektálását követően Giovannini és munkatársai (1987) a bőrben levő anti-mikrobiális peptidok kezdeti mennyiségének teljes újratermelődését 2-6 nap alatt figyelték meg. Abban az esetben, mikor a norepinefrin-oldat lényegesen magasabb koncentrációját injektálták az állatokba, és a peptidtartalékok teljesen kiürültek, a kiindulási peptidmennyiség visszatermelődése 7-9 hetet vett igénybe ugyanabban a fajban (Ramsey *et al.* 2010) és több mint 56 napig leopárd békákban (*Rana pipiens*, Pask *et al.* 2013). A varangyokon végzett korábbi tanulmányokban többnyire csak ragadozó harapását szimuláló, mechanikai behatások (parotoid mirigyek préselése) szövettani következményeit vizsgálták, de a mirigyek alveolusaiban bekövetkező mérge-újratermelődés csak a következtetés volt, nem volt kifejezetten mérve és számszerűsítve (Toledo *et al.* 1992, Jared *et al.* 2009, 2014).

Függetlenül a mögötte meghúzódó pontos mechanizmustól, a bufadienolid komponensek eredeti szintje meglepően gyorsan visszaállt a hormonkezelt állatokban. Bár csak részleges ürítést sikerült indukálnunk a vizsgálatunkban, a leadott mérge mennyisége a természetes körülményekhez hasonló lehet. Egy korábbi tanulmányban azt bizonyították, hogy a felnőtt *Rhinella icterica* varangyok parotoid mirigyének súlyos roncsolását követően, míg néhány alveolus véglegesen működésképtelen maradt, addig mások teljesen érintetlenül maradtak az eljárás során, így hozzájárultak az állatok toxicitási szintjének fenntartásához (Jared *et al.* 2014). A kétélűek mérge-mirigyei jellemzően passzív védelemre specializálódtak (Jared *et al.* 2009, Mailho-Fontana *et al.* 2014), olyan morfológiai jellemzőkkel, amelyek elősegítik a mérgek fizikai nyomásra történő felszabadulását, tehát a bufadienolidok csak akkor kerülnek ki az ebihalak egysejtű bőrmirigyeiből a külvilágra, ha azokat nagyfokú nyomás vagy sérülés éri egy ragadozó támadás során. Ez azt is megmagyarázza, hogy a teljes bufadienolid mennyisége miért csak a hormontartalmú oldattal stimulált ebihalakban változott a kísérletben, míg a többi stresszt okozó kezelésnek pedig nem volt ilyen hatása. A mérge-raktárak gyors feltöltődése összhangban van a másik vizsgálatunkban kapott eredményekkel, mely arra utal, hogy a fokozott mérgetermelés alacsony fitness költségekkel jár a barna varangy ebihalak számára (Kurali *et al.* 2016). Ez a két eredmény együtt azt mutatja, hogy egy kockázatos környezetben az ebihalak kémiai jól védettek a ragadozók ismételt támadásaival szemben és az egyedek fenntarthatják a kellő toxicitási szintet jelentős, más ragadozók elleni védekezési

mechanizmusokra kiterjedő kompromisszumok nélkül. Ez azonban csak akkor kifizetődő, ha az ebihalakat ért támadások csak kis arányban okoznak sérülést, ami lényegesen megváltoztathatja a passzív kémiai védekezéssel járó költségeket. Egy metaanalízis során Zvereva és Kozlov (2016) sem talált kimutatható fiziológiai költségeket, mely növényevő rovarok ragadozók elleni kémiai védekezéséhez köthető, ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a járulékos ökológiai költségek fontosabbak lehetnek a kémiai védelem szempontjából, mint az ahhoz szükséges források megszerzésének költségei.

Kimutattuk, hogy a barna varangy ebihalakban a méregtartalékok mesterséges ürítését követően a mennyiségi viszonyok 12 órán belül helyreállnak, mely egy mélyebb betekintést engedett a méregtermelés élettani hátterébe ebben a fajban. Vizsgálatunk azt is hangsúlyozza, hogy az összetett, több komponensből álló méreg-keverékeket szintetizáló fajok esetében a termelt komponensek számának és teljes méregmennyiségnek az elemzése önmagában, specifikus alcsoportokra való felosztás nélkül elfogult következtetéseket vonhat maga után. Bár a komponensek mennyiségi változásai érdekes mintázatot mutattak a vizsgálatunkban, további vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy tisztázni lehessen a különböző bufadienolid vegyületek közötti funkcionális különbségeket, valamint a méreg szintézis és biotranszformáció pontos mechanizmusát.

7. táblázat. Az egyes bufadienolid komponensek a norepinefrines kezelés és a többi kezelési csoportok között mennyiségének kontraszt becslések a standard hibák feltüntetésével (7 komponens esetében négyzetgyök-transzformációt alkalmaztunk, annak érdekében, hogy javítsunk a modellreziduálisok eloszlásán: † négyzetgyök transzformált; †† log-transzformált; ††† rank-transzformált) . Csak azokat a vegyületeket mutatjuk be a táblázatban, amelyek mennyiségét az LMM-ekben jelentősen befolyásolta a mintavételi idő × kezelési kölcsönhatása. A *P*-értékeket Tukey HSD-teszttel számítottuk; a szignifikáns kontrasztokat vastag betűvel jelöltem.

Komponens	m/z	Mintavétel	KONTROLL - NOREPI	POZITÍVK.- NOREPI	NOREPI - STRESSZ
Ismeretlen komponens 2 [†]	367	0 óra	-5.08 ± 1.03	-4.22 ± 1.26	3.28 ± 1.21
		12 óra	-0.40 ± 1.03	0.70 ± 1.25	-1.19 ± 1.21
Ismeretlen komponens 5 ^{††}	417	0 óra	-0.60 ± 0.14	-0.24 ± 0.15	0.42 ± 0.15
		12 óra	-0.10 ± 0.14	-0.09 ± 0.15	-0.04 ± 0.15
Bufotalin ^{†††}	445	0 óra	-122.39 ± 26.50	-93.81 ± 26.52	80.64 ± 26.36
		12 óra	-14.38 ± 26.51	-13.77 ± 26.28	-7.95 ± 26.29
Ismeretlen komponens 7 [†]	571	0 óra	-5.54 ± 1.43	-4.66 ± 1.43	2.54 ± 1.42
		12 óra	-1.11 ± 1.43	-1.01 ± 1.41	0.44 ± 1.41
Ismeretlen komponens 8 [†]	573	0 óra	-4.18 ± 1.17	-3.77 ± 1.18	2.98 ± 1.41
		12 óra	0.99 ± 1.17	0.91 ± 1.17	-1.27 ± 1.40
Ismeretlen komponens 11	715	0 óra	1410.47 ±	1859.34 ± 407.66	-1278.42 ± 444.50
		12 óra	147.15 ± 447.57	55.36 ± 407.66	-443.82 ± 444.50
Ismeretlen komponens 12 [†]	715	0 óra	9.09 ± 2.52	13.04 ± 2.52	-8.76 ± 2.52
		12 óra	1.97 ± 2.52	-0.97 ± 2.52	-4.61 ± 2.52
Ismeretlen komponens 13	727	0 óra	691.78 ± 231.26	991.83 ± 232.28	-762.40 ± 245.46
		12 óra	-4.72 ± 231.26	-199.50 ± 232.28	-44.17 ± 245.46
Ismeretlen komponens 14 [†]	729	0 óra	14.84 ± 3.93	18.63 ± 4.08	-16.42 ± 4.14
		12 óra	-0.92 ± 3.93	-1.96 ± 4.08	-0.70 ± 4.14
Ismeretlen komponens 15	729	0 óra	241.44 ± 65.29	312.13 ± 58.88	-300.42 ± 70.56
		12 óra	-54.86 ± 65.29	-97.59 ± 58.88	103.55 ± 70.56
Ismeretlen komponens 18	757	0 óra	967.25 ± 289.62	1394.10 ± 294.01	-1220.98 ± 313.10
		12 óra	-67.91 ± 289.62	-118.22 ± 294.01	-92.87 ± 313.10

2. Fejezet: A kémiai védekezés lehetséges költségeinek és egyéb, ragadozók elleni védelmi mechanizmussal való csereviszonyának vizsgálata

2.1. Anyag és módszer

Kora tavasszal 8 barna varangy párt gyűjtöttünk a Garancsi-tóból, melyeket a Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Intézetének júliannamajori kísérleti telepére szállítottuk. A varangy párokat külön-külön, 120 l-es dobozokba petéztettük, a fejlődésnek indult embriókat pedig családonként a kikelésig külön neveltük. A kísérletet akkor indítottuk, mikor a lárvák elérték a szabadon úszó állapotot (25-ös lárvastádium; Gosner 1960). Véletlenszerűen kiválasztottunk családonként 80 ebihalat, majd ezeket 2 literes nevelődobozokba helyeztük egyesével, melyeket 7 dl mesterséges lágy vízzel töltöttünk fel., valamint 3-3 bükklevelet helyeztünk bele, mely az ebihalaknak búvóhelyül szolgált. A hőmérséklet a laborban 22 °C és 17 °C között ingadozott, 13-11 órás fény-sötét ciklusok mellett.

15 pettyes götte hímet gyűjtöttünk műanyag palackcsapdákkal a Visegrádi-hegység 3 tavából (lásd: mintavételi terület). A befogott góttéket a laboratóriumban helyeztük el egyesével 5 literes műanyag tartódobozokban. Minden doboz 2 l mesterséges lágyvizet és egy agyag edényt tartalmazott. Az állatokat csövájó féreggel *ad libitum* etettük és minden nap cseréltük a tartóvizüket. A kísérlet lezárását követően az összes állatot a befogási helyükön szabadon engedték.

A kísérletet teljes faktoriális randomizált blokk elrendezésben állítottuk fel a következő faktorokkal: ragadozó jelenlétét szimuláló kémiai jelek jelenléte, illetve hiánya, táplálékmenyiség (*ad libitum*, illetve csökkentett), hormonkezelés (norepinefrin-oldattal, vagy hormonmentes tiszta vízzel) két különböző gyakorisággal (egyszeri, vagy háromszori kezelés). A kísérletben összesen 640 ebihal vett részt, melyeket a 8 családból véletlenszerűen választottuk ki: családonként 80 szabadon úszó ebihalat osztottunk szét a 16 kezelési kombinációba. A kísérlet felállításánál pontatlanul osztottuk ki az ebihalakat, ami 3 kezelési csoport esetében egy-egy extra egyed, másik három kezelési csoport esetében pedig eggyel kevesebb egyed eredményezett. Ez a hiba azonban elhanyagolható hatással lehetett az eredményeinkre, mivel a kezelési kombinációkban nagy mintaszámokkal (átlagosan 40 egyed / kezeléskombináció) dolgoztunk. Az egyesével nevelt kísérleti ebihalakat a laborban ismert függőleges hőmérsékleti gradiens mentén 5 blokkba osztottuk ki. A ragadozóveszélyt szimuláló

kémiai jelek kísérlethez használt pettyes gőték tartóvizéből és fajtársak homogenizátumának elegyéből állt. A szuszpenzióhoz (közvetlenül a tartóvizekbe-mérést megelőzően) kb. 1.92 g (6-20 egyed, mérettől függően) barna varangy ebihalat 100 ml mesterséges lágyvízben homogenizáltunk, majd a pettyes gőték tartóvizével (összesen 30 l) kevertük össze. A szuszpenzióból naponta 25 ml-t adagoltunk a „ragadozóveszélynek” kitett csoport ebihalainak tartódobozába, míg a többi csoport tartóvizébe ezzel megegyező mennyiségű RSW-t adagoltunk. A szuszpenzió maradékát egy másik kísérletnél használtuk fel (lásd: 4. Fejezet).

Azt is vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a mért fenotípusos jellemzőket a rendelkezésre álló táplálék mennyisége. Az ebihalakat naponta finomra darált nyúltáp és haleledel 4:1 arányú keverékével etettük. Azok az ebihalak, melyek *ad libitum* táplálékmennyiség mellett lettek nevelve, testtömegük 9%-nak megfelelő keveréket kaptak minden etetés alkalmával, amit két hét után 12%-ra emeltünk, a csökkentett táplálékmennyiséget pedig ennek harmadában határoztuk meg (testtömeg 3, később 4 %-a). Az állatoknak beadandó táplálékmennyiségeket 9 naponta korrigáltuk, a kezelési kombinációként 5 véletlenszerűen kiválasztott ebihal testtömeg-átlagának megfelelően. A tartóvizet minden harmadik napon teljesen lecseréltük.

A méregtermelésbe való befektetés manipulálásához ebben a kísérletben is *in vivo* hormonális kezelést alkalmaztunk, hogy előidézzük a börmirigyekben raktározott méregtartalékok mesterséges ürítését. A norepinefrin-kezelési csoport egyedeit az 2. vizsgálatnál leírtakkal megegyezően 3 ml, 100 μ M norepinefrin-bitartrát vizes oldatába helyeztük 15 percre, majd a kezelést követően az ebihalakat 1 percre áthelyeztük 700 ml mesterséges lágyvízbe és ezt követően visszakerültek a tartódobozaikba. A kontroll csoport ebihalain hormonmentes, mesterséges lágyvízzel végeztük a kezelést („handling”). A fent leírt procedúrát 2 különböző gyakorisággal végeztük. Ennek megfelelően a kísérleti ebihalak fele (320 ebihal) 3 alkalommal (a kísérlet kezdetétől számított 8., 16. és 24. napon), míg másik fele (320 ebihal) egyszer részesült kezelésben (16. napon).

Mikor a kísérletben résztvevő ebihalak már közel jártak az átalakuláshoz, a tartóedényeket napi kétszer ellenőriztük. Amint egy átalakulását megkezdő egyedeket találtunk (mellső lábak megjelenése – 42-es fejlődési stádium, Gosner 1960), a kísérletet túlélő egyedként jelöltük, valamint feljegyeztük az átalakulás napját és az ekkor mért testtömeget (mg pontossággal). Ezt követően az átalakuló egyedeket nagy méretű, mesterséges lágyvízzel és falevelekkel részlegesen megtöltött tartódobozokba helyeztük, majd a kísérlet lezárását követően a származási populáció élőhelyén szabadon engedték őket.

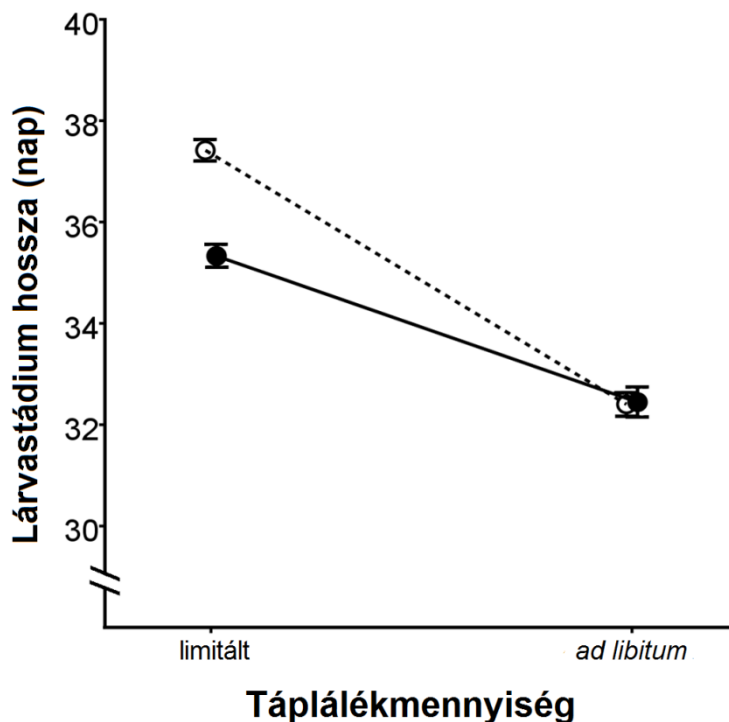
2.2. Statisztikai elemzés

Az átalakulás időzítését és az átalakuláskor mért testtömeget befolyásoló tényezők vizsgálatához lineáris kevert modelleket (LMM), míg a túlélést befolyásoló tényezők vizsgálatához általánosított kevert modelleket (GzLMM) használtunk, ahol binomiális hibaeloszlással illesztettük a modellt. A térbeli blokkot mint random hatást vettük be a modellekbe. Az analíziseket R-környezetben (R 3.2.2. verzió) „lme4” csomag „glmer” és „lmer” függvényével (Bates *et al.*, 2015) futtattuk. A kezdeti modellekbe bevittük a prediktorok (táplálékmenyiség, ragadozókezelés, hormonális kezelés és a kezelések gyakorisága) lehetséges interakcióit, majd modellegyszerűsítést alkalmaztunk (Reiczigel *et al.* 2010), hogy elkerüljük a túlparametrizálást és a nem szignifikáns modell-összetevők benthagyása okozta esetleges hibákat (Engqvist 2005). A modellegyszerűsítés során a prediktorokat egyesével szelektáltuk ki, minden lépésben az aktuálisan legmagasabb P -értékű interakció, majd faktor került ki a modelltől, végül csak a $P \leq 0.05$ hatásokat megtartva a végső modellben (Grafen és Hails, 2002). A modellilleszkedést diagnosztikus ábrákkal teszteltük. Minden teszt kétoldalas statisztikai próbára épült, az alfát 0,05-ös értékre állítottuk be.

2.3. Eredmények

A lárvastádium hossza

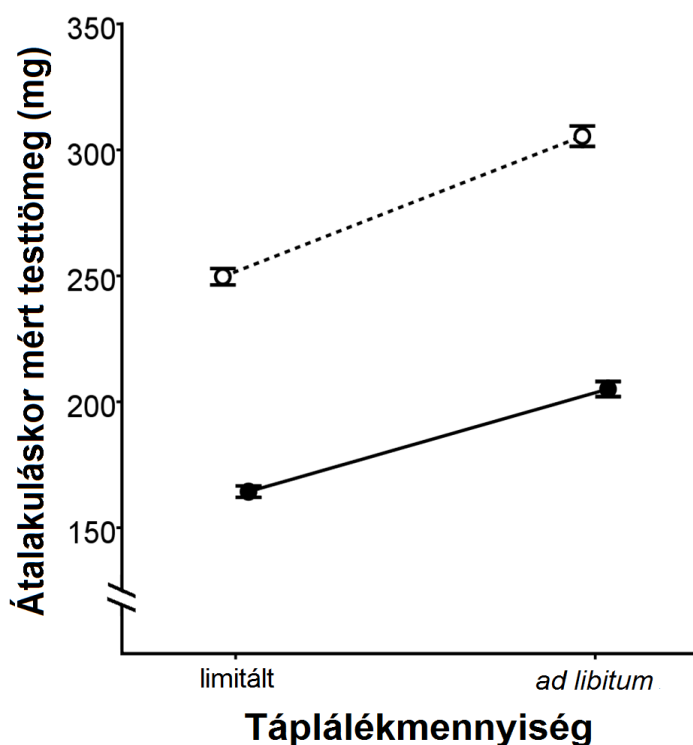
Nem tudtuk kimutatni sem a hormonális kezelés, sem a kezelések gyakorisága esetében, hogy önmagában, vagy interakcióban szignifikáns hatással lenne az átalakulás időzítésére (8. táblázat). Ebből arra következtethetünk, hogy a méregtartalékok sűrítésének stimulálása és a kezelésekből adódó stressz nem befolyásolta az ebihalak egyedfejlődésének hosszát, vagy az egyéb kezelések lárvastádium hosszára való hatását. Mindazonáltal a táplálékmenyiség és a ragadozó szimulált jelenléte egymással interakcióban szignifikánsan hatott a fejlődési sebességre (8. táblázat; 11. ábra): mikor a táplálék csak korlátozottan állt rendelkezésre, a ragadozó szimulált jelenlétében nevelkedett ebihalak hamarabb alakultak át (átlag \pm SE= 35.32 ± 0.23 nap), mint azok az egyedek, melyek tiszta vízben nevelkedtek (37.42 ± 0.22 nap), ugyanakkor *ad libitum* táplálékmenyiség mellett a predációs veszély okozta különbség nem volt kimutatható (ragadozóktól származó kémiai jelek mellett: 32.45 ± 0.30 nap; ezek hiányában: 32.40 ± 0.23 nap).



11. ábra. A táplálékmegvonás és a ragadozó szimulált jelenlétének együttes hatása a lárvastádium hosszára (átlagok \pm SE). A folytonos vonal a telt szimbólumokkal jelzi a ragadozó szimulált jelenlétét, míg a szaggatott vonal az üres szimbólumokkal reprezentálja a ragadozószag-mentes kezeléseket.

Átalakuláskor mért testtömeg

A testtömeget nem befolyásolta a hormonális kezelés, vagy annak gyakorisága, sem ezek interakciója, bár a ragadozó-kezelés és a hormonális kezelés interakciójának hatása marginálisan nem-szignifikáns volt (8. táblázat): ragadozószag hiányában a hormonnal kezelt ebihalak jellemzően kisebb testtömeeggel rendelkeztek, mint azok, melyeknél sima vízben végeztük el a kezelést, míg ragadozószag jelenlétében az ebihalak testtömege hasonló volt, hormonális kezeléstől függetlenül. A táplálék elérhetőség és a ragadozó szimulált jelenléte és ezek interakciója szignifikánsan befolyásolta az ebihalak testtömeget (8. táblázat; 12. ábra). A csökkentett táplálékmennyiség negatív hatást gyakorolt a mért testtömeg értékekre a ragadozók jelenlétét szimuláló kémiai jelek jelenlétében (csökkentett táplálékmennyiség: 164.32 ± 2.27 mg, ad libitum táplálék: 205.06 ± 4.13 mg) és hiányában egyaránt (csökkentett táplálékmennyiség: 249.68 ± 3.26 mg; ad libitum táplálék: 305.47 ± 4.04 mg), és ez a hatás kifejezettebb volt azokban az esetekben, amikor az ebihalak fejlődésük során nem találkoztak ragadozószaggal (12. ábra).



12. ábra: A táplálék-megvonás és a ragadozó szimulált jelenlétének együttes hatása az átalakuláskor mért testtömege (átlagok \pm SE). A folytonos vonal a telt szimbólumokkal jelzi a ragadozó szimulált jelenlétét, míg a szaggatott vonal az üres szimbólumokkal reprezentálja a ragadozószag-mentes kezeléseket.

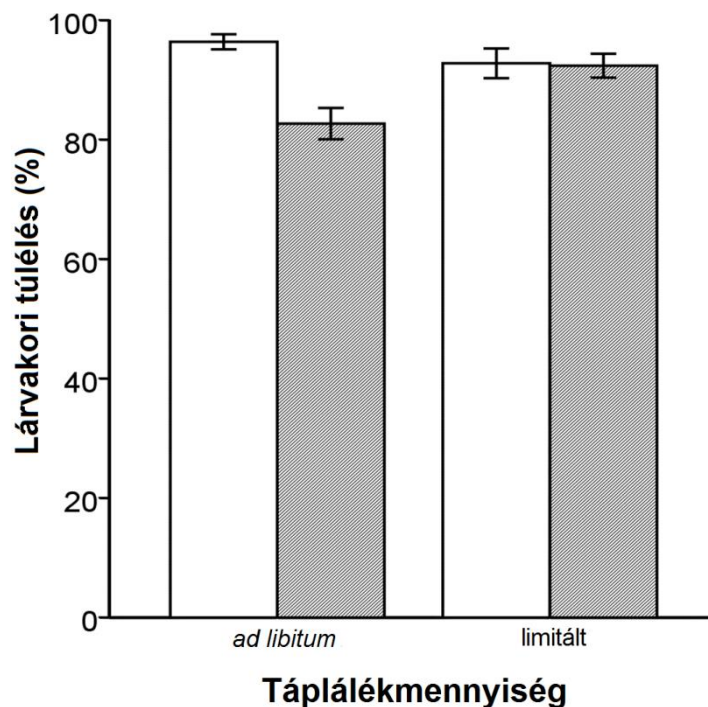
8. táblázat. A kezelések lárvastádium hosszára, az ebihalak átalakuláskor mért testtömegére (LMM) és a lárvakori túlélésre (GzLMM) kifejtett hatásai. A *P*-értékek számolásához minden modell esetén Wald χ^2 -teszteket alkalmaztunk, az R-program „car” csomagban található „Anova” függvényének segítségével (Fox és Weisberg 2011). A végső modellekben szereplő tényezőket félkövér betűtípussal jelöltem, a többi prediktorhoz tartozó teszt-statisztikákat és *P*-értékeket úgy nyertük, hogy egyesével hozzáadtuk őket külön-külön a végső modellhez (NE: hormon-kezelés, Gyak.: a kezelések gyakorisága, Ragadozó: a ragadozó szimulált jelenléte, Tápl.m.: táplálékmenyiség).

Függő változók	Prediktorok	χ^2	df	<i>P</i>
Lárvastádium hossza	Ragadozó	<0.01	1	0.976
	Tápl.m.	323.21	1	<0.001
	Ragadozó × Tápl.m.	25.66	1	<0.001
	NE	0.79	1	0.373
	Gyak.	0.40	1	0.528
	NE × Tápl.m.	1.29	1	0.257
	NE × Ragadozó	<0.01	1	0.974
	Gyak. × Tápl.m.	0.67	1	0.413
	Gyakoriság × Ragadozó	0.26	1	0.611
	NE × Gyak.	0.27	1	0.604
	NE × Gyak. × Ragadozó	1.12	1	0.290
	NE × Gyak. × Tápl.m.	1.25	1	0.264
	Gyak. × Ragadozó × Tápl.m.	0.67	1	0.412
	NE × Ragadozó × Tápl.m.	0.53	1	0.468
	NE × Gyak. × Ragadozó × Tápl.m.	1.68	1	0.194
Átalakuláskor mért testtömeg	Ragadozó	467.79	1	<0.001
	Tápl.m.	155.87	1	<0.001
	Ragadozó × Tápl.m.	5.47	1	0.019
	NE	2.07	1	0.150
	Gyak.	0.18	1	0.669
	NE × Tápl.m.	0.31	1	0.580
	NE × Ragadozó	3.77	1	0.052
	Gyak. × Tápl.m.	0.70	1	0.404
	Gyakoriság × Ragadozó	0.13	1	0.720
	NE × Gyak.	0.52	1	0.470
	NE × Gyak. × Ragadozó	2.05	1	0.152
	NE × Gyak. × Tápl.m.	0.66	1	0.417
	Gyak. × Ragadozó × Tápl.m.	0.23	1	0.632
	NE × Ragadozó × Tápl.m.	0.16	1	0.693
	NE × Gyak. × Ragadozó × Tápl.m.	0.13	1	0.722
Lárvakori túlélés	Ragadozó	14.77	1	<0.001
	Tápl.m.	2.00	1	0.157
	Ragadozó × Tápl.m.	7.90	1	0.005
	NE	1.22	1	0.270
	Gyak.	0.27	1	0.602
	NE × Tápl.m.	0.03	1	0.863
	NE × Ragadozó	0.04	1	0.846
	Gyak. × Tápl.m.	0.24	1	0.624

Gyakoriság × Ragadozó	0.04	1	0.851
NE × Gyak.	<0.01	1	0.956
NE × Gyak. × Ragadozó	0.28	1	0.598
NE × Gyak. × Tápl.m.	1.45	1	0.229
Gyak. × Ragadozó × Tápl.m.	0.73	1	0.392
NE × Ragadozó × Tápl.m.	1.04	1	0.308
NE × Gyak. × Ragadozó × Tápl.m.	0.19	1	0.664

Lárvakori túlélés

A hormon-kezelés és annak gyakorisága nem volt szignifikáns hatással a lárvakori túlélésre, sem önmagában, sem egymással, vagy más prediktorokkal interakcióban, ugyanakkor a táplálék-manipuláció és a ragadozó kezelés interakciója szignifikánsan befolyásolta az ebihalak túlélését (8. táblázat, 13. ábra): az *ad libitum* táplálék mellett nevelt egyedek ragadozószag hiányában nagyobb arányban éltek túl (154 ebihal a 160-ból), mint annak jelenlétében (130 a 160-ból), míg azok az egyedek, melyek táplálékszegény környezetben nevelkedtek, hasonló arányban éltek túl (ragadozószag jelenlétében: 147/159 és ragadozószag hiányában: 149/161 ebihal).



13. ábra: A táplálékellátottság és ragadozó szimulált jelenlétének hatása az ebihalak túlélésére %-ban kifejezve. Az átagértékek (egy kezelési kombinációkra a különböző blokkokban nevelt ebihalak túlélési arányaiból számolva) \pm SE vannak feltüntetve. A szürke oszlopok jelzik a ragadozó szimulált jelenlétét, míg a fehér oszlopok reprezentálják a ragadozószag-mentes kezelési csoportokat.

2.4. Értékelés

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a lárvális egyedfejlődés során, különböző mennyiségű elérhető táplálék mellett hogyan befolyásolja a méregtartalékok kísérletes manipulálása a ragadozók elleni indukált válaszokat. Eredményeink szerint azok az ebihalak, melyek méregtartalékai legalább egy alkalommal leadásra kerültek, hasonló időpontban alakultak át és nem volt kisebb a testtömegük az átalakuláskor, valamint nem mutattak alacsonyabb túlélési arányt, mint méregleadásra nem készített társaik. Mindazonáltal megfigyeltük, hogy a táplálék mennyiség és a predációs veszélyre figyelmeztető szaganyagok jelenléte együttesen befolyásolták az összes általunk mért tulajdonságot. A méregtartalékok leadásának közvetlen, és egyéb faktorokkal (táplálékellátottság, ragadozóveszély) való együttes hatásának hiányából arra következtethetünk, hogy barna varangy ebihalak esetében a méregtartalékok leadása nem gyakorol számottevő hatást a ragadozók elleni válaszok között fennálló energetikai csereviszonyokra.

A norepinefrinnel való kezelés és a kezelések gyakorisága sem befolyásolta számottevően a fitness-jelző bélyegek értékeit sem önmagukban, sem bármely más prediktorral interakcióban. A stimulált méregleadás mérhető mértékű költségének hiányát azzal lehet magyarázni, hogy az alkalmazott hormonkezelés nem váltotta ki a mérgek kellő mértékű ürítését, habár ezt valószínűtlennek tartjuk, mivel mi is (lásd: Első fejezet) és korábbi kísérletekben mások is sikeresen alkalmazták ezt a módszert (Maag *et al.* 2012). Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a méregtartalékok leadásra kerültek a hormonális kezelés hatására, de a rövid távú, méregtartalékok kiürülése utáni újratermelés szintjén méregtermelés nem indukálható. Az efféle konstitutív méregtermelés akkor lenne szelekciósan előnyös, ha a ragadozók folyamatosan jelen lennének az ebihalak környezetében, vagy az egyedek nem csak a ragadozók ellen termelnének mérget, hanem a patogének és a versenytársak ellen is (Bókony *et al.* 2016, de lásd: Bókony *et al.* 2017, Bókony *et al.* 2018, és Hettyey *et al. in prep*). Ez azt is segíthet megmagyarázni, hogy miért nem tudtuk alátámasztani a méregtermeléssel és egyéb ragadozók elleni válaszokkal kapcsolatos eredményeinkkel az optimális allokációs elméletet. Az is elképzelhető, hogy a méregtermelés intenzitása megnőtt a méregtartalékok kényszerített kiürítése hatására, de a bufadienolidok szintézise nem költséges folyamat a barna varangy ebihalak számára, legalábbis nem a testtömegben, túlélésben és fejlődési sebességben mérhető mértékben.

A varangy ebihalak -hasonlóan más fajok ebihalaihoz- életmenet tulajdonságaik változásával reagálhatnak a predációs veszélyre (Lardner 2000, Hagman *et al.* 2009, de lásd:

Benard és Fordyce 2003). Kimutattuk, hogy a lárvális fejlődés hossza nem függött az érzékelt ragadozóveszélytől, ha a táplálék *ad libitum* állt rendelkezésre, ami arra utal, hogy a forrásban gazdag környezetben az ebihalak fent tudják tartani a maximális fejlődési sebességet, még akkor is, ha a táplálkozási aktivitás ragadozó veszély esetén lecsökken (pl. Abrams és Rowe 1996, Laurila *et al.* 1998, de lásd: Steiner 2007, Bennett *et al.* 2013). Másrészt, az éhező ebihalak ragadozószag jelenlétében gyorsabban fejlődtek, mint annak hiányában, tehát indukált ragadozó-ellenes választ mutattak a fejlődési sebességben. Ez utóbbi eredmények alátámasztják az elméleti modellek predikcióit (pl. Wilbur és Collins, 1973, Abrams és Rowe 1996) és hasonló kísérletes tanulmányok eredményeit (pl. Skelly és Werner, 1990, Laurila *et al.* 1998, Chivers *et al.* 1999, Barry 2015): mikor a ragadozók nagy számban vannak jelen a vízi élőhelyen, az ebihalak átalakulásuk siettetésével igyekeznek menekülni a vízi élettérben tapasztalt magas predációs nyomás elől. Azonban ez a plasztikus válasz költségesnek bizonyult, mely csökkent átalakuláskor mért testtömegben mutatkozott meg, mely kapcsolatban áll az állat későbbi rátermettségével (Smith, 1987, Semlitsch *et al.* 1988, Altwegg és Reyer 2003). A táplálékhiányos környezetben nevelt ebihalak esetében elhúzódó lárvális fejlődést figyeltünk meg a ragadozószagtól mentesen nevelt kezelési csoportban, támogatva a hipotézist, miszerint az elérhető táplálék mennyisége közvetlenül befolyásolja a fejlődési sebességet és a fokozott fejlődési sebesség többlet energiát kíván és ezáltal költséges (pl. Skelly és Werner 1990, Steiner 2007).

Hasonlóan más vizsgálatok eredményeihez, az ebihalak átalakuláskor mért testtömege alacsonyabb volt, ha ragadozóveszélyt szimuláló kémiai jelekkel érintkeztek és akkor is, ha táplálékot csak korlátozottan biztosítottunk számukra. (pl. Skelly 1995, Anholt *et al.* 2000, Relyea 2002). A táplálék limitált elérhetősége legtöbb esetben negatívan hat a testtömeg értékekre, míg ragadozóveszély esetén a csökkent testméret a fokozott fejlődési sebességnek vagy a csökkent táplálkozási aktivitásnak tudható be (Skelly és Werner 1990, Lardner 2000, Relyea és Auld 2005). Ugyanakkor, mikor korlátlan mennyiségben állt rendelkezésre a táplálék, a ragadozóveszély ebben az esetben is negatív hatást gyakorolt az ebihalak testtömeg értékeire, viszont a fejlődési sebességre nem volt hatással. Ebből arra következtethetünk, hogy a szimulált ragadozóveszély esetén mutatkozó testtömeg csökkenés inkább magának a csökkent táplálkozási aktivitásnak tudható be, mint a fejlődési ráta-testtömeg gyarapodás csereviszonyának (hasonló eredményekért lásd: Skelly 1995, Anholt *et al.*, 2000). A ragadozó kezelés testtömeg értékekre gyakorolt hatása erősebb volt korlátlan táplálékellátottság mellett, mely egybevág korábbi tanulmányok eredményeivel (Steiner 2007 és hivatkozásai). Néhány tanulmány viszont ellenkező mintázatot figyelt meg; *ad libitum* táplálék mellett az ebihalak

nagyobbra nőttek ragadozóveszélyt szimuláló kémiai jelek jelenlétében (Bennett *et al.* 2013), míg más fajokon végzett vizsgálatok nem találtak összefüggést a táplálékmanipuláció és a ragadozó-kezelés hatása között (Skelly és Werner, 1990; LaFiandra és Babbitt, 2004). A kísérletekben megfigyelhető eltérő mintázat azzal magyarázható, hogy bizonyos fajok esetében a megnőtt testméret adaptív lehet, ha olyan ragadozóval áll szemben az ebihal, mely morfológiai adottságai miatt bizonyos méretnél nagyobb prédát már nem képes zsákmányolni és elfogyasztani (*"gape-limited"*, Kishida és Nishimura 2005, Urban, 2007). Ezzel szemben a barna varangy ebihalak a limitált energiaforrást egyéb védekezési mechanizmusokba fektetik be, mint pl. a fejlődési sebesség.

A ragadozó-ellenes védekezés túlélési esélyben közvetlenül megmutatkozó költségei feltételezhetően ritkák (Werner és Anholt, 1993, Van Buskirk, 2000), habár már kimutatták kétéltúlárvaik esetében (McCollum és Van Buskirk, 1996, Relyea és Hoverman 2003, Hettyey *et al.* 2011). Ennek hátterében részben a ragadozóveszély miatt megváltozott viselkedéssel állhatnak összefüggésben (csökkent mozgás és táplálkozási aktivitás, Lawler 1989, Skelly és Werner, 1990, Marquis *et al.* 2004), mely csökkent táplálékfelvételhez és energia bevitelhez vezet. Következésképpen, a ragadozó-ellenes védekezés túlélésben mutatkozó költségei táplálékszegény környezetben várhatóan magasabbak. Ezzel szemben kísérletünkben azt figyeltük meg, hogy azokban a szimulált ragadozóveszélynek kitett csoportokban alacsonyabb volt a túlélési arány, ahol a táplálék *ad libitum* állt rendelkezésre és nem ahol limitálva volt. Ennek lehetséges magyarázata, hogy a csökkent táplálkozási aktivitás eredményeképpen hátra maradt, el nem fogyasztott táplálék, szubsztrátként szolgálva különböző mikroorganizmusoknak (gombák, baktériumok) bomlásnak indult, és ez növelte meg az ebihalak mortalitását (Russo és Yanong 2006, Roberts és Palmeiro 2008). Ennek ellenére az *ad libitum* táplálék-kezeléssel összefüggő többlet stressz negatív hatása nem volt kimutatható az egyéb mért jellegekben; az így nevelt egyedek átlagban magasabb testtömeeggel rendelkeztek az átalakuláskor, valamint korábban is alakultak át, mint tápláléklimitált körülmények között.

Összegezve eredményeinket, a barna varangy ebihalak bőrmirigyeiben található méregtartalékok leadásának nem találtuk rátermettség-költségeit, viszont megfigyeltük a fitness-jelző bélyegek értékeinek ragadozójelenlét- és forrásfüggő változását. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a barna varangy ebihalak adaptív ragadozó-ellenes plasztikus válasza megmutatkozik a fokozott fejlődési sebességben, viszont ez csak akkor kifejezett, ha a táplálék korlátozottan áll rendelkezésre, továbbá kapcsolatban áll az átalakuláskor mért alacsonyabb testtömegeből adódó fitness költségekkel. Ezt az összefüggést a méregraktárak manipulálása nem befolyásolta, tehát azt feltételezzük, hogy a bufadienolidokkal

való kémiai védekezésnek a testtömegben, fejlődési sebességben és túlélésben mérhető előállítási költsége elenyésző. Tanulmányunk hozzájárul annak megértéséhez, hogy a környezeti tényezők interakciója hogyan alakítja együttesen a ragadozó-indukált védekezést komplex életmenettel rendelkező fajokban.

3. Fejezet: Barna varangy ebihalak kémiai védekezése a természetben: környezeti faktorok szerepe a populációk közötti eltérésekben

3.1. Anyag és módszer

2014 márciusa és májusa között 13 magyarországi és 6 ausztriai tavat monitoroztunk, melyekben a barna varangy szaporodik, valamint ebihal és környezeti mintákat gyűjtöttünk (9. táblázat). Minden tó erdős területen, 200 és 550 m tengerszint feletti magasság között helyezkedett el, vízfelületük 23 és 3253 m², átlagos mélységük 6 és 90 cm között változott.

9. táblázat. Az általunk vizsgált 19 tó biotikus és abiotikus jellemzői

	Ország	vízfelszín mérete (m ²)	átlagos vízmélység (cm)	lomb fedés (%)	vízalatti növény borítás (%)	Hőm. (°C)	DO (mg/l)	konduk- tívitas (μS/cm)	perifiton tömeg (mg/cs.)
Alsóhosszúrét	Magyarország	65,3	34,29	0	40	20,5	9,7	118,0	9,48
Csíkos-tó	Magyarország	3253,0	25,79	40	60	14,6	12,2	114,3	4,49
Felsőhosszúrét	Magyarország	593,5	22,80	0	80	18,7	12,3	123,6	2,75
Frauenwarth	Ausztria	510,2	30,82	10	50	17,1	11,7	2410,0	2,07
Haitzawinkel	Ausztria	369,0	42,30	1	15	18,6	12,1	102,1	1,18
Ilona-tó	Magyarország	1020,5	13,40	0	95	20,2	9,7	137,0	2,33
Irenental	Ausztria	681,6	49,75	7	40	15,4	11,8	110,0	1,04
János-tó	Magyarország	3052,1	23,80	0	5	21,2	9,3	199,3	2,16
Oberkniewald	Ausztria	521,4	60,33	5	45	12,4	12,3	223,7	1,94
Mélymocsár	Magyarország	3253,0	21,75	5	80	20,0	9,8	56,9	0,93
Németszéna	Magyarország	22,0	13,67	0	100	17,8	9,7	162,7	1,10
Papré-t-középső	Magyarország	809,5	15,90	40	20	16,1	12,2	138,0	0,81
Schneiderwiese	Ausztria	1483,7	55,83	28	5	14,7	11,5	333,8	1,35
Sóstói tó	Magyarország	56,5	5,95	0	100	12,4	11,0	149,6	3,50
Sóstói zombékos	Magyarország	769,0	12,75	10	80	16,3	10,6	104,7	5,14
Szárazfarkas	Magyarország	1297,3	21,85	20	30	13,9	12,5	959,8	1,77
Vértes-Észak	Magyarország	907,7	11,88	50	40	14,7	12,9	155,7	2,83
Weidlingbach	Ausztria	681,4	69,82	2	15	12,4	12,9	550,0	3,56
Zánkói rét	Magyarország	791,3	89,43	20	25	15,7	10,7	156,0	2,56

Az adatgyűjtést minden tónál akkor végeztük, mikor a benne élő ebihalak hátsó végtagja már jól látszott, vagyis mikor kb. a 27–35-ös fejlődési stádiumban voltak (Gosner 1960). Azért választottuk ezt a fejlődési stádiumot, mert előzetes vizsgálataink azt mutatták, hogy a bufadienolid koncentráció ekkor a legmagasabb az ebihalakban. A kémiai védekezés vizsgálatához véletlenszerűen választottunk ki 10 ebihalat minden tóból, melyeket egyesével 1 ml 70%-os HPLC tisztaságú metil-alkoholban konzerváltunk a későbbi analízisekhez. Három tó esetében csak 8, 6 ill. 4 ebihalat gyűjtöttünk a tóban fellelhető ebihalak alacsony száma miatt. Annak érdekében, hogy minimalizáljuk az azonos szülőktől származó utódok mintázásának esélyét, minden tavon belül igyekeztünk különböző pontokról gyűjteni a mintákat. Ahol volt rá

lehetőség, ott az ebihalak pontos fejlődési stádiumát tavakból gyűjtött további 10-10 ebihal vizsgálatának segítségével határoztuk meg, mivel a méregelemzéshez gyűjtött ebihalakat befogás után azonnal konzerváltuk, és ezáltal további morfológiai vizsgálatra kevésbé voltak alkalmasak. A mintázott ebihalak pontos kora a következőképpen oszlott meg: 26-os stádium: 14,7 %, 27-es stádium: 57,3 %, 28-as stádium: 25,3 %, és 29-es stádium: 2,7 %. Ezek az apró különbségek nem voltak összefüggésben az elemzésekbe bevitt változók egyikével sem (pl: ország, tó jellemzői, méregtartalom-jellemzők).

A tavakban élő ebihalak és potenciális ragadozóik valamint versenytársaik denzitását kvadrát-módszerrel, valamint kézi hálózással vettük számba (Relyea 2002, Van Buskirk és Arioli 2005). A kvadrátózáshoz egy 70-cm átmérőjű és 100 cm hosszú alumínium hengert használtunk, amit függőlegesen hirtelen belenyomtunk a tó véletlenszerűen kiválasztott pontjain az aljzatba, majd a hengereken belül hálózással az összes állatot kifogtuk és feljegyeztük. Akkor tekintettük a hengert üresnek, ha 5 egymást követő hálómerítés nem hozott már pozitív eredményt. A hengeres mintavételezést kézi hálóval való mintázással is kiegészítettük, amely során egy gyors mozdulattal egy méter hosszú szakaszon húztuk végig hálót a tó fenekén, majd a hálóval fogott állatokat számba vettük. A kvadrát-jellegű mintavétel és a kézi hálózás esetében a mintavételi terület körülbelül megegyezett ($\sim 0.4 \text{ m}^2$), és a két mintázási típusból minden tó esetében megegyező, vagy közel megegyező számú mintát gyűjtöttünk. A mintázási helyek eloszlását a tóban levő mikrohabitat-típusok eloszlásához igazítottuk, a tavankénti minták száma (8–19 tavanként) arányosan növekedett a tavak méretével és a mikrohabitat-diverzitással.

A tóban levő táplálék elérhetőséget egyrészt a perifiton mintázásával becsültük, mely fő tápláléka az ebihalaknak (Wells 2007). Ehhez március 19 és 27. között a tó méretétől függően 15-25 darab 10 cm^2 -es mázas kerámia csempét helyeztünk a tavakba 10 cm-el a vízfelszín alá. Megközelítőleg másfél hónappal később, amikor az ebihalakat is mintavételeztük, összegyűjtöttük a csempéket, majd egy borotvával lekapartuk és desztillált vízzel leöblítettük róluk a perifitont. Az így kapott perifiton szuszpenziókat az elemzésekig (lásd alább) -20°C -on tároltuk. A tavak fizikai és kémiai tulajdonságainak jellemzésére (amelyek a kiszáradás esélyével függenek össze) az állatok mintavételezésével párhuzamosan különböző egyéb méréseket végeztük. Megbecsültük: 1) a vízfelszín méretét: $A \times B \times \pi$, ahol A a fél-nagy tengely és B a fél-kis tengely hossza az elliptikus formában 2) a víz átlagos mélységét, véletlenszerűen kiválasztott, tó méretétől függően 5-14 mérésrel 3) a lombkorona zártságát, %-ban kifejezve, mely a tófelszín fákkal borított arányát adta meg 4) vízalatti növényzet borítottságát %-ban megadva, mely a tófelszín látható vízi növényzet borítottságát jelentette 5) a víz hőmérsékletét,

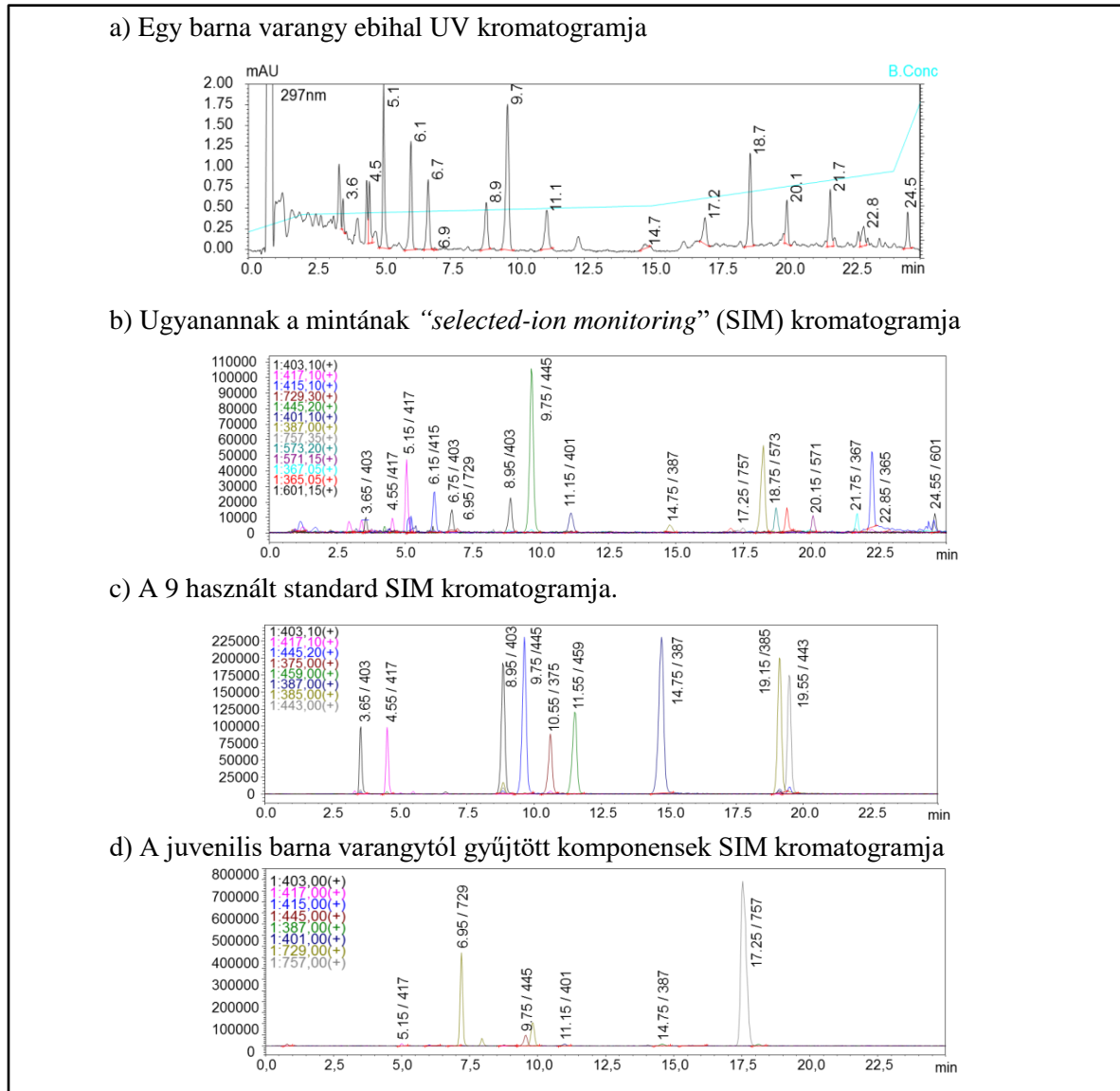
oldott oxigén tartalmát és konduktivitását tavankénti 3-5 random mintavételből (tóméret függvénye), hordozható elektrokémiai mérővel mérve (Consort C 6020 T; Consort Ltd., Turnhout, Belgium). A lombkorona zártságát és a vízalatti növényzet borítását szemmértékkel becsülte minden tónál ugyanaz a 3 megfigyelő, majd a 3 becslés mediánját használtuk (hasonló eljárást alkalmazott pl. Van Buskirk és Arioli 2005).

A bufadienolidok mérése

A minták feldolgozása a Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Intézetében történt (Kóréletani Osztály, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15). Az ebihalakat homogenizáltuk (VWR VDI 12 homogenizátor és IKA S12N-7S diszpergáló eszköz), majd forgópárológatóval (Büchi Rotavapor R-134, Flawil, Switzerland) 50 °C hőmérsékleten és folyamatosan növelt vákuum mellett kiszárítottuk. Az ebihalak szárazanyag-tömegét Ohaus Pioneer PA-114 analitikai mérlegen, 0.0001 g-os pontossággal lemértük. Ezt követően a mintáinkat 1 ml HPLC tisztaságú metil-alkoholba felvettük és a beoldódást elősegítendő rövid ultrahang-kezelésnek vetettük alá. Ezt követően HPLC-eluens-tartó üvegcsékbe szűrtük át a mintákat FilterBio műanyag fecskendővel és szűrővel (pórusméret = 0.22 µm). Az ebihalakban található méregkomponensek elkülönítésére és relatív tömegmennyiségének meghatározására nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás elválasztási módszert és hozzá kapcsolt tandem tömegspektrométert használtunk (HPLC-MS, Shimadzu LC-MS-2020): a HPLC-MS készülék bináris gradiens oldószer szivattyúval, vákuumos eluens gáztalanító egységgel, automatizált mintavevővel, oszloptermosztáttal, diódasoros detektorral (DAD) és elektropray ionizációs tömegspektrométerrel (ESI-MS) volt felszerelve.

A kromatográfiás elválasztás 35°C-on, C18 2.6 µm átmérőjű oszlopon (Kinetex, 100 mm × 3 mm), valamint vele sorba kötött C₁₈ védőkolonnákban (4 mm × 3 mm) történt, 10 µL minta injektálással. A mozgó fázis 0.05%-os hangyasav HPLC-tisztaságú vizes oldata volt (A oldószer), valamint 0.05%-os hangyasav acetónitriles oldata (B oldószer). Az áramlási sebesség 0.8 ml/perc volt, a gradiens a következő volt: 0-2 perc, 15-25 % B; 2-15 perc, 25-35 % B; 15-24 perc, 30-50 % B; 24-25 perc, 50-100 % B; 25-30 perc, 100 % B; 30-35 perc, 15 % B. Az ESI az alábbi körülmények között működött: 250 °C “desolvation line”, hőmérséklet; 400 °C fűtő-blokk hőmérséklet; szárító N₂ gáz 15 l/perc; porlasztó N₂ gáz 1,5 l/perc; pozitív ionizációs mód. Az adatokat a LabSolutions 5.42v (Shimadzu) programmal nyertük és elemeztük ki. A mérésekhez standardnak bufalint, bufotalint, resibufogenint, gamabufotalint, arenobufagint, telocinobufagint (Biopurify Phytochemicals, Chengdu, China), cinobufagint (Chembest,

Shanghai, China), cinobufotalint (Quality Phytochemicals, NJ, USA), és digitoxigenint (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) használtunk fel. A bufadienolidokat a kromatogramok által felvett UV spektrumuk alapján választottuk el.



14. ábra. A bufadienolid komponensek HPLC-DAD-ESI-MS analízise; az egyes csúcsoknál elkülönített bufadienolid komponensek retenciós idejét és m/z-értékét feltüntettem.

Az ebihalakban található mérgek azonosításához a bufadienolid standardek, valamint két mérgekverékben kimutatott ismeretlen komponensek retenciós idejét és m/z-értékét használtuk viszonyítási alapként. Az egyik komponens keveréket az összes tó (19 db) ebihalmintáinak összekeverésével (50 μ l minden mintából); a másikat pedig a Silbersee-ből gyűjtött (Bécs, Ausztria, 48°12'33"N, 16°15'48"E) 49 fiatal barna varangy egyed parotoid mirigyének óvatos masszírozásával, majd az ily módon kinyert mérgek összekeverésével készítettük. Azért

használtuk a komponens-keverékeket, mert ezek sokkal magasabb mennyiségben tartalmazták a mérgeanyagokat, ezáltal nagyobb intenzitású abszorpciót és pontosabb tömeg spektrometriát tettek lehetővé, mint az egyedi ebihal minták. A minták kvantitatív kiértékelése a tömegspektrometriás adatokon alapult. A bufadienolid komponensek koncentrációjának meghatározására a bufotalin standard kalibrációs görbét használtuk, vagyis mintánként bufotalin-ekvivalens értékeket számoltunk minden egyes komponensre. Ahhoz, hogy megkapjuk az egyedi tömegekre számolt mérgek koncentrációt, ezeket az értékeket elosztottuk az ebihalak szárazanyag tömegével (ng/mg; hasonló módszer: Fordyce 2003, Hagman *et al.* 2009), ebből számolva a teljes bufadienolid mennyiséget.

Perifiton biomassza számolása

A begyűjtött perifiton szuszpenziókat 20 órán keresztül 105 °C-on szárítottuk, majd a teljesen kiszáradt mintákat 3 ml desztillált vízben vettük fel, ultrahangos rázóval segítve a visszaoldódást. A mintákat ezután ismét leszárítottuk, majd kihülés után lemértük a tömegüket. Végül a mintákat 550 °C-on 2 órán keresztül hamusítási eljárással elégettük, majd hűlés után ismét lemértük a tömegüket. A hamumentes száraztömeget úgy adtuk meg, hogy kivontuk a hamusítás utáni tömeget az eredeti szárazanyag tömegből; ez reprezentálja a csempén lerakódott összes szervesanyag mennyiségét, beleértve az algákat, baktériumokat, gombákat, és a holt szervesanyagot. Minden tóra, a belehelyezett csempékről gyűjtött minták alapján kiszámoltuk a perifiton-biomasszát, átlagos hamumentes szárazanyag tömegben (mg/csempe) kifejezve (lásd: 9. táblázat).

3.2. Statisztikai elemzések

Minden statisztikai analízist R-környezetben végeztünk (R 3.1.0, R Core Team 2014), az „nlme”, „AICcmodavg”, és „vegan” csomagok használatával. Az összes tóban kiszámoltuk a mintázott taxonok átlagos denzitását, amit a kézi-hálózással és a kvadrát módszerrel gyűjtött állatok átlagos egyedszámának a mintázott víztérfogattal való elosztásával becsültünk (pl.: 0.38 m² vízfenék terület megszorozva az átlagos vízmélységgel). Minden tóban számszerűsítettük a ragadozóveszély és a kompetíció mértékét, a ragadozók és versenytársak súlyozott denzitásának számolásával. A ragadozók esetében korábbi vizsgálatokból származó relatív veszélyességekre vonatkozó becsléseket használtunk (lásd: Crossland és Alford 1998, Henrikson 1990, Hettyey *et al.* 2011, Van Buskirk és Arioli 2005, Van Buskirk és Schmidt 2000), melyet a következőképpen súlyoztuk: karcsú acsafélék lárváinak denzitása (*Aeshna spp.*

és *Anax spp.*), szegélyes csíkbogár (*Dytiscus marginalis*) imágó és lárva denzitás, valamint egyéb kisebb méretű csíkbogár fajok (*Acilius spp.*) imágóinak denzitása 3-al volt súlyozva; a vízipoloskákhoz tartozó (*Nepomorpha*) hanyattúszó poloska (*Notonecta spp.*) imágók, kifejlett pettyes götte (*Lissotriton vulgaris*), és alpesi götte (*Ichthyosaura alpestris*) denzitás 2-vel volt súlyozva; míg a laposhasú acsa (*Libellulidae*) lárvák, piócák (*Hirudinea*), és a kis testű (<15 mm) vízipókok (*Dolomedes spp.*) denzitása 1-el volt súlyozva. A versenytársak denzitása a barna varangy, erdei béka (*Rana dalmatina*) és a gyepi béka (*Rana temporaria*) lárvák esetében 3-al volt súlyozva, mivel az általunk vizsgált barna varangy ebihalakhoz hasonló testmérettel rendelkeztek és hasonló fejlődési stádiumban voltak; azonban a zöld levelibéka (*Hyla arborea*) ebihalak denzitását 2-vel súlyoztuk, mivel ezek a faj szaporodási sajátosságai miatt a mérés idején még sokkal kisebbek és fiatalabbak voltak; végül az olyan gerinctelen taxonok denzitása, melyek étrendjének elemét képezi a perifiton biomassza: tegzes lárvák (*Trichoptera*), kérészek (*Ephemeroptera*), víziáskák (*Asellus spp.*), bolharákok (*Gammaridae*), 1-el voltak súlyozva. Tehát a ragadozóveszélyt minden tó esetében a következőképpen számoltuk: $3 \times$ (karcsú acsák + sz. csíkbogár + többi csíkbogár) + $2 \times$ (hanyattúszó p. + pettyes götte + alpesi götte) + $1 \times$ (laposhasú acsák + piócák + vízipókok), kompetíció mértékét pedig: $3 \times$ (*Bufo* + *Rana*) + $2 \times$ *Hyla* + $1 \times$ (tegzesek + kérészek + víziáskák + bolharákok), ahol minden egyes taxonnak az 1 m³ vízre eső átlagos egyedsűrűségét vettük alapul. Főkomponens analízissel (PCA) vizsgáltuk a tavak általunk mért hét fizikai és kémiai jellemzőjében való változatosságot. Az első főkomponens a variancia 39% -át magyarázta, és pozitívan korrelált a vízfelszín méretével, a vízmélységgel, a lombkorona fedettséggel, az oxigéntartalommal és a konduktivitással, valamint negatívan a vízhőmérséklettel és a vízalatti növényzet borításával (10. táblázat). Így a kiszáradásra kevésbé hajlamos tavakhoz (azaz a nagyobb, mélyebb, hűvösebb tavak, amelyek nagyobb lomb fedettséggel rendelkeztek) nagyobb értékek tartoztak

10. táblázat. A PC1- hez tartozó loading értékek (Eigenvalue: 1.65), és korrelációs koefficiensek.

Tó jellemzők	Loading	r
Oldott oxigén tartalom	0,48	0,79
Vízalatti növényzet borítása	-0,43	-0,71
Hőmérséklet	-0,40	-0,66
Lomb-fedettség	0,37	0,61
Vízmélység	0,33	0,54
Konduktivitás (log-transzformált)	0,31	0,51
Vízfelszín mérete (log-transzformált)	0,30	0,49

A továbbiakban a PC1-score-okat használtuk az elemzésekben.

A kémiai védekezés mennyiségi és minőségi viszonyait két változóval írtuk le: 1) a bufadienolid komponensek ebihalankénti átlagos számával, valamint 2) a teljes bufadienolid-mennyiséggel. Lineáris kevert modellekkel (LME) teszteltük a ragadozóveszély, a vetélytársak denzitásának, a perifiton-biomasszájának és a víztest állandóságának hatását az ebihalak kémiai védekezésére. Modelldiagnosztikával ellenőriztük (residuális plotok) a feltételeknek való megfelelést. A teljes bufadienolid-mennyiség, a ragadozóveszély és a perifiton biomasza adatokat \log_{10} -transzformáltuk, hogy javítsuk a modell-illeszkedést. Minden függő változó elemzését két lépésben végeztük el. Először megvizsgáltuk az adatok random-hatás struktúráját, teljes modell segítségével; vagyis mind a 4 magyarázó változót fix hatásokként vittük be, és összehasonlítottuk a különféle random hatásokat tartalmazó modellek illeszkedését. Négy random struktúra azt feltételezte, hogy a kémiai védekezés a tavak közötti távolsággal különbözött, egy bizonyos funkciót követve. Három random struktúra feltételezte, hogy a kémiai védekezés a tavak között, vagy az országok között, vagy mindkettő között különbözött, de ezek a különbségek nem a térbeli távolságok következtében voltak megfigyelhetők. A null modell nem feltételezett random hatásokat. Ezt a 8 modellt hasonlítottuk össze Akaike-féle információs kritérium (AIC) segítségével, és minden egyes függő változó esetében a legalacsonyabb AIC értékű modellt választottuk. A második lépésben, az első lépésben kiválasztott random-hatás struktúrát alkalmaztuk, valamint számszerűsítettük a fix hatások relatív fontosságát AICc-n (mintaszámra korrigált AIC) alapuló információelméleti modell-összehasonlítással. Olyan lehetséges modelleket állítottunk össze, amelyek a négy ökológiai prediktor különböző kombinációit tartalmazták, és a modelleket AICc értékük szerint rangsoroltuk. Mivel egyik modell sem volt egyértelműen jobb a többi modellnél, ezért modell-átlagolást alkalmaztunk, melynek során a modellekből kiszámítottuk az egyes paraméterek átlagát, mely során az adott modellt Akaike súllyal (ω) súlyoztuk. 95 %-os konfidenciaintervallummal végeztük a tesztekét. A hatásnagyságok standardizált becslésénél (amely összehasonlítható a modellben lévő prediktorok között) minden egyes prediktor esetében a modellek Akaike súlyait ($\Sigma\omega$) összegeztük, ami relatív fontosságukat fejezte ki.

Egy alternatív megközelítést is alkalmaztunk az adatok kiértékelésére: minden tó esetében kiszámoltuk, hogy az ebihalak hány százaléka tartalmazta az összes ott talált bufadienolid komponenst, és ezen adatok alapján kiszámoltuk az egyes tavak közötti különbségeket Canberra-távolságban kifejezve, mely kevésbé torzítja az eredményeket a nagyobb mennyiségben előforduló vegyületek irányába, mint a többi eltérési mutató (Krebs 1999). Létrehoztunk egy az egyes ragadozók nem súlyozott denzitásán alapuló különbözőségi mátrixot (8 taxon, a két göte fajt egyként számoltuk, mert az alpesi göte nem volt jelen a magyar

tavakban), és a versenytársak esetében is egy ugyanilyet (6 taxon, a két *Rana* faj össze lett vonva, a *H. arborea* pedig kizárva, mert csak egy tóban találtuk meg). Ezután Mantel-teszteket használtunk, hogy becsülhessük a mátrixok közötti korrelációt, amely leírja a bufadienolidok gyakoriságán, valamint a ragadozók vagy a versenytársak közösségének összetételén alapuló hasonlóságot.

3.3. Eredmények

Összesen 16 féle bufadienolid komponenszt találtunk a barna varangy ebihalakban (11. táblázat). Az ebihalankénti komponensek száma erős térbeli struktúráltságot mutatott, mely leginkább a Magyarországi (átlag \pm SE: 13.10 ± 0.45) és az Ausztriai (10.62 ± 0.66) tavak között mutatkozott, a két régió belüli tavak közötti változatosság ugyanakkor a térbeli távolságtól független volt (11. táblázat). A 16 komponens közül 7 kevésbé volt gyakori (az ebihalak kisebb %-ában volt megtalálható) Ausztriában, mint Magyarországon, és egy teljesen hiányzott az ausztriai mintákból (11. táblázat).

11. táblázat. A barna varangy ebihalakban talált bufadienolid komponensek, és az ezeket tartalmazó ebihalak aránya százalékban kifejezve. A táblázatban az az 1 komponens nem szerepel, melyet csak Magyarországon találtunk meg

Komponens	m/z	Retenció idő (perc)	% előfordulás	
			Ausztria	Magyarország
Gamabufotalin	403	3,6	81	90
Telocinobufagin	403	8,9	100	99
Bufotalin	445	9,7	100	100
Bufalin*	387	14,7	36	74
Ismeretlen komponens 1	417	4,5	90	92
Ismeretlen komponens 2	417	5,1	100	100
Ismeretlen komponens 3	415	6,1	100	98
Ismeretlen komponens 4	403	6,7	93	97
Ismeretlen komponens 5*	729	6,9	2	54
Ismeretlen komponens 6	401	11,1	91	97
Ismeretlen komponens 7*	757	17,2	0	34
Ismeretlen komponens 8	573	18,7	100	97
Ismeretlen komponens 9*	571	20,1	74	89
Ismeretlen komponens 10*	367	21,7	57	93
Ismeretlen komponens 11*	365	22,8	2	21
Ismeretlen komponens 12*	601	24,5	36	76

A csillaggal jelölt bufadienolid komponensek szignifikánsan ritkábban voltak jelen az ausztriai mintákban, mint a magyarokban (χ^2 tesztek eredményei alapján)

Az ebihalankénti teljes bufadienolid mennyiség szintén erős térbeli struktúráltságot mutatott, mely a tavak közötti random változatossággal volt legjobban leírható, tekintet nélkül a térbeli távolságra (12. táblázat). Habár a modellek viszonylag jól magyarázták a tavak közti térbeli különbségeket (12. táblázat), az ebihalak teljes bufadienolid tartalmában Magyarország (31.68 ± 1.16 ng/ mg) és Ausztria (34.96 ± 1.25 ng/mg) között nem volt szignifikáns különbség (12. táblázat).

12. táblázat. A különböző random-hatás struktúrájú lineáris kevert modellek AIC-értékei

Random hatások	Komponensek száma	Teljes bufadienolid mennyiség
Nincs	799,2 ^a	87,0 ^a
Ország	757,2 ^b	89,0 ^a
Tó	709,8 ^c	46,3^b
Tó az Országba ágyazva	707,2^d	48,3 ^b
Gauss-i térbeli korreláció	759,4 ^b	47,4 ^b
Exponenciális térbeli korreláció	711,4 ^c	47,8 ^b
Szférikus térbeli korreláció	711,0 ^c	47,5 ^b
<i>Rational quadratic</i> térbeli korreláció	759,4 ^b	47,8 ^b

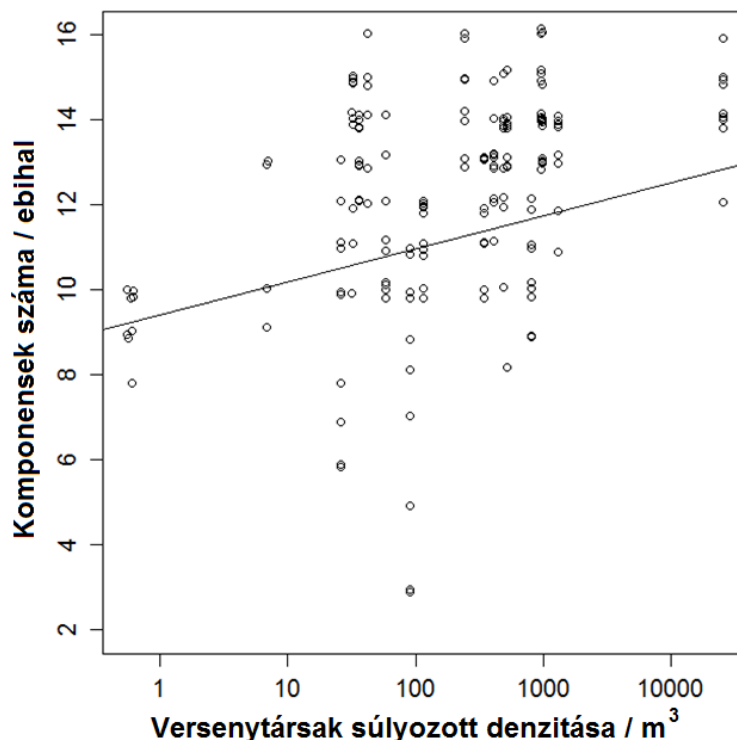
Minden modell tartalmazta a ragadozóveszélyt, a versenytársak denzitását, a perifiton biomasszát, valamint a tó-állandóságot, mint fix hatást. A kisbetűk a *likelihood-ratio* tesztek által eredményezett homogén alcsoportokat jelölik: azoknál a modelleknél, melyek különböző betűvel vannak jelölve, a modellilleszkedés különbözött. A legjobban illeszkedő modellek félkövér betűtípussal vannak jelölve

Az ebihalakban található bufadienolid komponensek számának eltérésében az AICc-n alapuló modell-összehasonlítások alapján a versenytársak denzitása fontos magyarázó változónak bizonyult (13. és 14. táblázat). A legjobban illeszkedő modell csak a versenytársak denzitását tartalmazta, mint egyedüli prediktort, ugyanakkor ez a prediktor minden $\Delta AICc < 2$ modellben szerepelt, ezek pedig mind jobban illeszkedtek, mint a null model (13. táblázat). A versenytársak denzitásának relatív fontossága 2-3-szor nagyobb volt, mint a másik 3 prediktor fontossága (14. táblázat). A bufadienolid komponensek száma a kompetíció erősödésével párhuzamosan nőtt (15. ábra), míg az egy ebihalban található teljes bufadienolid mennyiség tavak közötti változatossága egyik prediktorral sem volt egyértelműen magyarázható (13. és 14. táblázat), bár a versenytársak denzitása, a tó-állandóság és a ragadozóveszély mind relatív fontosabbnak bizonyult (kb. kétszeresen), mint a perifiton biomassa (14. táblázat).

13. táblázat. Lineáris kevert modellek AIC_c -érték alapján sorrendbe állítva, a becsült paraméterek száma (K), az adott modell AIC_c -értékének a legalacsonyabb AIC_c értéktől való eltérése (ΔAIC_c), és az Akaike-súly (ω) minden modellenél feltüntetve, ahol a prediktorok a következő képpen vannak kódolva: ragadozóveszély (RAG), versenytársak denzitása (KOMP), perifiton biomassa (TÁPL), tó-állandóság (TÓÁLL)

Prediktorok	K	AIC_c	ΔAIC_c	ω
a) A bufadienolid komponensek száma				
KOMP	5	708,73	0,00	0,22
TÓÁLL + KOMP	6	709,04	0,31	0,19
TÁPL + KOMP	6	710,44	1,70	0,09
TÓÁLL + TÁPL + COMP	7	710,46	1,73	0,09
KOMP + RAG	6	710,53	1,80	0,09
NULL	4	711,12	2,39	0,07
TÓÁLL + KOMP + RAG	7	711,20	2,47	0,06
TÁPL + KOMP + RAG	7	712,31	3,57	0,04
TÓÁLL	5	712,44	3,71	0,03
TÓÁLL + TÁPL + KOMP + RAG	8	712,65	3,92	0,03
TÁPL	5	713,15	4,42	0,02
RAG	5	713,21	4,48	0,02
TÓÁLL + RAG	6	714,22	5,48	0,01
TÓÁLL + TÁPL	6	714,44	5,71	0,01
TÁPL + RAG	6	715,26	6,53	0,01
TÓÁLL + TÁPL + RAG	7	716,14	7,40	0,01
b) Teljes bufadienolid mennyiség				
TÓÁLL + KOMP	5	26,29	0,00	0,19
TÓÁLL	4	26,78	0,49	0,15
TÓÁLL + KOMP + RAG	6	27,18	0,89	0,12
KOMP + RAG	5	27,79	1,50	0,09
TÓÁLL + TÁPL + KOMP	6	28,43	2,14	0,06
RAG	4	28,58	2,29	0,06
NULL	3	28,65	2,36	0,06
TÓÁLL + RAG	5	28,67	2,38	0,06
TÓÁLL + TÁPL	5	28,81	2,52	0,05
TÓÁLL + TÁPL + KOMP + RAG	7	29,32	3,03	0,04
TÁPL + KOMP + RAG	6	29,88	3,59	0,03
KOMP	4	30,04	3,75	0,03
TÁPL + RAG	5	30,50	4,21	0,02
TÓÁLL + TÁPL + RAG	6	30,63	4,34	0,02
TÁPL	4	30,75	4,45	0,02
TÁPL + KOMP	5	32,13	5,84	0,01

A modellek mindkét függő változó esetében tartalmazták a 12. táblázatban félkövér betűtípussal feltüntetett random hatásokat.



15. ábra. Az ebihalankénti bufadienolid komponensek számának és a versenytársak súlyozott denzitásának kapcsolata. Az átfedő adatpontok egymáshoz képest minimálisan elcsúsztatva szerepelnek; a regressziós egyenes abban az LME modellben lett illesztve, ahol a tó az országba ágyazva szerepelt, mint random hatás.

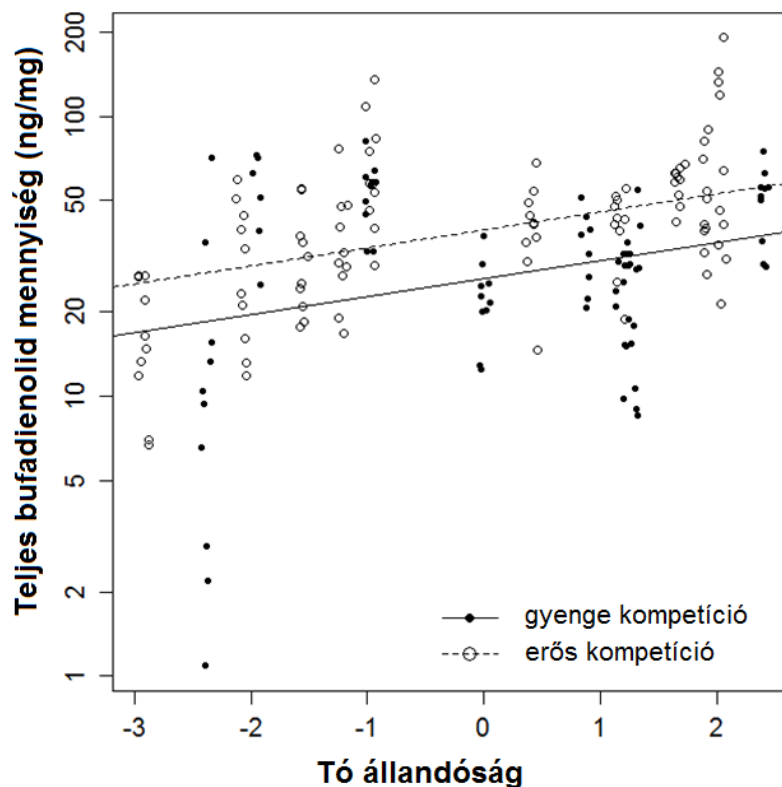
14. táblázat. Az ökológiai faktorok relatív fontossága ($\Sigma\omega$), és a modellátlagolt paraméterbecslések (b_{av}), 95 %-os konfidencia intervallummal (95 % CI).

Modell	$\Sigma\omega$	b_{av}	95 % CI
a) Bufadienolid komponensek száma			
Ragadozóveszély*	0,27	-0,14	-1,66, 1,38
Versenytársak denzitása*	0,81	0,86	0,16, 1,56
Perifiton biomassza*	0,30	-0,87	-3,37, 1,63
Tó-állandóság	0,43	0,32	-0,12, 0,76
b) Teljes bufadienolid mennyiség			
Ragadozóveszély*	0,44	-0,13	-0,34, 0,08
		(0,74)	(0,46, 1,20)
Versenytársak denzitása*	0,57	0,08	-0,02, 0,18
		(1,20)	(0,95, 1,51)
Perifiton biomassza*	0,25	0,03	-0,31, 0,37
		(1,07)	(0,49, 2,34)
Tó-állandóság	0,69	0,06	0, 0,12
		(1,15)	(1,00, 1,32)

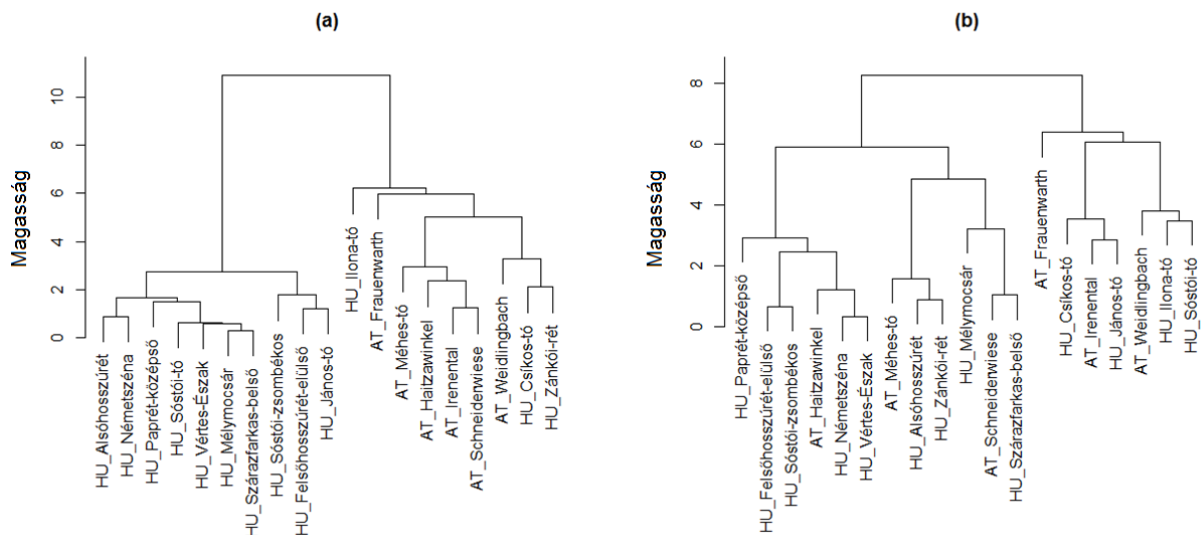
A csillaggal jelzett változók értékei \log_{10} -transzformálva lettek az elemzések előtt; a paraméterbecslések a transzformált értékekre vonatkoznak. A teljes bufadienolid mennyiségnél a zárójelben levő értékeket vissza-transzformáltuk, mutatva az eredeti értékekhez képest arányos különbségeket (ng/mg).

Mindazonáltal, a legjobban illeszkedő modell tartalmazta mind a tó-állandóságot, mind a versenytársak denzitását, és ez a két prediktor 4-ből 3 modellben szerepelt, mely között a $\Delta AICc < 2$ volt, és melyek mindegyike jobban illeszkedett, mint a nullmodell (13. táblázat). Továbbá, az ebihalak nagyobb mennyiségű mérget tartalmaztak olyan tavakban, ahol erősebb volt a kompetíciós nyomás és ahol a tó vízállása állandóbb (16. ábra). Ezzel szemben a ragadozóveszély és a perifiton biomassa hatása bizonytalan volt (14. táblázat).

A 19 tó méregösszetételén alapuló csoportosításánál (az ebihalak azon %-a, mely minden bufadienolidot tartalmazott) a csoportok a versenytárs-közösség összetételével voltak összefüggésben (Mantel teszt: $r=0.39$, $P=0.015$; 17. ábra), míg a ragadozó-közösség összetételével nem találtunk összefüggést ($r=0.04$, $P=0.368$).



16. ábra. Az ebihalankénti teljes bufadienolid mennyiség és a tó-állandóság kapcsolata (PC1 score-ok, ahol a magasabb értékek a kiszáradás kisebb valószínűségét jelzik). Illusztrációs célból a tavakat két csoportra osztottuk a bennük levő kompetíciós nyomás erősségének (versenytársak súlyozott denzitásának) megfelelően. A regressziós egyeneseket LME modellek alapján illesztettük, ahol a tó mint random hatás szerepelt. Az átfedő adatpontokat hozzájuk zajt adva tettük láthatóvá.



17. ábra. A tavak hasonlóság szerinti csoportosítása (a) a méregösszetétel és (b) a kompetitor-közösség szempontjából. A tavak nevei előtt szerepel az adott ország kétbetűs kódja (AT: Ausztria, HU: Magyarország). A magasságok a csoportok közötti Canberra-távolságokat jelzik.

3.4. Értékelés

A vizsgált természetes tavakban élő barna varangy ebihalak kémiai védekezésében nagymértékű változatosságot észleltünk. A különböző méregkomponensek száma az ebihalakban 3 és 16 között mozgott, és a teljes bufadienolid mennyisége 1-től egészen 200 ng / mg-os tartományig terjedt. Ez a hasonló fejlettségi állapotban levő ebihalak közti változatosság jelentős térbeli struktúráltságot mutatott; ugyanabból a tóból származó ebihalak hasonlóbbak voltak egymáshoz, mint más tavak ebihalaihoz, és a magyarországi ebihalak többféle méregkomponenst tartalmaztak, mint az osztrák tavak egyedei. Legjobb tudomásunk szerint, ez az első olyan tanulmány, melyben olyan kételtűek kémiai védekezésében mutattak ki földrajzi változatosságot, melyek *de novo* termelik mérgeiket (Daly 1995, Üveges *et al.*, 2017), habár számos olyan tanulmány létezik, amely hasonló populációk közötti különbségeket talált olyan fajoknál, melyek a táplálékukból nyerik a mérgeiket (Daly 1995), vagy amelyek mérgezsintetizáló képessége nem egyértelmű (Hanifin *et al.* 2003). A tavakon belüli hasonlóságok és a tavak közötti eltérések egy része tükrözhet családok közötti különbségeket, mivel lehetséges, hogy ugyanabból a tóból testvéreket gyűjtöttünk. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy a bufadienolid-változatosság jelentős része a tavak ökológiai jellemzői közötti különbségeknek tulajdonítható, ami arra utal, hogy a varangyok toxicitása nem véletlenszerűen variál tavak között. Habár a véletlenszerű neutrális folyamatok, mint például a genetikai

sodródás, hozzájárulhattak a megfigyelt mintázathoz, korrelatív eredményeink arra utalnak, hogy az legalábbis részben helyi adaptációból és/vagy fenotípusos plaszticitásból eredeztethető, hisz a ragadozók elleni védekezésben megmutatkozó plaszticitás mértékében kialakulhat lokális alkalmazkodás (Kishida *et al.* 2007; Van Buskirk 2014; Hettyey *et al.* 2016).

Az ebihalak toxicitásának változatosságát a versengés erőssége magyarázta a legjobban, hiszen növelte mind a bufadienolid vegyületek számát, mind (bár kisebb mértékben) teljes mennyiségét az ebihalakban. Ezeket az eredményeket a klaszter-analízis eredményei is megerősítették, ami azt mutatta, hogy azok a tavak, melyek ebihalai hasonló toxinösszetételt tartalmaztak, hasonlóbb versenytárs közösséggel is rendelkeztek. Eredményeink alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a barna varangy ebihalak méregtermelésüket a versenytársak jelenlétéhez igazítják (Hettyey *et al.* 2014; Bókony *et al.* 2018) nagyobb mennyiségű mérget termelve erősebb kompetíciós nyomás esetén, vagy a mérgek komponensek nagyobb változatosságával, amikor a versenytársak közössége is változatosabb. A *Bufo* és a *Rana* ebihalak messze a leggyakoribb kompetítorok voltak az általunk mintázott tavakban (2,3-101300 ebihal / m³, medián: 1367, míg 0-1321 gerinctelen kompetítor / m³, medián: 0,7), ami arra utal, hogy a versenytársak befolyása a méregtermelésre nagyrészt az ebihalak sűrűségével áll összefüggésben.

A kétéltűlárva közötti kémiai interferencia meglétét már régóta feltételezik, de annak mechanizmusa (pl. metabolikus melléktermékek, specifikus növekedésgátlók, vagy fakultatív parazita algák mint közvetítők) még mindig vita tárgyát képezi (Griffiths *et al.* 1993, Licht 1967, Wells 2007). A toxinokat, mint a versengés kimenetelét potenciálisan befolyásoló tényezőket ritkán vették figyelembe (lásd Crossland 1998, Crossland és Shine 2012); de mára már kísérletes bizonyíték is van arra, hogy a megnövekedett méregtermelés valóban a versenytársak jelenlétére adott plasztikus válasz része lehet, bár ezek a válaszok nem mutattak mérhető allelopatikus hatást a versenytársakra (Bókony *et al.* 2018).

A mérgek változatossága és a versenytársak denzitása közötti pozitív korreláció alternatív magyarázata lehet az, hogy a toxikusabb ebihalaknak nagyobb túlélési esélyei vannak (a hatékonyabb ragadozó-ellenes védelem miatt), ami növeli a versenytársak sűrűségét azokban a tavakban, ahol a varangyok a véletlenszerű változatosság vagy lokális adaptáció miatt mérgezőbbek a ragadozók számára. Ebben az esetben a kompetíció hatása kizárólag a varangy ebihalak denzitásának lenne tulajdonítható. Ezt azonban eredményeink nem támasztották alá: összehasonlítva a versenytársak denzitásának hatását (a bufadienolid komponensek számára), a *Bufo* ebihalak sűrűségének hatása a teljes hatásnak kevesebb, mint a felét tette ki. Ezért valószínűtlen, hogy a nagyobb varangy-egyedsűrűség következménye lett volna a magasabb

toxicitás.

A másik ökológiai prediktor, amely fontosnak bizonyult, a tavak állandósága volt: az ebihalak általában nagyobb mennyiségben tartalmaztak bufadienolidokat azokban a tavakban, amelyek kisebb valószínűséggel száradnak ki. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a méregtermelésnek olyan költségei vannak, amelyeket csak az állandóbb körülmények között nevelkedett ebihalak engedhetnek meg maguknak. Kimutatták, hogy a kiszáradás kockázata (mint például a vízszint csökkenése) felgyorsítja a lárvák fejlődését számos kétéltű fajban, ami viszont a csökkent testméret árán következhet be (Richter-Boix *et al.* 2011). Ez valóságos kockázatot jelentett a vizsgálatunkban résztvevő bizonyos ebihalak számára, mivel a megfigyelt tavak egyike a tavasz folyamán teljesen kiszáradt, néhány további pedig a vizsgálat ideje alatt a kora tavaszi méretük egy-két százalékára csökkent. Az ilyen víztestekben fejlődő ebihalaknak a lehető legrövidebb idő alatt kell eljutniuk az átalakulásig, így ezek kevésbé fektethetnek költséges folyamatokba, mint például a toxinvegyületek szintézisébe. Ezt a hipotézist azonban korábbi vizsgálatunk eredményei nem támasztják alá, ahol azt tapasztaltuk, hogy a lárvális méregtermelés nem jár jelentős költségekkel. Érdekes módon ezt a nyilvánvaló csereviszonyt nem enyhítette a nagyobb táplálék-gazdagság, ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a periphyton biomassza elhanyagolható hatást gyakorolt a kémiai védekezésre, annak ellenére, hogy ez a táplálékforrás fontos az ebihalak fejlődéséhez. Azonban mivel olyan tavakat figyeltünk meg, amelyekről ismert, hogy a varangyok állandó szaporodóhelye, és amelyek viszonylag nagy ebihal populációknak adnak otthont, elképzelhető, hogy mintáink csak igen jó minőségű élőhelyek közül kerültek ki, ahol mindenütt jó a táplálékellátottság. Így lehetséges, hogy ezeken az élőhelyeken (átl. 0,8-9,5 mg perifiton csempénként) a bőséges táplálékellátottság nem korlátozza a bufadienolid szintézist.

Meglepő módon eredményeink nem támasztották alá azt a hipotézist, miszerint a ragadozóveszély fokozott kémiai védekezést indukál. Ez annak a ténynek tudható be, hogy a vizsgált tavakban élő ragadozók többsége gerinctelen, melyek kevésbé érzékenyek a varangy mérgekre, mint a gerincesek. Egy metaanalízis pl. azt találta, hogy a halak és farkos kétéltűek kétszer annyira találják rosszízűnek a kétéltű zsákmányt (lárvák vagy tojások), mint a rovarok, és azok az ebihalak, melyek ragadozó halakkal fordulnak elő egy vízben, várhatóan rosszabb ízűek a halak számára (Gunzburger és Travis 2005). Mindazonáltal, mi nem találtunk összefüggést a gőtéik denzitása és az ebihalak kémiai védekezésének különbségei között.

A ragadozó-hatás hiányának alternatív magyarázataként lehetséges, hogy a kémiai védekezés kismértékű plaszticitást mutat predációs veszély esetén, ha ez utóbbi kiszámíthatatlanul és igen gyorsan változik (pl. egyes ragadozók, mint például a rovar imágók

és a gőté a tavak között migrálhatnak) és a hibák költsége nagy (vagyis a ragadozók kémiaiilag nem kellően védett ebihalakat zsákmányolják). Az ebihalaknak valószínűleg inkább támaszkodniuk kell a gyors viselkedésbeli alkalmazkodásra, amikor ragadóveszélyre reagálnak (Marquis *et al.* 2004). Ezzel szemben a versenytársak közössége viszonylag kiszámítható lehet a lárvális ontogenezis során (mivel a kétéltű versenytársak nem mozognak a tavak között), és az esetleges indukált válasz hiánya sem jelent rájuk potenciális életveszélyt. Ezért a kémiai védekezésben nagyobb szintű plaszticitást feltételezünk a versenytársakra válaszul, a ragadozókkal szemben pedig inkább konstitutív méregtermelést várunk.

A konstitutív ragadozók elleni toxicitás koncepciója összhangban van a közelmúlt kutatásainak kísérletes eredményeivel, melyekben a kétéltű lárvákat ragadozó veszélyt szimuláló jeleknek tették ki, azonban a kezelésnek semmilyen hatását nem figyelték meg a lárvák kémiai védekezésére (Brossman *et al.* 2014; Üveges *et al.* in prep., de ennek ellentmond Hettyey *et al.* in prep.). Viszont ezeknél a vizsgálatoknál a lárvakori mérgek vagy hiányoztak, vagy nem voltak detektálhatóak (Benard és Fordyce 2003), vagy valószínűleg anyai öröklődésűek és nem is világos, hogy az állatok de novo termelik-e a mérgeiket (Brossman *et al.* 2014). Emiatt a méregtermelő állatoknál a ragadozó indukált védekezés *versus* lokálisan adaptálódott konstitutív védekezés kérdésének megértéséhez további vizsgálatokra van szükség.

Végül, az is figyelemre méltó, hogy nagy egyedek közötti variabilitás mutatkozott még a legerősebb összefüggések esetében is, bőséges helyet hagyva egyéb prediktoroknak, melyeket ebben a tanulmányban nem vizsgáltunk. Például, bizonyos varangyokban termelődött vegyületeknek antimikrobiális hatása van (Cunha Filho *et al.* 2005, Tempone *et al.* 2008); így a különböző tavakban található patogén közösségek szintén befolyásolhatják az ebihalak kémiai védekezését. A kétéltűek potenciális patogénekből gazdag vízi és szárazföldi környezetben élnek (pl. lassú folyók, tavak, árkok, földalatti üregek, bomló farönkök) melyek különösen alkalmasak patogén mikrobák vagy gombák fejlődéséhez, mégis a kétéltűek ritkán esnek ezeknek a fertőzéseknek az áldozatául. Tehát a bőrfelszínen működő anti-mikrobiális és gombaellenes védekező rendszer nyilvánvaló követelmény a kétéltűek túléléséhez (Habermehl 1974, Alvarado 1979, Duellman és Trueb 1986), mely a kétéltűek jól fejlett immunrendszerének részeként tekinthető (Manning és Turner 1976). A kétéltű-betegségek közelmúltbeli terjedése miatt a defenzív anyagok szerepe - a veleszületett immunválasz részeként - minden bizonnyal nagyobb figyelmet érdemel (Woodhams *et al.* 2006). Eredményeink mindenesetre összhangban vannak egyéb tanulmányok eredményeivel, miszerint a fajtársak magas denzitása az élőhelyen kiválthat fokozott kémiai védekezést, míg a

ragadozóveszély kisebb mértékű negatív hatással lehet rá (Groner *et al.* 2014). És mivel a fajtársak magasabb denzitása mellett megnövekszik a paraziták és egyéb patogének átadásának veszélye (Briggs *et al.* 2010) és az egyedek nagyobb eséllyel fogékonyak a fajtársak betegségeire, mint egyéb fajtól származó egyedek betegségeire (Freeland 1983). Kutatócsoportunk eredményei is alátámasztják a hipotézist, miszerint az ebihalak több bufadienolidot termelnek megemelkedett fertőzési kockázat esetén (Bókony *et al.* 2018).

A feltárt térbeli struktúráltság azt sugallja, hogy a méregtermelést erős genetikai háttér és/vagy anyai hatások határozzák meg, talán a különböző életszakaszokban fennálló predációs kockázat típusában, intenzitásában és kiszámíthatóságában való konstitutív védekezésre szelektálódás eredményeképpen. További érdekes lehetőség, hogy a kétélűekben élő baktérium flóra *in situ* biotranszformációja járul hozzá a toxinkomponensek sokféleségéhez (Hayes *et al.* 2009b). Ezekre a részletekre kiterjedő kísérletes vizsgálatok sok mindent tudnának felfedni azzal kapcsolatban, hogy az evolúció hogyan finomítja az összetett életmenetű állatok konstitutív és indukálható kémiai védekezését.

4. Fejezet: A viselkedési plaszticitás időbeli változásának vizsgálata ragadozóveszély és táplálékforrás függvényében barna varangy ebihalaknál

4.1. Anyag és módszer

A vizsgálatot ugyanazoknak az ebihalaknak egy részén végeztük el, amelyeket a 2. fejezetben leírt vizsgálatban használtunk, tehát az állatok gyűjtése és tartása az ott leírtak szerint történt (lásd: 2. Fejezet: 2.1. *Anyag és módszer*).

A 2. Fejezetben leírtak szerint, 8 barna varangy párt gyűjtöttünk, melyeket külön-külön, 120 l-es dobozokba petéztettük, utódjaikból pedig azt követően, hogy elérték a szabadon úszó stádiumot, családonként 40 egészséges példányt véletlenszerűen kiválasztottunk, majd 2 literes nevelődobozokba helyeztük őket egyesével, melyeket 7 dl mesterséges lágy vízzel (RSW; APHA 1985) töltöttünk fel. A dobozokba 3-3 bükklevelet helyeztünk, mely az ebihalaknak búvóhelyül szolgált. A hőmérséklet a laborban 22°C és 17 °C között ingadozott, 13-11 órás fény-sötét ciklusok váltakozása mellett. A laboratóriumban a térbeli hőmérsékleti egyenlőtlenségek hatásának kiküszöbölésére a kísérletet faktoriális randomizált blokk elrendezésben állítottuk fel a következő faktorokkal: ragadozó jelenlétét szimuláló kémiai jelek jelenléte, illetve hiánya, valamint ad libitum, illetve csökkentett táplálékmenyiség. Nyolcvan ebihalak osztottunk be véletlenszerűen a kezelési kombinációkba, ami összesen 320 ebihalat eredményezett, melyből 312 élt túl a kísérlet végéig.

A ragadozó jelenlétét az ebihalak tartóvizébe naponta adagolt 25 ml “ragadozószag”-szuszpenzióval szimuláltuk, mely a kísérletekhez használt 15 pettyes göte tartóvizéből és fajtársak homogenizátumának elegyéből állt (lásd 2. Fejezet: 2.1. *Anyag és módszer*). Az ebihalakat naponta, finomra darált nyúltáp és haleledel 4:1 arányú keverékével etettük: az *ad libitum* táplálékkal nevelt ebihalak testtömegük 9, később 12%-át a csökkentett táplálékmenyiség mellett neveltek pedig 3, később 4 %-át kapták az etetésekkor. A beadott táplálék mennyiségét folyamatosan korrigáltuk az ebihalak aktuális súlyának megfelelően. A tartóvizet minden harmadik napon teljesen lecseréltük.

A viselkedési adatokat a kísérlet során 6 időpontban, az 5., 9., 13., 17., 21. és 25. napon rögzítettük, napi 8 alkalommal. A mintavételezés szinte a teljes lárvális időszakot lefedte, mivel az ebihalak a 27. napon már elkezdtek átalakulni. A mintavételezésnél óvatosan közelítettük meg a tartóedényeket, majd a láthatóságot és a látható állatok aktivitását feljegyeztük. Egy állatot “rejtőzködőnek” ítéltünk, ha az a falevelek alatt teljesen láthatatlan volt és láthatónak,

ha bármely testrésze látható volt. Az aktivitást tekintve inaktívnak kategorizáltuk azon egyedeket, melyek láthatóak voltak, de mozdulatlanok, és aktívnak mikor legalább egy testrészük mozgásban volt a megfigyelés alatt. A megfigyelői elfogultságból adódó torzítás kizárásának érdekében, a megfigyelő sosem volt tisztában azzal, hogy a megfigyelt ebihalak milyen kezeléseknél vannak kitéve.

4.2. Statisztikai elemzés

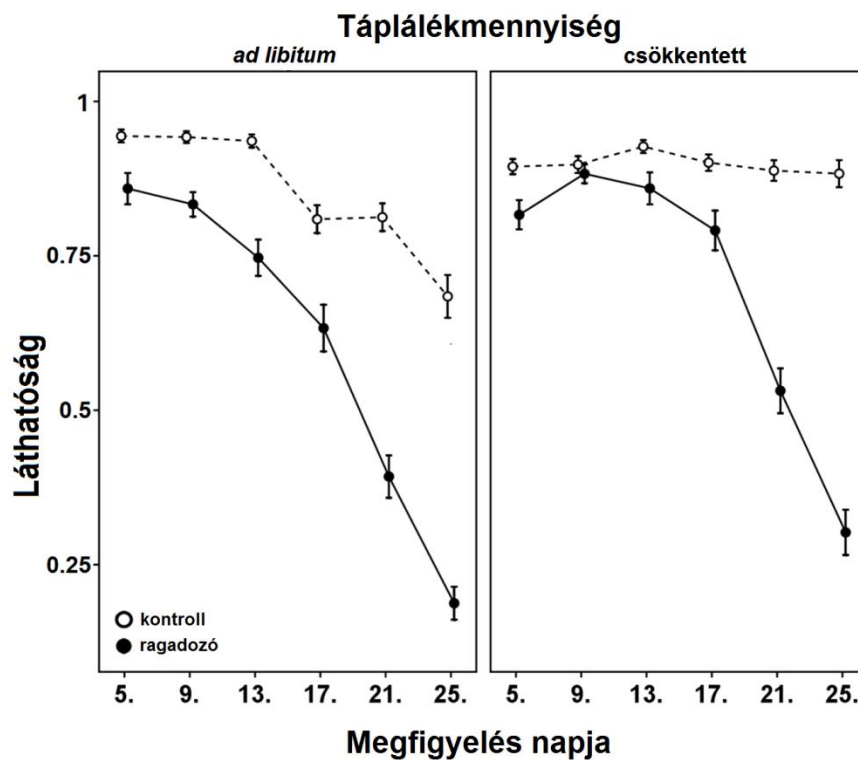
Az analíziseink a restricted maximum likelihood becsléseken alapulnak. Elemzéseinket R környezetben végeztük (3.4.3. verzió, R Core Team 2014). A GzLMM-eket (általánosított kevert modellek) a 'glmmADMB' csomag 'glmmadmb' függvénye (Fournier *et al.* 2012, Skaug *et al.* 2013) segítségével futtattuk, hogy becsüljük, a kezeléseknél miként hatnak a lárvális fejlődés során az ebihalak viselkedésére. A 'láthatóságot' azon esetek számával jellemeztük, melyekben az ebihal a napi 8 vizsgálat alatt láthatónak volt kategorizálva (0-8 skála). A 'relatív aktivitást' úgy számoltuk, hogy az összes olyan esetet, mikor az ebihal mozgásban volt a megfigyelési napon (0-8), elosztottuk azon esetek számával, mikor az ebihal látható volt. A modelleket a láthatóság esetében binomiális hibaeloszlással, a relatív aktivitás esetében béta-binomiális eloszlással illesztettük. A viselkedési adatokat függő változókként vittük be a modelljeinkbe, míg az időt, táplálékmennyiséget és a ragadozó-kezelést fix faktorokként. Annak érdekében, hogy a pszeudio-replikációra különböző szinteken kontrolláljunk (beleértve az egyedi változatosságot, a származást és a térbeli elhelyezkedést a laborban), az egyedi identitást és a családokat beágyazott random hatásként (az egyedi identitás a családba volt ágyazva), a térbeli blokkot mint az előbbivel keresztezett random hatást vittük be a modellekbe. Az időt kovariánsként adtuk hozzá az egymásba ágyazott random hatáshoz, hogy kontrolláljunk a kezelésekre adott viselkedési válaszok időbeli mintázatának egyedek közötti különbségeire. A láthatóság esetében a megfigyelések sorszámát is bevittük a modellbe, mint keresztezett random-hatás, ami GLMM-eknél egy megbízható módszer a túlszóródás (*overdispersion*) figyelembevételére (pl.: Browne *et al.* 2005, Harrison 2014). Minden teszt kétoldali statisztikai próbára épült, ahol az alfa 0,05-nek állítottuk be.

4.3. Eredmények

Az ebihalak viselkedése a korai egyedfejlődés során jelentősen változott és a változás mértékét a nevelési környezet (szimulált ragadozóveszély és táplálékellátottság) erősen befolyásolta (15.

táblázat, 18. és 19. ábra).

A láthatóságot szignifikánsan befolyásolta a táplálék, a ragadozóveszély és az idő közötti hármas interakció (15. táblázat, 18. ábra). Ahol az ebihalak ragadozóveszélyt egyáltalán nem érzékeltek (kontroll csoport) és a táplálék korlátozottan állt rendelkezésükre, ott a levelek alatt rejtőzködő ebihalak aránya a lárvális fejlődés során végig hasonló maradt, viszont ha *ad libitum* táplálékot kaptak, akkor az idő előrehaladtával enyhén csökkent a láthatóságuk. Szimulált ragadozóveszély mellett az ebihalak nagyobb arányban rejtőzködtek a levelek alatt, mint a predációs veszélyt jelző kémiai jelek hiányában nevelt fajtársaik és ez a hatás idővel erősödött (18. ábra).

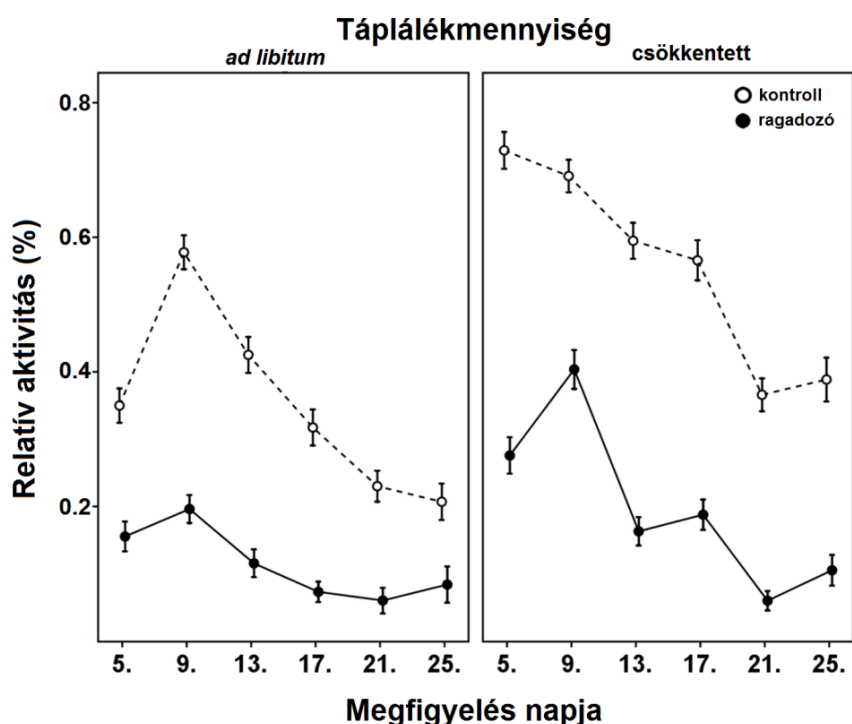


18. ábra: Az ebihalak láthatósága a táplálékellátottság, a predációs veszély és az idő függvényében. Az ábrán azon esetek aránya szerepel, amikor az ebihalak láthatóak voltak (Átlag \pm SE). A folytonos vonallal összekötött, kitöltött szimbólumok jelzik azon csoport átlagértékeit, ahol a ragadozóveszélyt jelző kémiai ingerek jelen voltak, míg a szaggatott vonallal összekötött üres szimbólumok reprezentálják azon csoportok átlagértékeit, ahol ezek nem voltak jelen.

15. táblázat. A szimulált ragadozóveszély (Ragadozó), a táplálékmennyiség és az idő hatása az ebihalak láthatóságára és relatív aktivitására GLMM-ek eredményei alapján.

Függő változók	Faktorok	X^2	df	<i>P</i>
Láthatóság	Ragadozó	0.031	1	0.860
	Táplálékmennyiség	36.489	1	<0.001
	Idő	78.527	1	<0.001
	Tápl.m. × Idő	44.354	1	<0.001
	Ragadozó × Idő	34.088	1	<0.001
	Ragadozó × Tápl.m.	15.696	1	<0.001
	Ragadozó × Tápl.m. × Idő	9.527	1	0.002
	Aktivitás	Ragadozó	53.792	1
Táplálékmennyiség		58.919	1	<0.001
Idő		31.187	1	<0.001
Láthatóság		6.817	1	0.009
Tápl.m. × Idő		6.529	1	0.011
Ragadozó × Idő		0.463	1	0.496
Ragadozó × Tápl.m.		0.628	1	0.428
Ragadozó × Tápl.m. × Idő		0.020	1	0.887

A szignifikáns hatások a modellekben félkövér betűtípussal vannak jelölve.



19. ábra: Az ebihalak relatív aktivitása a táplálékellátottság, a predációs veszély és az idő függvényében. Azon esetek arányát ábrázoltuk, mikor a látható ebihalak aktívak voltak (Átlag ± SE). A folytonos vonallal összekötött, kitöltött szimbólumok jelzik azon csoport átlagértékeit, ahol a ragadozóveszélyt jelző kémiai ingerek jelen voltak, míg a szaggatott vonallal összekötött üres szimbólumok reprezentálják azon csoportok átlagértékeit, ahol ezek nem voltak jelen.

Az aktív ebihalak aránya összességében nagyobb volt táplálékhiányos környezetben, különösen a korai lárvastádiumokban, majd ez az egyedfejlődés előrehaladtával egyre csökkent (15. táblázat, 19. ábra). Mindazonáltal a táplálékmennyiség és az idő egymással kölcsönhatásban hatott az ebihalak aktivitására, mely nagyobb időbeli csökkenést mutatott, ha a táplálék csak korlátozott mennyiségben állt rendelkezésre.

4.4. Értékelés

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a barna varangy ebihalak a környezetükben jelenlevő ragadozóveszélyre és táplálékmennyiségre adott viselkedési válasza az egyedfejlődés során változhat. A barna varangy ebihalak a ragadozóveszélyt szimuláló kémiai jelekre fokozott rejtőzködéssel reagáltak. A levelek alatti rejtőzködés jó eséllyel csökkenti az ebihal detektálhatóságát és a potenciális ragadozókkal való találkozás esélyét, ezáltal növelve az állat túlélési esélyeit (Lima és Dill 1990). Ugyanakkor, ha a táplálék elérhetősége limitált volt, az ebihalak aktívabbak és jobban szem előtt voltak, jól mutatva, hogy a szegényes körülmények között nevelt ebihalaknak kockázat-vállalóbb stratégiát kellett követniük (pl. Milinski és Heller 1978, Skelly 1995). Ezek az eredmények egybevágóak a varangy és egyéb kételtűfajok lárváin végzett korábbi tanulmányok eredményeivel (Laurila *et al.* 1997, Laurila *et al.* 1998, Almeida *et al.* 2011, Nunes *et al.* 2014), és megerősítik, hogy a ragadozóveszélyt jelző kémiai jelek és a táplálék-limitáltság együtt alakítják az ebihalak viselkedését. Míg a viselkedési plaszticitást célzó korábbi hasonló vizsgálatok ritkán vették figyelembe az ebihalak korát, addig az általunk kimutatott ragadozó kezelés, táplálékmennyiség és az idő közötti szignifikáns hármas interakció egyértelmű bizonyítékul szolgál arra, hogy a ragadozókra és a táplálékellátottságra adott viselkedési válasz az egyedfejlődés során változhat.

Az ebihalak mind a láthatóságukat, mind az aktivitásukat csökkentették a ragadozóveszélyre adott válaszként a lárvális egyedfejlődés előrehaladtával. Egyes tanulmányokban a miénkhez hasonló trendet láthatunk az ebihalak viselkedésében (Touchon *et al.* 2013, Bennett *et al.* 2013), viszont mások az ebihal-aktivitás időbeli változatlanúságáról, vagy éppen növekedéséről számoltak be (Eklöv és Werner 2000, Jara és Perotti 2010; Wilson és Krause 2012; Nunes *et al.* 2014). Ez a változatosság a vizsgált viselkedési válaszokban a vizsgálatokban használt különböző kísérleti módszerekkel (Skelly és Kiesecker 2001; Winkler és Van Buskirk 2012), vagy a ragadozó elleni védekezési stratégiák fajok közötti különbségével lehet magyarázható (Kats *et al.* 1988, Van Buskirk 2000, Relyea 2001, Relyea 2003, Relyea and Auld 2005). A götéket, melyeket kísérletünkben a ragadozószag előállításához használtunk,

viszonylag kis testméretűek és egyben nyelik le zsákmányukat, melyből adódóan drasztikusan lecsökken a predációs hatékonyságuk, miután prédaállataik túlnőnek egy bizonyos testméreten, így a nagyméretű ebihalakat csak kis hatékonysággal képesek elejteni és elfogyasztani (Wilbur *et al.* 1983, Urban 2007b, Urban 2008). Ennek ellenére a kísérletünkben nem tapasztaltunk, hogy az ebihalak növekedésével lecsökkenne a zsákmányolásban méretkorlátozott ragadozó szimulált jelenlétének hatása az ebihalak aktivitására és rejtőzködésére. Az, hogy a nagyobb ebihalak nem rejtőzködtek kevésbé a ragadozóveszélyt jelző kémiai ingerek jelenlétében, mint a kisebbek, legalábbis részben magyarázható lehet azzal, hogy a gőtéktől származó tartóvizet fajtársaik homogenizált szuszpenziójával keverve adtuk be. A zsákmánytól származó kémiai jelek önmagukban igen erős válaszreakciót válthatnak ki az ebihalakból, különösen, ha az ragadozószaggal is párosul (Marquis *et al.* 2004; Hagman *et al.* 2009; Hettyey *et al.* 2015). Továbbá, a sérült fajtársaktól származó jelek a veszélyt jelzik, függetlenül a potenciálisan veszélytelen ragadozó jelenlététől, ami fenntarhatta kísérletünkben az intenzív ragadozó-elkerülő viselkedési reakciókat.

Csak néhány olyan korábbi vizsgálatról tudunk, amiben már vizsgálták a táplálkozó-ragadozó elkerülő viselkedés csereviszonyának korfüggő változásait a kétéltűek lárvakori egyedfejlődése alatt. Laurila és kollégái (1998) kimutatták, hogy a barna varangy ebihalak aktivitását befolyásolja a ragadozók jelenléte és az etetéstől eltelt napok száma, és hogy ezek kapcsolata változik az idővel. Függő változóként bevonták az időt, azonban nem foglalkoztak azzal a kérdéssel, hogy a viselkedés hogyan változik az életkorral, hanem csak azzal, hogyan változik a vizsgált egyedek viselkedése az etetések között eltelt idő függvényében. Bennett és munkatársai (2013) viszont kimutatták, hogy a leopárdbéka (*Lithobates pipiens*) ebihalak csökkent aktivitást mutattak növekvő ragadozóveszély mellett, de tartós válasz nem mutatkozott a táplálék manipulációjára. Mindazonáltal, kimutattak időfüggő változást a ragadozók elleni viselkedési védekezés erősségében és a viselkedés a rendelkezésre álló táplálékmenyiséghez való igazodását a korai, de nem a későbbi lárvastádiumokban. Skelly és Werner (1990) amerikai varangy *Anaxyrus americanus* (*syn: Bufo americanus*) ebihalakat vizsgálva a miénkhez hasonló eredményeket kaptak: a ragadozó-elkerülő viselkedés időbeli gyengülésévv,cb tapasztalták, bár náluk a táplálékmenyiség manipulációjának nem volt szignifikáns hatása a viselkedésre. Mivel ezekben a korábbi tanulmányokban a ragadozó-táplálék-kor hármas interakciója nem befolyásolta az ebihalak viselkedését, ez arra enged következtetni, hogy ezen mintázatok fajspecifikusak lehetnek.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy eredményeink szerint a barna varangy ebihalak ragadozók elleni viselkedési válaszai változnak az egyedfejlődés során és hogy ezek az életkor-

függő viselkedési változások forrásfüggők is lehetnek. Ez a vizsgálat alátámasztja mind a külső, mind a belső környezeti tényezők fontosságát az olyan vizsgálatokban, melyek az indukálható védekezést célozzák kételtű modellszervezeten, és bizonyítja, hogy a ragadozó-elkerülő viselkedés kutatásánál különös figyelemmel kell eljárni, mikor össze kívánjuk hasonlítani a különböző vizsgálatok eredményeit, ahol nagy valószínűséggel eltérő fejlődési stádiumokban mérték, vagy eltérő táplálék ellátottság mellett nevelték a kísérleti állatokat.

Eredményeink összegzése és értékelése

Barna varangy ebihalakon teszteltünk egy olyan *in vivo* módszert (Dockray 1975, Rollins-Smith 2005, Quagliata *et al.* 2008; Giuliani és Rinaldi 2010, Gammill *et al.* 2012, Maag *et al.* 2012), mely nem jár az állatok megölésével, valamint lehetővé teszi a mérgek kivonás után az állatok további vizsgálatát. Azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott kezelés nem okoz mérhető rátermettség-csökkenést a vizsgált egyedekben, legalábbis rövidtávon, ugyanakkor hatékonynak bizonyult; eredményeként a mérgeganyag mennyisége, és különösen összetétele, megváltozott az ebihalakban közvetlenül a kezelést követően. Az indukált mérgleadást követően 12 óra elteltével az eredeti, kezeléseket előtti mennyiségi viszonyok helyreállnak az ebihalakban. Ez vagy extrém gyors mérreg-újratermelődést, vagy, ami valószínűbb, a komponensek egymásba való átalakulását feltételezi. Vizsgálataink eredményei azt is hangsúlyozzák, hogy az összetett, több komponensből álló mérgek keverékeket szintetizáló fajok esetében a termelt komponensek számának és teljes mérgegmenységnek az elemzése önmagában, a komponensek specifikus csoportosítása nélkül elfogult következtetéseket vonhat maga után. Az egyes komponensek nagyon eltérően reagáltak a norepinefrines kezelésre; *m/z*-érték alapján két nagyobb csoport különült el a válasz irányának függvényében: a nagyobb molekulatömegű bufotoxinok mennyisége lecsökkent, a kisebb bufogéninéké viszont megnőtt. Az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a kis molekulású komponensek a prekursorai a nagyobb, összetettebb molekuláknak. Másik lehetséges magyarázat, hogy a kisebb molekulású komponensek az aktívan ható komponensek, a nagyobbak pedig „inaktívan” tárolódnak a mirigysejtekben és leadásnál átalakultak a mérgezőbb, kisebb komponensekké. A barna varangy ebihalak bőrében levő mérgektartalékok ürítése nem gyakorolt számottevő hatást a ragadozók elleni válaszok között fennálló energetikai csereviszonyokra, ebből arra következtethetünk, hogy a barna varangy ebihalak vagy nem növelik meg mérgegtermelésük sebességét mérgektartalékaik kiürülése után, vagy, hogy a bufadienolidok fitness-jelző bélyegeken mérhető előállítási költsége elenyésző. Ugyanakkor, a barna varangy ebihalak adaptív ragadozó ellenes plasztikus válasza megmutatkozik a fokozott fejlődési sebességben, viszont ez csak akkor kifejezett, ha a táplálék korlátozottan áll rendelkezésre, és az átalakuláskor mért alacsonyabb testtömegből adódó rátermettség-költségekkel jár együtt. Azonban ezt az összefüggést a mérgektárak manipulálása nem befolyásolta. A mérgektárak gyors feltöltődése összhangban van azzal a következtetésünkkel, miszerint a fokozott mérgegtermelés alacsony fitness költségekkel jár a barna varangy ebihalak számára.

Eredményeink együtt arra utalnak, hogy egy kockázatos környezetben az ebihalaknak kifizetődő stratégia lehet, ha kémiaiag erősen védettek a ragadozók ismételt támadásaival szemben és fenntarthatják a kellő toxicitási szintet jelentős, más, ragadozók elleni védekezési mechanizmusokra kiterjedő kompromisszumok nélkül. Ez azonban csak akkor kifizetődő, ha az ebihalakat ért támadások csak kis arányban okoznak sérülést, ami lényegesen megváltoztathatja a passzív kémiai védekezéssel járó költségeket, de végeredményben, a mérge-termelés hiányából adódó járulékos ökológiai költségek fontosabbak lehetnek a kémiai védelem szempontjából, mint az ahhoz szükséges források megszerzésének költségei (Zvereva és Kozlov 2016).

Terepi vizsgálatunk megmutatta, hogy a környezet sokféleségének megfelelően a kémiai védekezés egy fajon belül is igen változatos lehet a természetben. Az ebihalakban mért mérge-mennyiség tavak között nagymértékben eltért, és a komponensek száma ugyancsak különbözött az ausztriai és a magyarországi mintavételi területek között; azonban a tavak közötti szignifikáns különbség a tavak közötti távolságtól függetlennek bizonyult. Ez az első olyan tanulmány, mely alátámasztja olyan kételtűek kémiai védekezésében a földrajzi változatosság meglétét, melyek *de novo* maguk termelik mérgeüket (Daly 1995, Üveges *et al.* 2017). A predációs veszélynek nem volt befolyása az ebihalakban termelt mérge-mennyiségre, viszont az ebihalak általában nagyobb mennyiségben tartalmaztak bufadienolidokat az állandóbb vizű tavakban, mint azokban, amelyek gyakran kiszáradnak. A tavak közötti mérgetartalombeli különbségeket azonban legjobban a versenytársak denzitása magyarázta: az ebihalak többféle mérgek-komponenst és összességében több mérgeanyagot tartalmaztak azokban a tavakban, amelyekben több volt a versenytárs. Eredményeink tehát alátámasztották a korábbi feltételezéseket, miszerint a barna varangy ebihalak mérge-termelésüket a környezetükben előforduló versenytársak denzitásához igazítják (Hettyey *et al.* 2014). Várakozásainkkal ellentétben a ragadozók denzitásával nem állt összefüggésben a különböző populációkban megtermelt mérgek mennyisége, sem összetétele, de ezt okozhatta a varangy ebihalak termelte mérgekre jórészt immunis gerinctelen ragadozók túlsúlya. Az is egy lehetséges magyarázat lehet, hogy az ebihalaknak valószínűleg inkább támaszkodnak a gyors viselkedésbeli alkalmazkodásra, amikor ragadozóveszélyre reagálnak (Marquis *et al.* 2004). A varangyok bőrében termelődött mérgek azonban -mint azt korábban említettem- védelmet nyújthatnak a mikrobiális fertőzések ellen is (Cunha Filho *et al.* 2005, Tempone *et al.* 2008) ezért feltételezhető, hogy a tavakban található eltérő patogén közösségek fontos befolyást gyakorolhatnak az ebihalak kémiai védekezésére (Briggs *et al.* 2010, Bókonyi *et al.* 2016, 2018). Végül érdekes megfigyelésként, az olyan kistavakban, melyek kisebb eséllyel száradnak

ki, az ebihalak nagyobb koncentrációban tartalmaztak bufadienolid vegyületeket, mint a kiszáradásra hajlamos kistavakban. Ez azt sugallja, hogy a méregtermelésbe és a többi védekezési formába való energia befektetést csak a nyugodtabb körülmények között nevelkedett ebihalak engedhetnek meg maguknak, melyeknek nem kell drasztikusan felgyorsítaniuk a fejlődési sebességüket, mivel egy kiszáradó tó esetében a szelekció a felgyorsult fejlődésbe való többlet energia befektetésnek kedvez (Richter-Boix *et al.* 2011, Steiner és Pfeiffer 2007). Mivel a laborban végzett, a ragadozó-ellenes védekezés költségeit vizsgáló kísérletünkben nem mértük az állatokban a bufadienolidok mennyiségét, ezért ennek felderítéséhez szükséges lenne egy olyan kísérlet, mely azt vizsgálja, hogy a fokozott fejlődési sebességbe fektetett többlet energia hogyan befolyásolja a méregtermelést.

Egyértelmű eredményt szolgáltatunk arra is, hogy a ragadozókra és a táplálékellátottságra adott összetett viselkedési válasz az egyedfejlődés során nagymértékben változhat. A barna varangy ebihalak viselkedése a korai egyedfejlődés során jelentősen változott (mind láthatóságuk, mind aktivitásuk csökkenő tendenciát mutatott) és a változás mértékét a nevelési környezet (szimulált ragadozóveszély és táplálékellátottság) erősen befolyásolta. A ragadozóveszélyt szimuláló kémiai jelekre fokozott rejtőzködéssel reagáltak az ebihalak, és ez a hatás idővel erősödött, viszont nem volt megfigyelhető az éhező ebihalaknál, ahol az ebihalak aktívabbak és jobban szem előtt voltak, különösen a korai lárvastádiumokban, támogatva az egyszerű allokációs modell hipotézisét, miszerint a szegényes körülmények között nevelt ebihalaknak kockázat-vállalóbb stratégiát kellett követniük. Ahol az ebihalak ragadozóveszélyt egyáltalán nem érzékeltek és a táplálék korlátozottan állt rendelkezésükre, ott a levelek alatt rejtőzködő ebihalak aránya a lárvális fejlődés során végig hasonló maradt, viszont ha *ad libitum* táplálékot kaptak, akkor az idő előrehaladtával enyhén csökkent a láthatóságuk. Az ebihalak viselkedését befolyásoló környezeti tényezők hatása tehát az egyedfejlődés során radikálisan megváltozhat, feltehetően a háttérben húzódó belső tényezők (pl. fiziológiai folyamatok, a korrallal összefüggésbe hozható stratégiaváltás, úgy mint a reprodukzív életkorhoz közelítve megmutatkozó növekedett „óvatosság”, vagy a méretnövekedéssel együttjáró ragadozó elleni védettség) miatt, melyek befolyásolják a táplálkozási aktivitást és a ragadozó elkerülő viselkedést. Míg a viselkedési plaszticitást célzó korábbi hasonló vizsgálatok ritkán vették figyelembe az ebihalak korát, addig az általunk kimutatott ragadozó kezelés, táplálékmenyiség és az idő közötti szignifikáns hármassal interakció egyértelmű bizonyítékul szolgál arra, hogy a ragadozókra és a táplálékellátottságra adott viselkedési válasz az egyedfejlődés során változhat.

Eredményeink alátámasztják mind a külső, mind a belső környezeti tényezők fontosságát

az olyan vizsgálatokban, melyek az indukálható védekezést célozzák kételtű modellszervezeten. Továbbá, közelebb vittek ahhoz, hogy megértsük, a környezeti tényezők interakciója hogyan alakítja együttesen a ragadozó-indukált védekezést az olyan komplex életmenettel rendelkező fajokban, melyeknek az ellenségeik elleni védelmi mechanizmusaik is rendkívül összetettek. Ezen ismeretek segítségével pontosabb képet kaptunk arról, hogy a természetes szelekció miként hathat a plasztikus jellegek kialakulására és fennmaradására természetes populációkban.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Hettyey Attilának és Tóth Zoltánnak, akik az évek során megtanítottak a tudományos kísérlettervezésre és a vizsgálatok kivitelezésére, valamint aktív segítséget nyújtottak a terepi munkától a laborkísérletek lebonyolításán át az eredmények kiértékeléséig és publikálásáig. Nélkülük ez a munka nem valósulhatott volna meg, példaértékű precizitásuk, hatékonyságuk és eltökéltségük a szakma iránt erős hajtóerő volt az évek során, mely nélkül feltehetően nem váltam volna kutatóvá és ez a munka sem jöhetett volna létre. Továbbá köszönöm az MTA Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoportjában velem együtt dolgozó munkatársaimnak, Fera Gábornak, Jókai Leventének, Mikó Zsanettnak, Pásztor Katalinnak, Üveges Bálintnak, Szederkényi Márknak, és Vági Baláznak, hogy munkájukkal segítették a terepi és laboratóriumi vizsgálatok megvalósítását. Külön köszönetet szeretnék mondani Krüzselyi Dánielnek és Móricz Ágnesnek a minták analitikai kémiai elemzésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm azoknak a kutatóknak, akik szerzőtársként vagy csupán segítőtársként, ötleteikkel, meglátásaikkal segítettek a disszertáció alapjául szolgáló kísérletek tervezését és a belőlük készült közlemények végleges formába öntését: Bókony Veronika, Douglas C. Woodhams, Josh Van Buskirk, Nino Maag, valamint a cikkek anonim elbírálói is.

Köszönöm a Közép-Duna-völgyi Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőségnek, hogy kutatásaimhoz megadták az engedélyt. A pénzügyi támogatást a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja (MTA, LP2012-24 / 2012), az MTA Posztdoktori Kutatási Program (SZ-029/2013), a Magyar Tudományos Kutatási Alap (PD108938), egy Sparkling Science projekt (Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung, Ausztria, SPA 04/171), valamint egy FP7 Marie Curie Karrier Integrációs Pályázat (PCIG13-GA-2013-631722) nyújtotta.

Irodalomjegyzék

- Alford RA, Harris RN (1988) Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *Am Nat* 131:91-106.
- Alvarado RH (1979) Amphibians. In *Comparative Physiology of Osmoregulation in Animals* (ed. Maloiy GMO), pp. 261±303. Academic Press, London.
- Abrams PA, Rowe L (1996) The effects of predation on the age and size of maturity of prey. *Evolution*, 50:1052–1061.
- Agrawal AA (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, 294:321–326.
- Almeida E, Nunes A, Andrade P, Alves S, Guerreiro C, Rebelo R (2011) Antipredator responses of two anurans towards native and exotic predators. *Amphib-Reptil* 32:341–350.
- Altwegg R, Reyer HU (2003) Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57:872–882.
- Anholt BR, Werner EE (1995) Interaction between food availability and predation mortality mediated by adaptive behavior. *Ecology* 76:2230–2234.
- Anholt BR, Earl Werner EE, Skelly DK (2000) Effect of food and predators on the activity of four larval ranid frogs. *Ecology*, 81:3509–3521
- APHA (1985) *Standard methods for the examination of wastewater*. 16th ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Arendt JD (1997) Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *Q Rev Biol* 72:149-177
- Arbuckle K, Brockhurst M, Speed MP (2013) Does chemical defence increase niche space? A phylogenetic comparative analysis of the *Musteloidea*. *Evol Ecol* 27: 863–881

- Arthur W (2002) The interaction between developmental bias and natural selection: from centipede segments to a general hypothesis. *Heredity* 89:239–246.
- Auld JR, Relyea R (2011) Adaptive plasticity in predator-induced defenses in a common freshwater snail: altered selection and mode of predation due to prey phenotype. *Evol Ecol*, 25:189–202.
- Auld JR, Agrawal AA, Relyea RA (2010) Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proc R Soc B Biol Sci*, 277:503–511.
- Bane V, Lehane M, Dikshit M, O’Riordan A, Furey A (2014) Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins* 6:693-755
- Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wüster W (2009) Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc R Soc B* 276:2443–2449
- Barry MJ (2015) Effects of resource distribution on the cost of predator avoidance behaviour in tadpoles. *Hydrobiologia*, 758:99–105.
- Bateman PW, Fleming PA (2015) Body size and group size of Cuban tree frog (*Osteopilus septentrionalis*) tadpoles influence their escape behavior. *Acta Ethol* 18:161–166.
- Bates D, Maechler M, Bolker B and Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw*, 67:1-48.
- Benard MF (2004) Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annu Rev Ecol Syst*, 35:651–673.
- Benard MF, Fordyce JA (2003) Are induced defenses costly? Consequences of predator-induced defenses in western toads, *Bufo boreas*. *Ecology*, 84:68–78.
- Bennett AM, Pereira D, Murray DL (2013) Investment into defensive traits by anuran prey (*Lithobates pipiens*) is mediated by the starvation-predation risk trade-off. *PLoS ONE*

8:e82344. doi: 10.1371/journal.pone.0082344

- Benson BJ, Hadley ME (1969) *In vitro* characterization of adrenergic receptors controlling skin gland secretion in two anurans *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol*, 30:857–864.
- Berenbaum MR, Zangerl AR (1994) Costs of inducible defense: protein limitation, growth, and detoxification in Parsnip webworms. *Ecology*, 75:2311-2317.
- Bonduriansky R, Day T (2009). Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. *Annu Rev Ecol Systemat*, 40:103–125.
- Bókony V, Móricz ÁM, Tóth Z, et al (2016) Variation in chemical defense among natural populations of common toad, *Bufo bufo* tadpoles: the role of environmental factors. *J Chem Ecol* 42:329–338.
- Bókony V, Mikó Z, Móricz ÁM., Krüzselyi D, Hettyey A (2017) Chronic exposure to a glyphosate-based herbicide makes toad larvae more toxic. *Proc. Royal Soc. Lond* 284: 20170493
- Bókony V, Üveges B, Móricz ÁM, Hettyey A (2018) Competition induces increased toxin production in toad larvae without allelopathic effects on heterospecific tadpoles. *Func Ecol* 32:667-675.
- Bridges CM (2002) Tadpoles balance foraging and predator avoidance: Effects of predation, pond drying, and hunger. *J Herpetol* 36:627-634
- Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT (2010) Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc Natl Acad Sci* 107:9695–9700
- Brodie, ED (2009) Toxins and venoms. *Curr Biol* 19: R931–R935
- Brossman KH, Carlson BE, Stokes AN, Langkilde T (2014) Eastern newt (*Notophthalmus viridescens*) larvae alter morphological but not chemical defenses in response to predator cues. *Can J Zool* 92:279–283

- Brown JS, Kotler BP (2004) Hazardous duty pay and the foraging cost of predation. *Ecol Lett* 7:999–1014.
- Bucciarelli GM, Shaffer HB, Green DB, Kats LB (2017) An amphibian chemical defense phenotype is inducible across life history stages. *Sci Rep* 7:81–85.
- Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. Springer, New York
- Buskirk JV (2009) Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecol Monogr* 79:681–705.
- Cabrera-Guzmán E, Crossland MR, Brown GP, Shine R (2013) Larger body size at metamorphosis enhances survival, growth and performance of young cane toads (*Rhinella marina*). *PLoS ONE* 8:e70121. doi: 10.1371/journal.pone.0070121
- Castillo GA, Orce GG (1997) Response of frog and toad skin to norepinephrine. *Comp Biochem Physiol*, 118:1145–1150.
- Chau R, Kalaitzis JA, Neilan BA (2011) On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquat Toxicol* 104:61–72.
- Chivers, DP, Kiesecker JM, Marco A, Wildy EL, Blaustein AR (1999) Shifts in life history as a response to predation in western toads (*Bufo boreas*). *J Chem Ecol*, 25:2455–2463.
- Clark CW, Harvell CD (1992) Inducible defenses and the allocation of resources: A minimal model. *Am Nat*, 139:521–539.
- Connelly S, Pringle CM, Bixby RJ, Brenes R, Whiles MR, Lips KR, Kilham S, Huryn AD (2008) Changes in stream primary producer communities resulting from large-scale catastrophic amphibian declines: can small-scale experiments predict effects of tadpole loss? *Ecosystems* 11:1262–1276
- Cowlishaw G (1997) Refuge use and predation risk in a desert baboon population. *Anim Behav* 54:241–253.

- Crossland MR, Alford RA (1998) Evaluation of the toxicity of eggs, hatchlings and tadpoles of the introduced toad *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) to native Australian aquatic predators. *Aust J Ecol* 23:129–137
- Crossland MR, Haramura T, Salim AA, et al (2012) Exploiting intraspecific competitive mechanisms to control invasive cane toads (*Rhinella marina*). *Proc R Soc B Biol Sci*, 279:3436–3442.
- Crossland MR, Shine R (2012) Embryonic exposure to conspecific chemicals suppresses cane toad growth and survival. *Biol Lett* 8:226–229
- Cressler CE, King AA, Werner EE (2010) Interactions between behavioral and life-history trade-offs in the evolution of integrated predator-defense plasticity. *Am Nat* 176:276–288.
- Cunha Filhoa GA, Schwartz CA, Resck IS, Murta MM, Lemos SS, Castro MS, Kyaw C, Pires OR Jr, Leite JRS (2005) Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon* 45:777–782
- Daly JW, Myers CW, Whittaker N (1987) Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon* 25:1023–1095
- Daly JW (1995) The chemistry of poisons in amphibian skin. *P Natl Acad Sci USA* 92:9–13
- Daly JW (1998) Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *J Nat Prod*, 61:162–172.
- Darst CR, Menéndez-Guerrero PA, Coloma LA, Cannatella DC (2005) Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (*Dendrobatidae*): a comparative analysis. *Am Nat* 165:56–69
- Dekant W (2009) The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. In: Luch A. (eds)

- Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. *Experientia Supplementum*, vol 99. Birkhäuser, Basel. pp. 57–86.
- Delfino G, Brizzi R, Feri L (1995) Chemical skin defence in *Bufo bufo*: an ultrastructural study during ontogenesis. *Zool Anz* 234:101-111
- DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol Evol* 13:77–81.
- DeWitt TJ (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity: Tests with predator-induced morphology and life history in a freshwater snail. *J Evol Biol*, 11:465–480.
- DeWitt TJ, Scheiner SM (2004) Phenotypic variation from single genotypes. In: DeWitt TJ, Scheiner SM (eds) *Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches*. Oxford Univ. Press, pp 1–9.
- Dockray G (1975) Caerulein secretion by dermal glands in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol*, 64:724–733.
- Duellman WE, Trueb L (1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Eklöv P, Halvarsson C (2000) The trade-off between foraging activity and predation risk for *Rana temporaria* in different food environments. *Can. J. Zool.* 78:734–739.
- Eklöv P, Werner EE (2000) Multiple predator effects on size-dependent behavior and mortality of two species of anuran larvae. *Oikos* 88:250–258.
- Engqvist L (2005) The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. *Anim Behav*, 70:967–971.
- Fedorova OV, Zernetkina VI, Shilova VY, Grigorova YN, Juhasz O, Wei W, Marshall CA, Lakatta EG, Bagrov AZ (2015) Synthesis of an endogenous steroidal Na pump inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway. *Circ Cardiovasc Genet* 8, 736– 745.

- Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T, Kaltenpoth M (2015) Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* 32:904-936.
- Fordyce JA, Nice CC, Shapiro AM (2006) A novel trade-off of insect diapause affecting a sequestered chemical defense. *Oecologia*, 149:101–106.
- Formanowicz DR (1982) Foraging tactics of larvae of *Dytiscus verticalis* (Coleoptera: Dytiscidae): the assessment of prey density. *J Anim Ecol* 51:757–767.
- Formanowicz DR, Brodie ED, Wise SC (1989) Foraging behavior of matamata turtles: the effects of prey density and the presence of a conspecific. *Herpetologica* 45:61–67.
- Fournier DA, Skaug HJ, Ancheta J, Ianelli J, Magnusson A, Maunder M, Nielsen A and Sibert J (2012) AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optim Methods Softw* 27:233-249.
- Fox J, Weisberg S (2011) An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- Freeland WJ (1983) Parasites and the coexistence of animal host species. *Am Nat*, 121:223–236.
- Fritz RS, Simms EL (1992) Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics. University of Chicago Press, Chicago
- Gammill WM, Fites JS, Rollins-Smith LA (2012) Norepinephrine depletion of antimicrobial peptides from the skin glands of *Xenopus laevis*. *Dev Comp Immunol*, 37:19-27.
- Gasc JP, Cabela A, Crnobrnja-Isailovic J, Dolmen D, Grossenbacher K, Haffner P, Lescure J, Martens H, Martínez Rica JP, Maurin H, Oliveira ME, Sofianidou TS, Veith M & Zuiderwijk A (eds) (1997) Atlas of amphibians and reptiles in Europe. Collection Patrimoines Naturels, 29, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, 496 pp.
- Ghalambor CK, McKAY JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive

- phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol*, 21:394–407.
- Giovannini MG, Poulter L, Gibson BW, Williams DH (1987) Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem J*, 243:113.
- Giuliani A, Rinaldi AC (2010) Antimicrobial peptides. *Methods and protocols. Methods in molecular biology*, vol 618. Humana Press, New York
- Gosavi SM, Gaikwad PS, Gramapurohit NP, Kumar AR (2014) Occurrence of parotoid glands in tadpoles of the tropical frog, *Clinotarsus curtipes* and their role in predator deterrence. *Comp Biochem Physiol A* 170:31–37
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190
- Grafen A, Hails R (2002) *Modern statistics for the life sciences*. Oxford University Press, Oxford, New York
- Green J (2009) The distribution and variation of *Daphnia lumholtzi* (*Crustacea: Cladocera*) in relation to fish predation in Lake Albert, East Africa. *J Zool*, 151:181–197.
- Griffiths RA, Denton J, Wong ALC (1993) The effect of food level on competition in tadpoles: interference mediated by protothecan algae? *J Anim Ecol* 62:274–279
- Groner ML, Rollins-Smith LA, Reinert LK, Hempel J, Bier ME, Relyea RA (2014) Interactive effects of competition and predator cues on immune responses of leopard frogs at metamorphosis. *J Exp Biol* 217:351–358
- Gunzburger MS, Travis J (2005) Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *J Herpetol* 39:547–57.
- Habermehl GG (1974) Venoms of Amphibia. In *Chemical Zoology Vol. 9* (ed. M. Florkin M, Scheer BT), pp. 78-110. Academic Press, London & New York.
- Hagman M, Hayes RA, Capon RJ, Shine R (2009) Alarm cues experienced by cane toad

- tadpoles affect post-metamorphic morphology and chemical defenses. *Funct Ecol* 23:126–132.
- Hammill E, Rogers A, Beckerman AP (2008) Costs, benefits and the evolution of inducible defences: a case study with *Daphnia pulex*. *J Evol Biol*, 21:705–715.
- Hanifin CT, Brodie ED III, Brodie ED Jr (2003) Tetrodotoxin levels in eggs of the rough-skin newt, *Taricha granulosa*, are correlated with female toxicity. *J Chem Ecol* 29:1729–1739
- Harrison XA (2014) Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *Peer J* 2: e616.
- Harvell CD (1990) The ecology and evolution of inducible defenses. *Q Rev Biol* 65: 323–340.
- Hayes RA, Crossland MR, Hagman M, Capon RJ, Shine R (2009a) Ontogenetic variation in the chemical defenses of Cane toads (*Bufo marinus*): toxin profiles and effects on predators. *J Chem Ecol*, 35:391–399.
- Hayes RA, Piggott AM, Dalle K, Capon RJ (2009b) Microbial biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. *Bioorg Med Chem Lett* 19:1790–1792
- Henrikson B-I (1990) Predation on amphibian eggs and tadpoles by common predators in acidified lakes. *Holarctic Ecol* 13:201–206
- Hentschel, BT (1999) Complex life cycles in a variable environment: predicting when the timing of metamorphosis shifts from resource dependent to developmentally fixed. *Am Nat* 154:549–558.
- Hettyey A, Thonhauser KE, Bókony V, Penn DJ, Hoi H, Griggio M (2016) Naive tadpoles do not recognize recent invasive predatory fishes as dangerous. *Ecology* 97: 2975-2985.
- Hettyey A, Tóth Z, Thonhauser KE, Frommen JG, Penn DJ, Van Buskirk J (2015) The relative importance of prey-borne and predator-borne chemical cues for inducible antipredator responses in tadpoles. *Oecologia* 179:699–710.

- Hettyey AZ, Tóth J, Van Buskirk J (2014) Inducible chemical defences in animals. *Oikos*, 123:1025–1028.
- Hettyey A, Vincze K, Zsarnóczai S, Hoi H, Laurila A (2011) Costs and benefits of defenses induced by predators differing in dangerousness. *J Evol Biol* 24:1007–1019.
- Hettyey A, Zsarnóczai S, Vincze K, Hoi H, Laurila A (2010) Interactions between the information content of different chemical cues affect induced defenses in tadpoles. *Oikos* 119:1814–1822.
- Hossie TJ, Murray DL (2012) Assessing behavioral and morphological responses of frog tadpoles to temporal variability in predation risk: Plastic defense expression when predation risk is variable. *J Zool* 288:275–282.
- Hossie TJ, Landolt K, Murray DL (2017) Determinants and co-expression of anti-predator responses in amphibian tadpoles: a meta-analysis. *Oikos* 126:173–184.
- Jara FG, Perotti MG (2010) Risk of predation and behavioral response in three anuran species: Influence of tadpole size and predator type. *Hydrobiologia* 644:313–324.
- Jared C, Antoniazzi MM, Jordao AE, Silva JRM, Greven H, Rodrigues MT (2009) Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. *Toxicon*, 54:197–207.
- Jared, SGS, Jared C, Egami MI, Mailho-Fontana PL, Rodrigues MT, Antoniazzi MM (2014) Functional assessment of toad parotoid macroglands: a study based on poison replacement after mechanical compression. *Toxicon* 87:92-103.
- Kamano Y, Kotake A, Hashima H, Inoue M, Morita H, Takeya K, Itokawa Hideji, Nandachi N, Segawa T, Yukita A, Saitou K, Katsuyama M, Pettit GR (1998) Structurecytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides. *Bioorganic & Med Chem* 6:1103-1115.
- Kats LB, Petranks JW, Sih A (1988) Antipredator defenses and the persistence of amphibian

- larvae with fishes. *Ecology* 69:1865–1870.
- Kicklichter, C (2012) Chemical defences against predators. – In: Brönmark, C. and Hansson, L.-A. (eds), *Chemical ecology in aquatic systems*. Oxford Univ. Press, pp. 236–249.
- Kishida O, Nishimura K (2005) Multiple inducible defenses against multiple predators in anuran tadpole (*Rana pirica*) *Evol Ecol Res* 7:619-631.
- Kishida O, Trussell GC, Nishimura K (2007) Geographic variation in a predator-induced defence and its genetic basis. *Ecology* 88:1948-1954.
- Krebs CJ (1999) *Ecological Methodology*, 2nd ed. Addison-Wesley Educational Publishers, Inc.
- Kubaneck J, Whalen KE, Engel S, Kelly SR, Henkel TP, Fenical W, Pawlik JR (2002) Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two caribbean sponges. *Oecologia*, 131:125–136.
- Kupferberg SJ (1997) The role of larval diet in anuran metamorphosis. *Am Zool* 37:146–159.
- Kurali A, Pásztor K, Hettyey A, Tóth Z (2016) Toxin depletion has no effect on antipredator responses in common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. *Biol J Linn Soc* 119:1000-1010.
- Kusch J (1993) Behavioural and morphological changes in ciliates induced by the predator *Amoeba proteus*. *Oecologia*, 96:354–359.
- LaFiandra EM, & Babbitt KJ (2004) Predator induced phenotypic plasticity in the pinewoods tree frog, *Hyla femoralis*: necessary cues and the cost of development. *Oecologia*, 138:350–359.
- Laland KN, Uller T, Feldman MW, Sterelny K, Müller GB, Moczek A, Jablonka E, Odling-Smee J (2015). The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proc R Soc B*, 282 (1813): 20151019.
- Lardner B (2000) Morphological and life history responses to predators in larvae of seven anurans. *Oikos*, 88:169–180.

- Lardner B (2000) Morphological and life history responses to predators in larvae of seven anurans. *Oikos* 88:169–180.
- Laubichler MD, Renn J (2015) Extended evolution: A Conceptual Framework for Integrating Regulatory Networks and Niche Construction. *J. Exp. Zool B: Molecular and Developmental Evolution*. 324: 565–577.
- Laurila A, Kujasalo J, Ranta E (1998) Predator-induced changes in life history in two anuran tadpoles: Effects of predator diet. *Oikos* 83:307–317.
- Laurila A, Kujasalo J, Ranta E (1997) Different antipredator behavior in two anuran tadpoles: Effects of predator diet. *Behav Ecol Sociobiol* 40:329–336.
- Lawler SP (1989) Behavioural responses to predators and predation risk in four species of larval anurans. *Anim Behav*, 38:1039-1047.
- Lenth RV (2016) Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, :1-33.<[doi:10.18637/jss.v069.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01)>
- Licht LE (1967) Growth inhibition in crowded tadpoles: intraspecific and interspecific effects. *Ecology* 48:736–745
- Ligabue-Braun R, Carlini CR (2015) Poisonous birds: A timely review. *Toxicon* 99:102–108
- Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can J Zool* 68:619–640.
- Lively CM (1986) Predator-induced shell dimorphism in the acorn barnacle *Chthamalus anisopoma*. *Evolution* 40:232–242.
- Maag N, Gehrler L, Woodhams DC (2012) Sink or swim: a test of tadpole behavioral responses to predator cues and potential alarm pheromones from skin secretions. *J Comp Physiol A*, 198:841–846.
- Magarlamov TY, Melnikova DI, Chernyshev AV (2017) Tetrodotoxin producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems. *Toxins*, 5:166.

- Mailho-Fontana PL, Antoniazzi MM, Toledo LF, Verdade VK, Sciani JM, Rodrigues MT, Jared C (2014) Passive and active defence in toads: the parotoid macroglands in *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus*. *J Exp Zool*, 321:65-77.
- Manning MJ, Turner RJ (1976) *Comparative Immunobiology*. Blackie & Son Ltd, Glasgow & London.
- Marquis O, Saglio P, Neveu A (2004) Effects of predators and conspecific chemical cues on the swimming activity of *Rana temporaria* and *Bufo bufo* tadpoles. *Arch Für Hydrobiol* 160:153–170.
- Mazerolle MJ (2015) AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c).R package version 2.0-3.<http://CRAN.Rproject.org/package=AICcmodavg>
- McCall AC, Fordyce JA (2010) Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? *J Ecol* 98:985–992
- McClintock JB, Baker BJ (2001) *Marine chemical ecology*. CRC Press, Boca Raton
- McCollum SA, Van Buskirk J (1996) Costs and benefits of a predator-induced polyphenism in the gray treefrog *Hyla chrysoscelis*. *Evolution*, 50:583-593.
- McDiarmid RW, Altig R (1999) *Tadpoles. The biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, Chicago
- McNamara JM (1987) Starvation and predation as factors limiting population size. *Ecology* 68:1515 –1519.
- Mebis D (2001) Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon* 39:87–96
- Mebis D, Wagner MG, Pogoda W, Maneyro R, Kwet A, Kauert G (2007) Lack of bufadienolides in the skin secretion of red bellied toads, *Melanophryniscus* spp. (*Anura*, *Bufo*), from Uruguay. *Comp Biochem Physiol*, 144:398–402.
- Meng Q, Yau LF, Lu, JG, Wu ZZ, Zhang BX, Wang JR, Jiang ZH (2016) Chemical profiling

- and cytotoxicity assay of bufadienolides in toad venom and toad skin. *J Ethnopharmacol*, 187:74-82.
- Milinski M, Heller R (1978) Influence of a predator on the optimal foraging behavior of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Nature* 275:642–644.
- Milinski M (1997) How to avoid seven deadly sins in the study of behavior. *Adv Study Behav* 26:160-180.
- Moczek AP, Sultan S, Foster S, Ledon-Rettig C, Dworkin I, Nijhout HF, Abouheif E, Pfennig DW (2011) The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. *Proc R Soc B* 278:2705–2713
- Myers JH, Bazely D (1991) Thorns, spines, prickles, and hairs: are they stimulated by herbivory and do they deter herbivores? In: Tallamy DW, Raupp MJ (eds) *Phytochemical induction by herbivores*. Wiley, New York, pp 325-344
- Nekaris KAI, Moore RS, Rode EJ, Fry BG (2013) Mad, bad and dangerous to know: the biochemistry, ecology and evolution of slow loris venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 19:21 (doi: 101186/1678-9199-19-21)
- Nunes AL, Orizaola G, Laurila A, Rebelo R (2014) Rapid evolution of constitutive and inducible defenses against an invasive predator. *Ecology* 95:1520–1530.
- Newman RA (1994) Effects of changing density and food level on metamorphosis of a desert amphibian, *Scaphiopus couchii*. *Ecology*, 75:1085–1096.
- Newman RA (1998) Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia*, 115:9–16.
- Nunes AL, Richter-Boix A, Laurila A, Rebelo R (2013) Do anuran larvae respond behaviourally to chemical cues from an invasive crayfish predator? A community-wide study. *Oecologia* 171:115–127.

- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Sólymos P, Stevens MHH, Wagner H (2015) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pask JD, Cary TL, Rollins-Smith LA (2013) Skin peptides protect juvenile leopard frogs (*Rana pipiens*) against chytridiomycosis. *J Exp Biol* 216:2908-16
- Peluc SI, Sillett TS, Rotenberry JT, Ghalambor CK (2008) Adaptive phenotypic plasticity in an island songbird exposed to a novel predation risk. *Behav Ecol*, 19:830–835.
- Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP (2010) Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol Evol*, 25:459-67
- Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol Evol*, 20:481–486.
- Pigliucci M, Müller GB (2010) *Evolution: The Extended Synthesis*, MIT Press, 2010
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation, *Journal of Experimental Biology*, 12:2362–2367.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2014) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-121, <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Porto AM, Gros EG (1971) Biosynthesis of the bufadienolide marinobufagin in toads *Bufo paracnemis* from cholesterol-20-14C. *Experientia*, 27:506.
- Quagliata S, Malentacchi C, Giachi F, Delfino G (2008) Chemical skin defence in the Eastern fire-bellied toad *Bombina orientalis*: an ultrastructural approach to the mechanism of poison gland rehabilitation after discharge. *Acta Herpetol*, 3:139–153.
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>

- Ramsey JP, Reinert LK, Harper LK, Woodhams DC, Rollins-Smith LA (2010) Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infect Immun*, 78:3981–3992.
- Reading CJ (1990) Palmate newt predation on common frog, *Rana temporaria*, and common toad, *Bufo bufo* tadpoles. *Herpetol J* 1: 462-465.
- Reading CJ, Loman J, Madsen T (1991) Breeding pond fidelity in the common toad, *Bufo bufo*. *J Zool Lond* 225:201–211
- Regueira E, Davila C, Hermilda GN (2016) Morphological changes in skin glands during development in *Rhinella arenarum* (*Anura: Bufonidae*). *Anat Rec* 299:141-156.
- Reiczigel J, Foldi J, Ozsvari L (2010) Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiol Infect*, 138:1674–1678.
- Relyea, RA, Werner EE (1999) Quantifying the relation between predator-induced behavior and growth performance in larval anurans. *Ecology*, 80:2117–2124.
- Relyea RA (2001) Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology* 82:523–540.
- Relyea RA (2002) Costs of phenotypic plasticity. *Am Nat* 159:272–282.
- Relyea RA (2002) Local population differences in phenotypic plasticity: predator-induced changes in wood frog tadpoles. *Ecol Monogr* 72:77–93
- Relyea RA (2003) How prey respond to combined predators: a review and an empirical test. *Ecology* 84:1827–1839.
- Relyea, RA, Hoverman JT (2003) The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia*, 134:596-604.
- Relyea RA (2004) Fine-tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology* 85:172–179.

- Relyea RA, Auld JR (2005) Predator- and competitor-induced plasticity: How changes in foraging morphology affect phenotypic trade-offs. *Ecology* 86:1723–1729.
- Richardson JML (2001) A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators. *Behav Ecol* 12:51–58.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A (2007) A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiologia* 583:43–56.
- Richter-Boix A, Tejedo M, Rezende EL (2011) Evolution and plasticity of anuran larval development in response to desiccation. A comparative analysis. *Ecol Evol* 1:15–25
- Roberts H, Palmeiro BS (2008) Toxicology of aquarium fish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 11:359–374.
- Rodríguez C, Rollins-Smith L, Ibanez R, Durant-Archibold AA, Gutierrez M (2017) Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family *Bufo* (*Amphibia, Anura*). *J Ethnopharmacol*, 198:235-254.
- Rollins-Smith LA (2005) Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integrative and Comp Biol*, 45:137–142.
- Russo J-AR, Yanong RPE (2006) Molds in fish feeds and aflatoxins. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida Fact Sheet FA-95. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu>. Accessed September 14, 2007.
- Santos JC, Tarvin RD, O’Connell LA (2016) A review of chemical defense in poison frogs (*Dendrobatidae*): ecology, pharmacokinetics, and autoresistance, Schulte, B.A., Goodwin, T.E., Ferkin, M.H. (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates* 13, Springer Science + Business Media, New York, pp. 305–337.
- Saporito RA, Donnelly MA, Norton RA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2007) Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8885–8890.

- Scheiner SM, Caplan RL, Lyman RF (1991) The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries. *J Evol Biol*, 4:51–68.
- Scheiner, SM, and Berrigan D (1998) The genetics of phenotypic plasticity. VIII. The cost of plasticity in *Daphnia pulex*. *Evolution*, 52:368–378.
- Schoeppner NM, Relyea RA (2009) Interpreting the smells of predation: how alarm cues and kairomones induce different prey defenses: Unravelling the chemical cues of predation. *Funct Ecol* 23:1114–1121.
- Sciani JM, Angeli CB, Antoniazzi MM, Jared C, Carvalho Pimenta D (2013) Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: A preliminary biochemical delineation. *Sci World J*, 2013:1–9.
- Semlitsch RD, Scott DC, Pechmann JHK (1988) Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, 69:184–192.
- Shimada K, Ohishi K, Fukunaga H, Ro JS, Nambara T (1985) Structure-activity relationship of bufotoxins and related compounds for the inhibition of Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. *J Pharmacobiodyn*, 8:1054–1059.
- Shimada K, Ishii N, Nambara T (1986) Occurrence of bufadienolides in the skin of *Bufo viridis*, LAUR. *Chem Pharm Bull*, 34:3454–3457.
- Shimada K, Sato Y, Nambara T (1987b) Occurrence of marinobufotoxin and telocinobufotoxin homologs in the skin of *Bufo bankorensis*, BORBOUR. *Chem Pharm Bull*, 35:2300–2304.
- Skaug H, Fournier D, Nielsen A, Magnusson A, Bolker B (2013) Generalized Linear Mixed Models using AD Model Builder_. R package version 0.7.5.
- Skelly DK (1995) A behavioral trade-off and its consequences for the distribution of *Pseudacris* treefrog larvae. *Ecology* 76:150–164.
- Skelly DK, Kiesecker JM (2001) Venue and outcome in ecological experiments: Manipulations of larval anurans. *Oikos* 94:198–208.
- Skelly DK, Werner EE (1990) Behavioral and life-historical responses of larval American toads

- to an Odonate predator. *Ecology* 71:2313-2322.
- Smith DC (1987) Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, 68:344–350.
- Steiner UK (2007) Investment in defense and cost of predator-induced defense along a resource gradient. *Oecologia*, 15:201–210.
- Steiner UK, Pfeiffer T (2007) Optimizing time and resource allocation trade-offs for investment into morphological and behavioral defense. *Am Nat* 169:118–129.
- Steiner UK, Van Buskirk J (2007) Environmental stress and the costs of whole-organism phenotypic plasticity in tadpoles. *J Evol Biol*, Volume 21:97–103.
- Sultan SE, Spencer HG (2002) Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *Am Nat* 160:271–283.
- Tempone AG, Carvalho Pimenta D, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, de Andrade HF Jr., Antoniazzi MM, Jared C (2008) Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon* 52:13–21.
- Toledo RC, Jared C, Brunner A (1992) Morphology of the large granular alveoli of toad (*Bufo ictericus*) parotoid glands before and after compression. *Toxicon* 30:745–753.
- Tollrian R, Harvell CD (1999) The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton University Press, Princeton, N.J
- Touchon JC, Jiménez RR, Abinette SH, et al (2013) Behavioral plasticity mitigates risk across environments and predators during anuran metamorphosis. *Oecologia* 173:801–811.
- Ujszegi J, Móricz ÁM, Krüzselyi D, Hettyey A (2017) Skin toxin production of toads changes during early ontogeny but is not adjusted to the microbiota of the aquatic environment. *Evol Ecol* 31: 925–936.
- Urban MC (2007a) Risky prey behavior evolves in risky habitats. *Proc Natl Acad Sci*

- 104:14377–14382.
- Urban MC (2007b) The growth–predation risk trade-off under a growing gape-limited predation threat. *Ecology* 88:2587–2597.
- Urban MC (2008) Salamander evolution across a latitudinal cline in gape-limited predation risk. *Oikos* 117:1037–1049.
- Üveges B., Fera G., Móricz Á.M., Krüzselyi D., Bókony V., Hettyey A. (2017) Age- and environment-dependent changes in chemical defences of larval and post-metamorphic toads. *BMC Evolutionary Biology* 17: 137.
- Van Buskirk J (2000) The costs of an inducible defense in anuran larvae. *Ecology* 81:2813–2821.
- Van Buskirk J (2002) A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: Relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. *Am Nat* 160:87–102
- Van Buskirk J (2014) Incipient habitat race formation in an amphibian. *J Evol Biol* 27: 585–592.
- Van Buskirk J, McCollum SA, Werner EE (1997) Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles. *Evolution* 51:1983–1992.
- Van Buskirk J, Schmidt BR (2000) Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, 81:3009–3028.
- Van Buskirk J, Saxer G (2001) Delayed costs of an induced defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evolution*, 55:821–829.
- Van Buskirk J, Arioli M (2005) Habitat specialization and adaptive phenotypic divergence of anuran populations. *J Evol Biol* 18:596–608
- Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Via S, Lande R (1985) Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic

- plasticity. *Evolution*, 39:505–522.
- Wells KD (2007) The ecology and behavior of amphibian larvae. In: *The ecology & behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago,
- Werner EE, Anholt BR (1993) Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity. *Am Nat* 142:242–272.
- Werner EE, Gilliam JF (1984) The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annu Rev Ecol Syst* 15:393–425.
- Werner EE, Skelly DK, Relyea RA, Yurewicz KL (2007) Amphibian species richness across environmental gradients. *Oikos* 116:1697–1712
- West-Eberhard MJ (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford Univ. Press, 2003.
- Wilbur HM, Collins JP (1973) Ecological aspects of amphibian metamorphosis: nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science*, 182:1305–1314.
- Wilbur HM, Morin PJ, Harris RN (1983) Salamander predation and the structure of experimental communities: Anuran responses. *Ecology* 64:1423–1429.
- Wilson ADM, Krause J (2012) Personality and metamorphosis: Is behavioral variation consistent across ontogenetic niche shifts? *Behav Ecol* 23:1316–1323.
- Woodhams DC, Rollins-Smith LA, Carey C, Reinert L, Tyler MJ, Alford RA (2006) Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia* 146:531–540
- Zuur AF, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed effects models and extensions in ecology with R*, 1st edn. Springer, New York

A doktori értekezés alapját képező publikációk listája

- TÓTH, Z.†, KURALI, A.†, MÓRICZ, Á., HETTYEY, A. 2018. Changes in toxin quantities following experimental manipulation of toxin reserves in *Bufo bufo* tadpoles. Journal of Chemical Ecology, bírálólat alatt.
- KURALI, A., PÁSZTOR, K., HETTYEY, A., TÓTH, Z. 2018. Resource-dependent temporal changes in anti-predator behavior of common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. Behavioral Ecology and Sociobiology, 72:91 (online publikálva: DOI: 10.1007/s00265-018-2503-9)
- KURALI, A., Pásztor, K., HETTYEY, A., TÓTH, Z., 2016. Toxin depletion has no effect on antipredator responses in common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. Biological Journal of the Linnean Society, 119: 1000-1010.
- BÓKONY, V., MÓRICZ, Á., TÓTH, ZS., GÁL, Z., KURALI, A., MIKÓ, ZS., PÁSZTOR, K., SZEDERKÉNYI, M., TÓTH, Z., UJSZEGI, J., ÜVEGES, B., KRÜZSELYI, D., CAPON, R.J., HOI, H., HETTYEY, A. 2016. Variation in chemical defense among natural populations of common toad (*Bufo bufo*) tadpoles: the role of environmental factors. Journal of Chemical Ecology, 42: 329-338.

Konferencia absztraktok

- KURALI, A., MÓRICZ, Á., HETTYEY, A., TÓTH, Z., 2018 A méreganyagok újratermelődése a méregtartalékok mesterséges ürítése után barna varangy ebihalaknál. Magyar Etológiai Társaság XIX. Kongresszusa, Budapest
- HETTYEY, A., NAGY, G., TÓTH, Z., KURALI, A., PÁSZTOR, K., URSZÁN, T., BÓKONY, V., HERCZEG, G., 2014. Tracking behaviour in a large number of experimental units. Measuring Behaviour, Wageningen (Hollandia)
- KURALI, A., PÁSZTOR, K., HETTYEY, A., TÓTH, Z., 2014. Resource-dependent temporal changes in anti-predator behaviour of common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. VII European Conference of Behavioural Biology, Prága (Csehország)
- KURALI, A., PÁSZTOR, K., TÓTH, Z., 2014. Ragadozó által indukált fenotípusos plaszticitás költségeinek vizsgálata barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalakon 5. Kvantitatív Ökológiai Szimpózium, Tihany
- KURALI, A., PÁSZTOR, K., HETTYEY, A., TÓTH, Z., 2014. Ragadozó indukált

fenotípusos plaszticitás költségeinek becslése barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalakban, különös tekintettel a méregtermelésre. IV. MME KHVSZ Herpetológiai Előadói Ülés, Budapest

KURALI, A., PÁSZTOR, K., TÓTH, Z., 2013. Ragadozó indukált fenotípusos plaszticitás költségeinek becslése barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalakban, különös tekintettel a méregtermelésre. Magyar Etológiai Társaság XV. Kongresszusa, Budapest

KURALI, A., PÁSZTOR, K., TÓTH, Z., 2013. Assessing the costs of plasticity in chemical defences in common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. SEH 2013-17th European Congress of Herpetology, Veszprém

PÁSZTOR, K., KURALI, A., TÓTH, Z., 2013. Testing new methods to extract skin toxins from common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. SEH 2013-17th European Congress of Herpetology, Veszprém

Összefoglaló

A kémiai védekezés gyakori jelenség a természetben, arról viszont igen keveset tudunk, hogy a fenotípusos plaszticitás a méregtermelésre képes állatfajok esetében kiterjed-e a kémiai védekezésre, és ha igen, akkor mely környezeti tényezők indukálják a változást, és milyen járulékos költségei lehetnek. A kételtűek a plaszticitás kutatásának jellemző modellorganizmusai, ezen vizsgálatok egy jelentős része a plaszticitás egyik legalapvetőbb formáját, a ragadozók elleni védekezési mechanizmusokat és hátterüket igyekszik feltárni, azonban ezek egy része egymásnak ellentmondó eredményeket és konklúziókat mutat be a témával kapcsolatban. A különböző kísérletek eredményeinek összehasonlításakor megfigyelhető változatosságnak az egyik oka az ebihalak kora, mint potenciális befolyásoló tényező figyelmen kívül hagyása lehet. A kémiai védekezés sok kételtűfaj esetében képezi fontos részét a ragadozók elleni védekezésnek, a méregtermelés idő- és energiaigényéről azonban igen keveset tudunk, pedig az állatok számára létfontosságú kérdés lehet, hogy egy ragadozó-, vagy egyéb stresszhelyzet indukálta méregleadás után mennyi idővel válnak ismét védetté. Kísérleteink célja tehát a kételtű lárvák indukált védekezésének, elsősorban a viselkedést és méregtermelést befolyásoló tényezők, a plaszticitás mértékének és az ehhez köthető költségek és korlátok vizsgálata volt.

A fenti kérdésekre barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalakon végzett laboratóriumi kísérletek és egy terepi vizsgálat keretében kerestük a választ. Teszteltünk egy olyan kéméletes, *in vivo* módszert, mely lehetővé teszi a méregkivonás után az állatok további vizsgálatát. Ezzel a módszerrel később vizsgáltuk a bőrben termelt mérgek mesterségesen indukált leadását követően a mérgeanyagok újratermelődésének sebességét, ahol az indukált méregleadást követően 12 óra elteltével az eredeti, kezeléseket előtti mennyiségi viszonyok helyreállnak az ebihalakban. Ez vagy extrém gyors mérge-újratermelődést, vagy, ami valószínűbb, a komponensek egymásba való átalakulását feltételezi. Továbbá eredményeink hangsúlyozzák, hogy az összetett mérgekeverékeket szintetizáló fajoknál a termelt komponensek számának és teljes mérge mennyiségnek az elemzése önmagában, funkcionális alcsoportok figyelembe vétele nélkül elfogult következtetéseket vonhat maga után. A kémiai védekezés lehetséges költségeit és egyéb, ragadozók elleni védelmi mechanizmussal való csereviszonyát is vizsgáltuk, melyben a ragadozók elleni adaptív válasz megmutatkozott bizonyos életmenet jellemzőkben, mely forrásszegény környezetben fitness költségeket vont maga után. Ezt az összefüggést azonban a méregraktárak manipulálása nem befolyásolta, ami arra utal, hogy a bufadienolidok megtermelésének költsége elenyésző. A Pilis-Visegrádi hegységben és a Bécsi erdőben

található kisvizek vizsgálata volt az első olyan tanulmány, mely bizonyítja a földrajzi változatosság meglétét olyan kételtűek kémiai védekezésében, melyek *de novo* maguk termelik mérgeiket. Az ebihalakban általunk mért mérge mennyiség a tavak között nagymértékben eltért, és a komponensek száma ugyancsak különbözött az ausztriai és a magyarországi mintavételi területek között; azonban a tavak közötti szignifikáns különbség a tavak közötti távolságtól függetlennek bizonyult. A predációs nyomásnak nem volt befolyása az ebihalakban termelt mérge mennyiségre, viszont eredményeink alátámasztották a korábbi feltételezéseket, miszerint a barna varangy ebihalak mérgetermelésüket a környezetükben előforduló versenytársak denzitásához igazítják. Egy labor kísérletben ebihalak viselkedésének ismételt megfigyelésével kimutattuk, hogy a ragadozó-elkerülő és a táplálkozási viselkedés csereviszonya az életkorral jelentősen változik, mely felhívja a figyelmet annak fontosságára, hogy a kort, mint faktort figyelembe kell venni a korai életszakaszban végzett viselkedéssel kapcsolatos vizsgálatokban, hiszen egy adott korban mért válaszból nem általánosíthatunk a lárvakori egyedfejlődés egészére.

Eredményeink rámutatnak, hogy a természetben a környezet sokféleségének megfelelően a kémiai védekezés egy fajon belül is igen változatos lehet, továbbá hogy a környezeti tényezőkre adott plasztikus válasz az életkorral jelentősen megváltozhat. A barna varangy ebihalak esetében a ragadozók jelenlétében kifejezett kémiai védekezésnek feltehetően van konstitutív (vizsgálataink eredményei) és indukálható (Üveges *et al.* 2017) komponense is, továbbá nem jár jelentős előállítási költségekkel. Azt is kimutattuk, hogy a versenytársak jelenléte természetes környezetben erős befolyással lehet a barna varangy ebihalak mérgetermelésére. Közelebb kerültünk annak megértéséhez, hogy a környezeti tényezők interakciója hogyan alakítja együttesen a ragadozó-indukált védekezést az olyan komplex életmenettel rendelkező fajokban, melyeknek az ellenségeik elleni védelmi mechanizmusai is rendkívül összetettek. Ezen ismeretek segítségével pontosabb képet kaptunk arról, hogy a természetes szelekció miként hathat a plasztikus jellegek kialakulására és fennmaradására természetes populációkban.

Summary

Chemical defense is a common phenomenon in nature, but very little is known about its plasticity, especially in poisonous animals, and about the key factors influencing variation in chemical defence. Amphibians are common model organisms of plasticity research targeting a deeper understanding of inducible defenses, and of how environmental factors mediate such responses. Predator-induced defences have been in the focus of evolutionary ecology research for decades, but results often remained contradictory, perhaps because the ontogenetic context was ignored. Chemical defence is an important part of the anti-predatory defense in many amphibian species. However, information about the time and energy requirements of poison production has remained scarce, even though these are crucially important factors for prey fitness. The aim of our study was to investigate inducible defenses in common toad tadpoles, especially the factors affecting behavior and toxin production, the degree of plasticity and the costs and constraints related to it.

We approached these questions by performing both laboratory tests and field studies on common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. We tested a semi-invasive method for inducing toxin release, which allows the further examination of the animals after the intervention. With the same method we investigated toxin replenishment rate following induced toxin release and observed that the replenishment of toxins in the skin glands is a very rapid process. This suggests either extreme rapid poison reproduction, or, more likely, the conversion of components to each other. Our results also emphasize that in species that synthesize deterrent blends consisting of various toxic compounds, the analysis of the number and total quantity of produced chemicals, in itself, may lead to biased conclusions about the mode of action in the studied defence mechanism. Moreover, when testing for potential costs of chemical defence and for its interaction with other defensive mechanisms, we observed adaptive responses to predators in some life-history traits that were linked to fitness costs when food was scarce. However, this relationship was not influenced by the manipulation of the skin glands, suggesting that costs related to bufadienolid production is negligible. In a field survey, where we investigated toxin content of toad tadpole populations in small ponds in the Pilis-Visegrádi hills (Hungary) and in the Wienerwald (Austria), the average number of compounds found in tadpoles significantly differed between Hungary and Austria, but significant variation among ponds appeared irrespective of their spatial distance. Moreover, we observed no effect of predation pressure, but a clear relationship between competitor density and toxin content of tadpoles. This result supports our previous hypothesis that poison production in common toad

tadpoles has a constitutive component, regardless of the actual predation pressure (but see Üveges *et al.* 2017). In another laboratory-based experimental study we demonstrated that behavioural responses to environmental factors, such as predation threat and food availability, vary with tadpole age. These results draw attention to the importance of considering age when studying behavioral responses to environmental change, and provide a possible explanation for some inconsistencies in the relevant literature.

Our studies indicated that significant intraspecific variation in defensive chemicals can exist also in vertebrates, and that this variation may be influenced by environmental heterogeneity. Also, our results demonstrated that plastic defensive responses can significantly change with age. In common toad tadpoles, chemical defence against predators has both a constitutive and a plastic component. Toxin production does not involve significant production costs, but the presence of competitors might be an important influencing factor in natural populations. The novel results obtained in our studies provide additional insights about how natural selection affects the evolution and maintenance of plasticity in natural populations.

1. melléklet. Lineáris kevert modellek (LMM) minden bufadienolid komponensre, ahol a kezelések közötti variancia-különbségekre kontrolláltunk. Az arenobufagin és az 1. és 3. ismeretlen komponens nem lett külön elemezve, ezért a táblázatban nem szerepelnek. A végső modelleket vastag betűvel jelöltem. A random hatásokat $SD \pm 95\%$ konfidencia intervallumokkal vannak megadva.

Komponens	Transzform.	Random hatás (family)	Függő változó	χ^2	df	P-érték
Bufotalin	rank(x)	45.82 [28.10-74.73]	Intercept	0.02	1	0.887
			Száraz tömeg	21.15	1	<0.001
			Mintavétel	46.01	6	<0.001
			Kezelés	23.39	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	35.43	18	0.008
Marinobufotoxin	rank(x)	55.32 [34.19-89.51]	Intercept	48.95	1	<0.001
			Mintavétel	23.17	6	0.001
			Száraz tömeg	0.02	1	0.879
			Kezelés	5.95	3	0.114
			Mintavétel × Kezelés	27.76	18	0.066
Ism. komponens 2	sqrt(x)	1.26 [0.74-2.14]	Intercept	54.55	1	<0.001
			Száraz tömeg	25.57	1	<0.001
			Mintavétel	23.57	6	0.001
			Kezelés	25.34	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	50.26	18	<0.001
Ism. komponens 4	rank(x)	30.33 [17.54-52.46]	Intercept	46.15	1	<0.001
			Száraz tömeg	6.22	1	0.013
			Mintavétel	64.89	6	<0.001
			Kezelés	1.05	3	0.789
			Mintavétel × Kezelés	22.91	18	0.194
Ism. komponens 5	log(x)	0.24 [0.14-0.38]	Intercept	557.85	1	<0.001
			Száraz tömeg	7.21	1	0.007
			Mintavétel	34.53	6	<0.001
			Kezelés	20.06	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	39.66	18	0.002
Ism. komponens 6	-	48.42 [29.94-78.32]	Intercept	14.88	1	<0.001
			Mintavétel	25.24	6	<0.001
			Száraz tömeg	0.92	1	0.338
			Kezelés	2.61	3	0.455
			Mintavétel × Kezelés	17.04	18	0.520
Ism. komponens 7	sqrt(x)	1.57 [0.93-2.68]	Intercept	18.77	1	<0.001
			Száraz tömeg	28.44	1	<0.001
			Mintavétel	27.58	6	<0.001
			Kezelés	17.90	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	39.74	18	0.002
Ism. komponens 8	sqrt(x)	0.33 [0.19-0.59]	Intercept	15.16	1	<0.001
			Száraz tömeg	15.98	1	<0.001
			Mintavétel	50.81	6	<0.001
			Kezelés	14.20	3	0.003

			Mintavétel × Kezelés	38.20	18	0.004
Ism. komponens 9	rank(x)	34.82 [20.85-58.15]	Intercept	4.57	1	0.033
			Száraz tömeg	18.49	1	<0.001
			Mintavétel	102.35	6	<0.001
			Kezelés	3.33	3	0.344
			Mintavétel × Kezelés	26.98	18	0.079
Ism. komponens 10	-	27.34 [16.72-44.71]	Intercept	331.96	1	<0.001
			Mintavétel	100.28	6	<0.001
			Száraz tömeg	3.10	1	0.078
			Kezelés	3.45	3	0.328
			Mintavétel × Kezelés	15.34	18	0.638
Ism. komponens 11	-	1203.51 [751.18-1928.19]	Intercept	38.13	1	<0.001
			Mintavétel	19.82	6	0.003
			Kezelés	20.97	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	29.80	18	0.039
			Száraz tömeg	0.60	1	0.438
Ism. komponens 12	sqrt(x)	5.47 [3.38-8.83]	Intercept	75.53	1	<0.001
			Mintavétel	6.00	6	0.423
			Kezelés	28.54	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	37.84	18	0.004
			Száraz tömeg	1.97	1	0.160
Ism. komponens 13	-	392.16 [241.34-637.25]	Intercept	64.61	1	<0.001
			Mintavétel	41.00	6	<0.001
			Kezelés	18.48	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	30.92	18	0.029
			Száraz tömeg	0.23	1	0.630
Ism. komponens 14	sqrt(x)	6.74 [4.15-10.95]	Intercept	208.48	1	<0.001
			Mintavétel	24.96	6	<0.001
			Kezelés	22.91	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	31.99	18	0.022
			Száraz tömeg	0.58	1	0.448
Ism. komponens 15	-	76.36 [45.71-127.56]	Intercept	98.74	1	<0.001
			Mintavétel	33.72	6	<0.001
			Kezelés	30.43	3	<0.001
			Mintavétel × Kezelés	46.11	18	<0.001
			Száraz tömeg	0.76	1	0.383
Ism. komponens 16	-	36.86 [23.01-59.05]	Intercept	24.46	1	<0.001
			Száraz tömeg	4.56	1	0.033
			Mintavétel	31.64	6	<0.001
			Kezelés	8.33	3	0.040
			Mintavétel × Kezelés	17.52	18	0.487
Ism. komponens 17	sqrt(x)	8.28 [5.14-13.34]	Intercept	127.53	1	<0.001
			Mintavétel	21.46	6	0.002

		Száraz tömeg	1.46	1	0.227
		Kezelés	1.08	3	0.783
		Mintavétel × Kezelés	26.25	18	0.094
Ism. komponens 18	-				
			646.48 [401.49-		
			1040.97]		
		Intercept	69.76	1	<0.001
		Mintavétel	33.34	6	<0.001
		Kezelés	24.17	3	<0.001
		Mintavétel ×	32.46	18	0.019
		Kezelés			
		Száraz tömeg	0.89	1	0.347

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Kurali Anikó

MTMT-azonosító: 10038768

A doktori értekezés címe és alcíme: Ragadozó-indukált plasztikus válaszok barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalak kémiai védekezésében és viselkedésében

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2018.240

A doktori iskola neve: ELTE Biológiai Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Zootaxonómia, Állatökológia, Hidrobiológia

A témavezetők neve és tudományos fokozata: Hettyey Attila PhD és Tóth Zoltán PhD

A témavezetők munkahelye: Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport, MTA ATK NÖVI

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2018.11. 22.

.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása