Biológia doktori iskola

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Ökológia konzervációbiológia és szisztematika doktori program

Programvezető: Dr. Podani János

A nyugati pikkelypáfrány (*Asplenium ceterach ssp. ceterach*) fragmentált populációjának térbeli genetikai szerkezete RAPD polimorfizmus vizsgálat alapján

- a doktori értekezés tézisei-

Krízsik Virág

Témavezető: Dr. Vida Gábor

Az MTA rendes tagja

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

2011

Bevezetés, a dolgozat célkitűzései

A populáció szintű folyamatok modelljéül a nyugati pikkelypáfrány (*Asplenium ceterach* L. ssp. *ceterach*) egy kiválasztott populációja szolgált. Ez a tetraploid citotípus hazánkban ritka, egyik előfordulása a Dunántúli-középhegység részét képező Szent György-hegy. A tetraploid alfaj néhány populációja a jégkorszak utáni felmelegedéssel párhuzamos migrációs folyamatok eredményeként jelent meg a Kárpát-medencében. Kloroplasztisz és nukleáris szekvencia vizsgálatok összevetése alapján a tetraploidoknak egyik Kárpát-medencei diploid populáció sem lehetett a progenitora, hanem azok egymástól függetlenül, távolabbi forrásokból telepedhettek be ezekre az élőhelyekre. A magyarországi diploid és tetraploid *Asplenium ceterach* populációk genetikai mintázatát vizsgálva megállapították, hogy a tetraploid pikkelypáfrány populációk genetikailag nem változatosak, a populációkon belül az izoenzim mintázatok fixációja tapasztalható, a genetikai variancia jelentős része a populációk között oszlik meg. Ezekben a vizsgálatokban nem sikerült kimutatni a populációk között a genetikai változatosság és a földrajzi távolság összefüggését, azonban feltételezték, hogy finomabb léptékben vizsgálva ez az összefüggés megtalálható. Erre a feltevésre kerestem a választ a populáción belüli térbeli genetikai változatosság vizsgálatával.

A Szent György-hegyen, annak jellegzetes geomorfológiai alegységei révén, a populáció térbeli genetikai szerkezete az élőhely térbeli tagoltsága közötti összefüggések jól vizsgálhatóak. A tér pontjai kettéoszthatóak az egyed számára alkalmas és alkalmatlan helyekre. Az alkalmas helyek kiterjedése és távolsága változatos. A génáramlás várhatóan akadályozott az alpopulációk között és az alpopulációkon belül, azok geomorfológiai alegységei között is. Ez a hierarchikus térszerkezet a genetikai mintázatban is megjelenhet.

A természetvédelmi és ökológiai vizsgálatoknak sokszor olyan fajok a célpontjai, amelyekről nem áll rendelkezésre előzetes genetikai információ, vagy alkalmas, a fajon belüli sokféleséget tükröző speciális genetikai marker. A vizsgálat során ezért esett a választás a variábilis és nem faj specifikus RAPD marker alkalmazására. További nehézséget okozott, hogy a domináns markerekkel előállított adatok populáció genetikai elemzése eddig csak diploid populációkra megoldott, ezért az adatok földolgozása során elsősorban a többváltozós és a térbeli statisztika módszereit használtam.

Célkitűzések:

A populáción belüli genetikai mintázat vizsgálata során a következő kérdésekre kerestem a választ:

▪ A populáció egy genetikai egységnek tekinthető-e?

▪ Az élőhelyen elkülönülő foltjaiban élő egyedek között kimutatható-e intenzív géncsere?

▪ Egy genetikai változó térbeli mintázatában kimutatható-e autokorreláció?

▪ Milyen a populáción belül a genetikai hasonlóság eloszlása, és az alapján vannak-e elkülönülő egyedcsoportok?

▪ Milyen a populációban az egyedek multilókusz-fenotípus eloszlása?

▪ Az egyedek multilókusz-fenotípusában az egyes genetikai változók egymástól függetlenül jelennek-e meg?

▪ Hogyan változik az átlagos genetikai hasonlóság a geomorfológiai alegységeken belül?

▪ Kimutatható-e térbeli autokorreláció az egyedek átlagos genetikai hasonlóságában?

▪ Ha igen, akkor változik-e az autokorreláció erőssége a térbeli iránnyal összefüggésben?

▪ A RAPD polimorfizmus felhasználható-e genetikai markerként a térbeli genetikai elemzések során?

Az alkalmazott módszerek

1. A terepi mintavétel és az egyedek térbeli koordinátái

A vizsgálatba vont négy déli, két keleti és egy nyugati alpopulációból 437 egyedből álló mintát vettem. Az egyedek pozíciójának rögzítését GPS készülék segítségével végeztem. A különálló foltok térbeli helyzetét 11 referencia pont segítségével adtam meg. A GPS koordináták és magasság értékek a megfelelő módszerrel EOV koordinátákká és DTM magasság értékekké konvertálhatóak. Miután a GPS koordináták elhelyezték a foltokat egymáshoz képest a térben, az egyedek pontos helyzete már kiszámolható volt. Ebből kaptam meg az egyed pozíciók 3D-s hálózatát.

2. Laborvizsgálatok

A teljes növényi DNS kivonását DNeasy Plant Mini Kit-tel végeztem. A DNS izolátumok koncentrációját referencia DNS-ből készített hígítási sor segítségével határoztam meg. A PCR reakciók 10bp-os véletlen primerekkel készültek (OPA-7, OPA-19, OPB-18, OPK-9, OPK-19, OPP-4, OPP-5, OPP-14). Primerenkénti átlagban 2.6 sávot vontam be az elemzésekbe. Végül 21 bináris változó (RAPD lókusz) állt rendelkezésre az egyedek multilókusz-fenotípusának megadásához.

3. A genetikai hasonlóság számolása

Az egyedek genetikai hasonlóságát a polimorf sávokból adódó RAPD molekuláris multilókusz-fenotípus alapján becsültem. Ehhez az egyezési koefficienst és a Nei és Li féle koefficiens használtam.

4. Az alkalmazott statisztikai módszerek

▪ *Az egyedek térbeli mintázata*

Az egyedek koordinátái alapján kiszámolható a páronkénti euklideszi távolság a valós térben. Ebből a távolság mátrixból megadható az egyedek közötti távolságok gyakorisági eloszlása hisztogram formájában.

▪ *A populáció genetikai szerkezete*

Elkészült az egyedek 21 RAPD változó szerinti centrált főkomponens analízise (PCA). Az összehasonlításhoz a főkomponens analízist az oszloponként permutáltatott adatmátrixon is megismételtem.

Összehasonlítottam egyrészt a populáció eredeti adatmátrixából és a változókon belül randomizált adatmátrixból számolt genetikai távolságok gyakorisági eloszlásait, másrészt a két adatmátrix alapján készült dendrogramokat.

Elkészítettem a populáció multilókusz-fenotípus eloszlását. Az azonos fenotípusú egyedek csoportméretei összehasonlíthatóak az adatok ismételt randomizációi során kapott csoport méretekkel.

Az adatmátrix alapján $\chi 2$-tesztel vizsgáltam, hogy a változók fenotípusai páronként függetlenül jelennek-e meg a multilókusz fenotípusokban.

▪ *A genetikai változók térbeli mintázata*

Illeszkedésvizsgálattal ellenőriztem az egyes változók alpopulációk közötti egyenlőtlen megoszlását.

Arányra vonatokozó próba segítségével összehasonlítottam az azonos fenotípusú egyedek és az összes egyed között mérhető térbeli távolságok gyakorisági eloszlását.

Elkészültek az egyes változók variogramjai is.

▪ *Hasonlósági csoportok térbeli mintázata*

A Nei és Li féle koefficienssel számolt dendrogram alapján meghatároztam a genetikailag azonos, 0.15 és 0.4 hierarchikus szint alatt egy osztályba tartozó egyedek csoportjait. Összehasonlítottam a különböző szintű hasonlóságok alapján egy osztályba sorolt egyedek között mérhető térbeli távolságok gyakorisági eloszlásait az összes egyed esetén kapott eloszlással. Az egy alosztályokba tartozó egyedek térbeli helyzetét az első két koordináta tengely mentén (vízszintes sík) ábrázoltam.

▪ *A térbeli és genetikai távolság kapcsolata*

Kiszámoltam az egyre kisebb térbeli kiterjedésű geomorfológiai alegységek egyedei közötti mérhető genetikai távolságok gyakorisági eloszlásait és azok átlagát.

Mann-Whitney teszttel összehasonlítottam a szomszédos és a populációból véletlenszerűen kiválasztott egyedek között mérhető genetikai távolságok átlagát (gyakorisági eloszlását).

Az egyedek közötti átlagos genetikai távolság térbeli autokorrelációját variogram segítségével becsültem, az egyedek között mért távolságok irányától függetlenül. Emellett elkészítettem az északkeleti és délkeleti irányok direkcionális variogramjait is. Wilcoxon-tesztel vizsgáltam a genetikai távolság és az 1m-en belüli térbeli távolságvektor meredekségének kapcsolatát.

A populációfoltok földrajzi és genetikai távolságai közötti korreláció vizsgálata Mantel-teszttel történt.

Eredmények

▪ *A populáció genetikai szerkezete*

Az centrált főkomponens analízis (PCA) eredményét bemutató szórásdiagrammon az egyedek egységes pontfelhőként jelennek meg és nem alkotnak elkülönülő csoportokat. Azonban a pontfelhőn belül a különböző alpopulációkba tartozó egyedek az első komponens mentén láthatóan szétválnak.

A genetikai távolságok eredeti és a randomizált adatmátrixból számolt gyakorisági eloszlásai annyiban térnek el egymástól, hogy a permutáció következtében a közepes távolságértékek gyakorisága megnőtt a kisebb és a nagyobb távolságok rovására.

A randomizált adatok dendrogramjaival összehasonlítva, az eredeti adatok dendrogramján jobban elkülönülő alosztályokat találunk, tehát vannak a populációban hasonlóság alapján elváló egyedcsoportok.

A multilókusz-fenotípus eloszlásokban előforduló nagyobb klaszter méretek és azok nagyobb gyakoriságai mutatják, hogy az egyedekben a sávok jelenléte nem független egymástól. Bár a multilókusz-fenotípus csoportok alapján sem osztható a populáció alegységekre, de a 237 egyedi multilókusz-fenotípus között gyakran csak 1-2 változó értéke a különbség.

A multilókusz fenotípusokban a gyakori változók megjelenése nem független egymástól.

▪ *A genetikai változók térbeli mintázata*

A változónkénti fenotípusok alpopulációk közötti megoszlása a lókuszok többsége esetén a várt fenotípus gyakoriságtól szignifikáns eltérést mutatott.

Az egyes változók kétféle fenotípusa közül legalább az egyik términtázatára igaz, hogy az azonos fenotípusú egyedek gyakrabban vannak 100m-nél közelebb egymáshoz mint, azt a véletlen alapján várnánk.

A változónkénti variogrammok közül egyik sem mutatott térbeli autokorrelációt.

▪ *Hasonlósági csoportok térbeli mintázata*

Az azonos és nagyon hasonló multilókusz-fenotípusú egyedek között mérhető leggyakoribb távolság kisebb, mint 10m. Ez annál kifejezettebb minél nagyobb az egyedek genetikai hasonlósága.

▪ *A térbeli és genetikai távolság kapcsolata*

Az alegységek egyedeinek genetikai távolságát becsülve azok átlaga az egyre kisebb térbeli kiterjedésű geomorfológiai alegységen belül fokozatosan csökken.

A szomszédos egyedek átlagos genetikai távolsága szignifikánsan kisebb, mint az egész populációra vonatkozó érték.

A Mantel-teszt alapján az alcsoportok között a genetikai és térbeli távolság összefüggése mindkét hasonlósági együtthatóval a véletlentől szignifikáns eltérést mutatott.

Az alpopulációkon belüli térbeli autokorreláció pontosabb elemzése kimutatta, hogy kisebb térbeli távolság esetén a genetikai távolság is lecsökkent. Az összes alpopuláció adataiból készült variogramon, az adatok teljes varianciájának 29-30%-a mutatott térben autokorrelált mintázatot. A számolt hatástávolság 11m - 13m.

Az irányított variogramok összehasonlítása alapján a két irányban mérhető átlagos genetikai különbségek szemmel látható eltérést nem mutatnak.

A Wilcoxon teszt alapján, az 1m-en belüli szomszédok genetikai távolsága szignifikánsan kisebbnek bizonyult, ha őket 75°-nál meredekebb távolságvektor kötötte össze.

Következtetések

A populáció genetikai összetétele:

A populáción belüli genetikai mintázat alakításában az előtelepek között vagy az előtelepen belül végbemenő termékenyülés az egyik legmeghatározóbb lépés. Az öntermékenyülésből adódóan az egyedek közötti genetikai hasonlóság alapján a dendrogramokon vannak elváló egyedcsoportok. Szintén a gyakori öntermékenyülés jelenlétét bizonyítja, hogy a multilókusz-fenotípusokban a gyakori változók megjelenése páronként nem független egymástól és a populációban több azonos multilókusz-fenotípusú egyed található, mint azt a lókuszok véletlen kombinációja alapján várnánk.

Emellett a ritka idegentermékenyülés szerepét bizonyítja, az egyedi multlókusz-fenotípusok jelenléte, és hogy az egyedek közötti genetikai hasonlóság alapján az elváló egyedcsoportok nem izolált leszármazási vonalak, ami az intragametofítikus öntermékenyülés kizárólagossága esetén várható lenne.

A kolonizáló spóráknak több független forrása lehetett, mivel a véletlentől eltérő genetikai szerkezet kialakításában a különböző genotípusok betelepülése nélkülözhetetlen.

A populáció térbeli genetikai mintázata

A genetikai términtázat dinamikus változásában a spóraszórás központi szerepet tölt be. A hatótávolsága és a szórt spórák tömegessége meghatározza a szülők és utódaik közötti távolságot és ez által a genetikai és térbeli távolság összefüggését is. A populációban egy változó mintázata a spóraszórás eredményét mutatja vagyis, hogy milyen messze juthat el egy marker a populáción belül. Ez számos nemzedéken (termékenyülés, spóraképzés) keresztül változatlanul adódik át, és megjelenik a fenotípusban.

Egy kivételtől eltekintve minden RAPD marker megtalálható mindegyik, nagy mintaelem számú alpopulációban (gyakoriak, ritkák egyaránt). A spórák tehát eljutnak minden foltba, maga a spóra elterjedése nem akadálya a véletlen mintázat létrejöttének. A térben fragmentált populáció egyedei egy genetikai egység részét képezik. Emellett a fenotípus gyakoriságok alpopulációk közti eloszlása szignifikáns eltérést mutat, tehát a spórák nagyobb távolságokra csökkenő eséllyel jutnak el.

Az alpopuláció foltokon belül a térbeli autokorrelációt mutató mintázat szintén bizonyítéka az előtelepen belüli öntermékenyülésnek. A térben autokorrelált változatosságnak a hatástávolsága 11-13m, ilyen távolságra jut el a multilókusz-fenotípus nagyobb változások nélkül. Az azonos multlókusz-fenotípusok között leggyakrabban mérhető térbeli távolság is ennek megfelelő. Ez jóval kisebb, mint a markerek „megtette” távolság, ugyanis több változó együttes jelenlétét és terjedését a térben az előtelepeken belüli vagy közöttük lejátszódó termékenyülés jelentősen befolyásolja. Tehát az, hogy a multilókusz-fenotípusok hasonlósága a távolsággal csökken, mutatja, hogy az előtelepek között időről-időre bekövetkezik az ivarsejtek egyesülése és a genetikai markerek rekombinációja.

Bár a szoros genetikai kapcsolat többnyire a térben közeli egyedek között áll fönn, mégis alkalmanként előfordulnak azonos multilókusz-fenotípusú egyedek egymástól távol, külön foltokban, vagy éppen igen eltérő egyedek egy repedésben. A spóra ritka, nagy távolságú szóródása által távolra eljutó egyed elkerüli a több nemzedék alatt nagyobb valószínűséggel bekövetkező előtelepek közötti termékenyülést. (Vagyis a multlókusz-fenotípusok változások nélkül nagy távolságra elsősorban 1 lépésben spórával jutnak el .)

A nem foltos, de térben autokorrelált mintázat, a tömegesen kis távolságon belülre jutó spórák és a kifejlődő előtelepeken lezajló termékenyülési folyamatok eredményeként alakul ki. Ahhoz, hogy hatása a térbeli genetikai mintázatban mérhetően megjelenjen, az előtelepen belüli öntermékenyülésnek gyakrabban kell bekövetkeznie, mint az előtelepek közötti idegentermékenyülésnek.

Az egyedek genetikai hasonlósága összefüggést mutat az élőhely geomorfológiai alegységeivel. A nagyobb geomorfológiai képződmények lehatárolják az élőhely kisebb egységeit, akadályozva onnan a spórák kijutását. Ez növeli a belterjességet hiszen, ezáltal az intergametofítikus termékenyülés fokozott valószínűséggel játszódik le a rokonok között. Az élőhely legkisebb geomorfológiai képződményeinek (sziklafelület, sziklarepedés) térbeli kiterjedése 0.5-5m-nyi, amin belülre esik az egyedek közötti genetikai változatosság szoros autokorrelációt mutató hányada. Az előtelepek öntermékenyülése a spóraszórás térbeli dinamikája és az élőhely geomorfológiai adottságai együtt alakítják ki a genetikai és térbeli hasonlóság közötti szoros korreláció viszonylag kis hatótávolságát. Az azonos multilókusz-fenotípusok legnagyobb, 13 tagú csoportja a legnagyobb összefüggő, megmintázott sziklafelületen található. Ennek megfelelően itt több, 2-13 tagú multlókusz-fenotípus csoportot is találunk.

A térszerkezet szempontjából a tömeges események a meghatározóak, azonban a genetikai változatosság biztosításában a ritkább események is jelentősek lehetnek. A előtelepeken belül gyakori öntermékenyülés biztosítja a független lókuszok együttes öröklődését, de a ritka eseményeknek, a kis gyakorisággal bekövetkező idegentermékenyülésnek köszönhetően, a mintázat jelentős hányada véletlenszerű. Hasonlóképpen a tömeges rövid távolságú spóraszórást időnkénti nagy távolságú diszperzió kíséri.

A páfrány populáció genetikai términtázatát vizsgálva fontos látni, hogy a széllel nagyobb távolságokra eljutó propagulumok csak kisebb hányadát képezik az egész spóratömegnek. A direkcionális variogramok nem jeleztek az elterjedésben az égtájak szerint lényegi különbséget (pl. légmozgás szerepe). Ez különösen a 100m-en belüli távolságok esetén fontos, mivel az eltérés hiánya azt bizonyítja, hogy az alpopulációkon belüli autokorrelált mintázatot nem az élőhely heterogenitása (pl. lejtő), vagy az abiotikus terjesztő közeg hatása hozza létre. Az ilyen jellegű eltérés kialakításában a széliránynak kiemelt szerepe lehetne, de a nagy távolságú terjedés hatása éppen ritkaságának okán, nem jelenik meg a variogramokkal mérhető módon. Azonban mint kis gyakoriságú esemény,

alkalmanként bekövetkezve, a távoli populációfoltok közötti géncserében fontos szerepet játszik.

A spóra másik terjesztő közege az esővíz, csak kis távolságokra juttathatja el a spórákat. Ez a gravitáció révén elsősorban lefelé irányuló mozgást eredményezhet. Ezért is vizsgáltam a függőleges és vízszintes irányú vektorok mentén a genetikai távolságot. Ez pedig szignifikánsan nagyobb hasonlósági értékeket adott a függőleges irányokra. A sziklákon csurgó esővíz tehát a spórák lemosása révén alakítja a térbeli mintázatot. Hatása azonban nem jelentős.

A rekombináció és a spóraszórás hatása ellentétes a geomorfológiailag lehatárolt egységeken belüli belterjességgel. Tehát a populáció térbeli genetikai mintázatát a génáramlás-rekombináció és az öntermékenyülés-belterjesség okozta elszegényedés egyensúlya alakítja.

Publikációs lista

Az értekezés témaköréből megjelent publikációk:

V. Krízsik and M. Kertész, 2011. Spatial pattern of multilocus phenotypes within a population of a tetraploid fern, *Asplenium ceterach ssp. ceterach. Community Ecology*-elfogadva

V. Krízsik, I. Pinter, Á. Major, G. Vida, 2007. Spatial pattern of individual genetic similarities in population of *Asplenium ceterach (Aspleniaceae: Pteridophyta*), *Fern Gazette* 18 (2): 59-70.

Konfelencia szereplések:

Krízsik V, Pintér I., 2009. A nyugati pikkelypáfrány (*Asplenium ceterach*) populáción belüli términtázata RAPD polimorfizmust vizsgálat alapján. *8. Magyar Ökológus Kongresszus, Szeged*-előadás

Fehér Z, Bozsó M, Krízsik V, Major Á, Szabó K, Pénzes Zs, 2009. A fekete bödöncsiga [*Theodoxus prevostianus* (C. Pfeiffer, 1828)] intraspecifikus diverzitása és annak természetvédelmi vonatkozásai. *8. Magyar Ökológus Kongresszus, Szeged*-poszter

A.,Schamberger, Á., Apáti, N., Varga, V., Krizsik, A. Németh, Zs., Izsvák, Cs., Miskey, Z.,Ivics, K., Német, B., Sarkadi, T. Orbán, 2008. Stable transgene integration into human embryonic stem cells using the Sleeping Beauty transposon system. *ESGCT, Berlin*-poszter

Krízsik,V., Pintér, I., Major,Á., Vida, G., 2004. Scale analysis of intrapopulational spatial genetic structure of *Asplenium ceterach (Aspleniaceae: Pteridophyta*). *Ferns for the 21st century conference, Edinburgh*-előadás

Krízsik Virág, Pintér István, Major Ágnes, 2003. *Ceterach* populációk términtázata a Szent György–hegyen. *6. Magyar Ökológus Kongresszus, Gödöllő*- poszter

Krízsik V., Körmöczi L, Manczinger L., 1998. Természetes és mesterséges élőhelyek összehasonlítása talajvizsgálatokkal. *Szegedi Ökológiai Napok, Szeged*-poszter

Krízsik V., Körmöczi L., Zalatnai M., Margóczi K., 1998. Homoki növénytársulások rehabilitációjának előkészítő talajanalízise. *Környezetvédelmi diákkonferencia, Mezőtúr*-poszter

Zalatnai M., Krízsik V., Németh A., Margóczi K., 1998. Rehabilitációs kutatások a KNP bócsai ősborókásában. *Aktiális flóra-és vegetációkutatás Magyarországon, Felsőtárkány*-poszter

Egyéb közlemények:

Tamás I. Orbán, Ágota Apáti, Andrea Németh, Nóra Varga, Virág Krizsik, Anita Schamberger, Kornélia Szebényi, Zsuzsa Erdei, György Várady, Éva Karászi, László Homolya, Katalin Német, Elen Góczab, Csaba Miskey, Lajos Mátés, Zoltán Ivics, Zsuzsanna Izsvák, Balázs Sarkadi, 2009. Applying a "Double-Feature" Promoter to Identify Cardiomyocytes Differentiated from Human Embryonic Stem Cells Following Transposon-Based Gene Delivery. *Stem Cells* 27(5): 1077 -1087.

Ágota Apáti, Tamás I. Orbán, Nóra Varga, Andrea Németh, Anita Schamberger, Virág Krizsik, Boglárka Erdélyi-Belle, László Homolya, György Várady, Rita Padányi, Éva Karászi, Evelien W.M. Kemna, Katalin Német and Balázs Sarkadi, 2008. High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1778(12): 2700-2709.

Á. Klein, M. Kulcsár, V. Krízsik, R. Mátics, R. Rudas, J. Török, Gy. Huszenicza, 2006. Effects of environmental temperature on thyroid hormones in the barn owl (*Tyto alba*). *Acta Veterinaria Hung*. 54(3):321-331.

V. Krízsik and L. Körmöczi, 2000. Spatial spreading of *Robinia pseudo-acacia* and *Populus alba* clones in sandy habiatas. *Tiscia* 32: 3-8.

Németh A., Zalatnai M., Krízsik V., Szabó Attila., Bojtos F., Somogyi I., 2000. Rehabilitációs kutatások a Kiskunsági Nemzeti Park bócsai ősborókásában. 1995-1999. *Ökológiai füzetek 4*

Krízsik V., Zalatnai M., Kálóczy A., Urbán M., 1999. Különböző élőhelyek diverzitásának összehasonlító analízise a szárhalmi erdőben. *Ökológiai füzetek 3*