

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Molekuláris filogenetikai módszerek alkalmazása a
Kárpát-medence biogeográfiai jelentőségének
megítélésében**

Laczkó Levente

Témavezető
Dr. Sramkó Gábor



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2021

Bevezetés

A filogenetikai módszerek használata és a biogeográfiai ismeretek ötvözése segíthet megérteni egyes élőlények és földrajzi régiók evolúciós történetét. A megközelítés három évtizede terjedt el, és azóta önálló tudományterületté nőtte ki magát, amelyet filogeográfiaként ismerünk. Európa élővilágának evolúciós története számos publikáció alapját jelentette az elmúlt három évtizedben. A földtörténeti negyedidőszak glaciális ciklusai számos faj esetében az elterjedési terület összehúzódását, majd kiterjedését idézték elő, aminek forrásai azok a refúgium területek, ahol adott faj megfelelő körülményeket találhatott hosszú távú fennmaradásához (Hewitt, 2000). A dél-európai refúgiumok elméletének értelmében a refúgiumterületek a dél-európai félszigetek területén találhatóak. Ezek a populációk hosszú ideje jelen vannak a területen és az északi irányú rekolonizáció forrásai (Hewitt, 1996). Néhány esetben a genetikai struktúra kriptikus északi (vagy extramediterrán) refúgiumokról árulkodik (Bhagwat & Willis, 2008), vagyis, egyes fajok populációi viszonylag északabbra is fennmaradhattak és szolgálhattak a rekolonizáció kiindulópontjaként. Ilyen menedékterület lehetett a Kárpátok területén is, amely bizonyos fajok genetikai

sokféleségének fontos forrása (Ronikier és mtsai., 2008; Slovák és mtsai., 2012, Mosolygó-Lukács és mtsai., 2016, Mráz & Ronikier, 2016). A Kárpátok nagyobb léptékű szerepét azonban viszonylag kevés tanulmány vizsgálta (Bartha és mtsai., 2015; Lendvay és mtsai., 2016). Dolgozatomban három olyan esettanulmányt mutatok be, amelyek segítenek megérteni a Kárpátok nagyobb léptékű biogeográfiai jelentőségét.

Célkitűzés

- Az első esettanulmány során célunk volt a botanika csaknem 200 éve vitatott kérdése, az egyetlen Európában őshonosnak vélt, a Püspökfürdő melletti *Nymphaea lotus* var. *thermalis* populáció harmadkori eredetének tisztázása. A *Lotos* alnemzetség (szub)trópusi elterjedéssel rendelkezik, a *N. lotus* törzsalakját az Afrikában találjuk meg. Az európai növények harmadkori eredete esetén, nagyjából egyenletes speciációs ráta mellett, jelentős genetikai távolságot vártunk a törzspopulációk és a püspökfürdői *N. lotus* var. *thermalis* között. Megvizsgáltuk a *N. lotus*ra és rokonaira jellemző speciációs rátát, majd a genetikai távolságot a *N. lotus sensu lato* elterjedési területének különböző pontjairól gyűjtött populációk

között, ebből következtetve az európai populáció eredetének idejére.

- A második esettanulmány a Délkelet-Kárpátok egyik endemizmusa, a *Hepatica transsilvanica* és közelrokonai filogenetikai helyzetét vizsgálja. A hibrid eredetű *H. transsilvanica* egyik szülőfaja, a *Hepatica nobilis* Európa-szerte elterjedt, míg másik szülőfaja, a *Hepatica falconeri*, kizárólag Közép-Ázsiában fordul elő. Sejtmagi és organelláris (plasztisz) genetikai lokuszok szekvenciái alapján megbecsültük azok koaleszcenciaidejét, amiből következtettünk fajok izolációjának idejére. Az izoláció időpontját ismerve következtettünk a Délkelet-Kárpátok jelentőségére a *H. transsilvanica* hosszú távú fennmaradásának szempontjából.
- A harmadik esettanulmány egy kontinentális elterjedésű faj, a *Primula vulgaris* filogeográfiai viszonyait vizsgálta. A faj ökológiai igényei hasonlóak az *Erythronium dens-canis*-éhoz (Bartha és mtsai., 2015), amely faj jól elkülönült leszármazási ágat képvisel az Erdélyi-medencében. Volkova és mtsai. (2013) jelentős genetikai variabilitást fedeztek fel a Kolhisz régió és a Fekete-tenger északi partvidékének populációiban. Felvetődik, hogy a jelenlegi genetikai struktúra hátterében állhatnak keleti refúgiumok is. A

teljes elterjedési területről származó minták genetikai struktúrájának feltárása után következtettünk a potenciális refugialis területek elhelyezkedésére és felvázoltuk a valószínűsíthető kolonizációs útvonalainak irányát.

Módszerek

A terepi mintákat DNS izoláció előtt szilikagélben, vagy 96 %-os etanolban tároltuk. A DNS izolációját követően olyan genomi régiókat amplifikáltunk polimeráz láncreakció (PCR) segítségével, amelyek variábilisnak bizonyultak a célcsoportban. A lókuszok szekvenciájában megőrzött filogenetikai információ alapján vontunk le következtetéseket az evolúciós történetre vonatkozóan.

A *Nymphaea lotus* var. *thermalis* vizsgálata során elemeztünk egy sejtmagi (nrITS) és három, a plasztisz genomból származó DNS régiót (*rpl32-trnL*, *psbM-trnD*, *trnT-trnL*). Bayesiánus statisztikát használva megbecsültük a *Lotos* alnemzetségre és kevesebb, mint 25,4 millió évvel ezelőtt elvált rokonaira jellemző speciációs rátát. Az afrikai elterjedési terület négy pontjáról gyűjtött *N. lotus sensu lato* minták és a *Nymphaea lotus* var. *thermalis* közti genetikai távolságot haplotípushálózat rekonstrukció segítségével elemeztük.

A *Hepatica transsilvanica* esetében a faj hibrid eredetére tekintettel az nrITS mellett elemeztünk egy kis kópiaszámú sejtmagi gént, az *MLH1*-et, amely az nrITS-el ellentétben kevésbé érzékeny az összehangolt evolúcióra. Az anyai leszármazási ágat a plasztiszban található *trnL-trnF* és az *accD-psaI* szakaszok alapján térképeztük fel. Az egyes DNS régiók alapján függetlenül rekonstruáltuk a génfákat Maximum Likelihood és bayesiánus statisztika segítségével. Utóbbi módszer alkalmazásával megbecsültük az egyes génkópiák koaleszcenciaidejét és azt geológiai időskálán a fajok elterjedési mintázatának fényében értékeltük.

A *Primula vulgaris* esetében a Volkova et al. (2013) által variábilisnak talált nrITS, valamint az *rpl32-trnL* és *trnL-trnF* plasztisz szakaszok alapján vontunk le következtetéseket. Mivel csekély genetikai differenciációt tapasztaltunk, haplotípushálózat rekonstrukció segítségével értelmeztük a filogeográfiai struktúrát.

Eredmények

A *Nymphaea lotus* var. *thermalis* harmadkori reliktum eredetének vizsgálata

- A *Nymphaea lotus* és közelrokon fajai speciációs rátáját nagyjából állandónak találtuk.

- A legjelentősebb genetikai távolságot a *N. lotus sensu lato*n belül a nyugat-afrikai minta és a fennmaradó populációk között találtuk.
- Minden populáció elkülönült genetikailag, kivéve a püspökfürdői és az egyiptomi mintákat, amelyek öt gyorsan evolválódó lókuszon egyeztek meg teljesen.

Molekuláris filogenetikai bizonyítékok a *Hepatica transsilvanica* harmadkori, allotetraploid eredetére

- Molekuláris filogenetikai módszereket használva megerősítettük korábbi szerzők kariológiai eredményeit a *Hepatica transsilvanica* hibrid eredetével kapcsolatban.
- Az nrITS elemzése a közép-ázsiai *Hepatica falconeri* testvéreként helyezte el a *H. transsilvanicat*, míg a plasztiszadatok elemzése alapján az Európában őshonos *Hepatica nobili*-t azonosította legközelebbi rokonfajként. Az *MLH1* szekvenciákban két eltérő kópiát fedeztünk fel, amelyek eredete azonosítható volt a legvalószínűbb szülőfajokkal.
- A *H. transsilvanica* izolációjának eredete legkorábban a pliocén, legkésőbb a pleisztocén elejére tehető.

A *Primula vulgaris* európai léptékű genetikai variabilitásának vizsgálata

- A plasztisz szekvenciák elemzése a Kolhisz régió mintáit azonosította a külcsoporthoz (*Primula veris*) legközelebbi genetikai egységként. A Fekete-tenger partvidékének mintái viszonylag komplex genetikai struktúráról tanúskodtak, amelyből levezethetőek a Közép- és Nyugat-Európában elterjedt csillagszerű struktúrájú haplocsoport. A Krím-félsziget és a Hirkán erdők jól elkülönült, utóbbi csoportból levezethető egységet alkottak.
- Az nrITS régió elemzése a külcsoportot a kizárólag a Kolhisz régióban és a Kárpát-medencében megtalálható ribotípushoz csatolta. A hálózat általában csillagszerű struktúrát mutatott, az egyes ribotípusok között 1-3 mutációs lépéssel kapcsolódtak egymáshoz. Amellett, hogy azonosítottunk a dél-európai félszigetekre jellemző endemikus ribotípusokat, a Krím-félsziget és a Hirkán-erdők egyedei ebben az elemzésben is jól elkülönültek. A nyugat-európai áréán egyetlen, nagy frekvenciájú ribotípus dominált.

Diszkusszió

A *Nymphaea lotus* var. *thermalis* esetében a megfigyelt közel állandó speciációs ráta mellett valódi harmadkori reliktum esetében jelentős genetikai távolságra számítottunk az afrikai és európai populációk között.

Ezzel szemben a belcsoporton belül a legjelentősebb differenciációt a nyugat-afrikai populáció mutatta (1,26 millió év). Meglepő módon a püspökfürdői növény minden lókuszon megegyezett az egyiptomi populációval, amely közelmúltbeli megtelepedésre utal. Az eredmények összhangban állnak Smoleń és Falniowski (2010) konklúziójával, akik a *N. lotus* var. *themalisszal* együtt előforduló és szintén harmadkori reliktnak tartott *Melanopsis parreysiit* az európai meleg vízű forrásokban előforduló *Fagotia acicularis* testvérfajaként azonosították. A *N. lotus* var. *thermalis* terciér reliktnak státusza cáfolható. Habár adatsorunk alapján nem azonosítható a pontos eredet, a növény jelenlétére magyarázat lehet a Tuzson (1908) által is valószínűsített szándékos betelepítés a török hódoltság idején, valamint a költöző vízimadarak általi behurcolás is. Habár a harmadkori eredet elvethető, a növény jelenlétének továbbra is lehet jelentősége érdekes és egyedi előfordulása miatt, így védettsége továbbra is indokolt a Natura 2000 programban (31A0).

A *Hepatica transsilvanica* és közelrokonainak datált filogenetikai elemzése megerősítette Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) eredményeit, miszerint a pliocén fontos szerepet játszott a nemzetség speciációs folyamataiban.

A becsült koaleszcenciaidők összhangban állnak más, hasonló elterjedési mintázatot mutató fajok izolációs eseményeivel (Yokoyama és mtsai., 2000; Lendvay és mtsai., 2016). Az nrITS és a plasztisz szakaszok alapján rekonstruált törzsfák ellentmondó topológiája megerősítette a *H. transsilvanica* hibrid eredetét. Az *MLH1* adatsor segítségével, amelyben felfedeztük a mindkét szülőre jellemző kópiákat, közvetlenül tanulmányozható volt a hibrid speciáció. A plasztisz szekvenciák elemzése alapján a *H. transsilvanica* anyai szülője a *Hepatica nobilis* lehetett és a haplotípusok közös őse körülbelül 2,4 millió éve létezhetett. A *H. transsilvanica* hosszú távú túlélése a Délkelet-Kárpátokban bizonyítható, ahol a faj heterogén élőhelytípusoknak és a meszes alapkőzetnek köszönhetően maradhatott fenn (Hurdu és mtsai., 2016) a negyedidőszak kezdetétől, miután a harmadkori flóra nagy része kipusztult Európában (Willis & Niklas, 2004).

A *Primula vulgaris* esetében a plasztisz és az nrITS elemzése is jól feltárta a filogeográfiai egységeket, bár a két adatsor nem mutatott teljesen egybehangzó képet. Mindkét elemzés a Kolhisz régiót helyezte legközelebb a külsoporthoz (*P. veris*), így elképzelhető, hogy ez lehetett a faj ősi áréája, ami a kezdeti kolonizáció forrása lehetett.

Az nrITS effektív populációmérete és az összehangolt evolúció növeli a közös ősi polimorfizmusok felfedezésének esélyét (Schaal és mtsai., 2000), mivel az allélok teljes leválogatódásához több idő szükséges. Amennyiben a Kolhisz régióban és a Kárpát-medencében valóban a közös ősi ribotípust fedeztük, feltételezhetjük a növény hosszú távú túlélésének lehetőségét lehet Közép-Európában. Előfordulhat azonban, hogy az nrITS nem teljes mértékben tükrözi az evolúciós leszármazást és a ribotípus jelenléte Közép-Európában csupán a marker molekuláris evolúciójának következménye. Mindkét esetben feltűnő, hogy a közös ribotípus a Kolhisz régió kivül kizárólag a Kárpát-medencében jelenik meg, amely eredetének pontos tisztázása fontos információkkal szolgálhat a faj evolúciós története és a Kárpát-medence biogeográfiai jelentősége szempontjából. A mintázatot általánosságban értelmezhetjük kelet-nyugati irányú kezdeti kolonizáció bizonyítékaként. Habár a faj hosszú távú fennmaradására a Kárpát-medencében csak indirekt módon tudunk következtetni, eredményeink összhangban állnak azon tanulmányokkal, amelyek mezofil fajok esetében nagy genetikai változatosságot mutattak ki a Kárpát-medencében.

Habár a *Nymphaea lotus* var. *thermalis* harmadkori eredete biztonsággal cáfolható, a *Hepatica transsilvanica* harmadkori eredete és a *Primula vulgaris* valószínűsíthető hosszú távú fennmaradása a Kárpát-medencében a régió fontos szerepére engednek következtetni a mezofil fajok endemikus leszármazási ágainak megőrzésében

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezeni minden társszerzőmnek, akik szakértelmükkel hozzájárultak a munkához, név szerint Olga Demina, Lukács Balázs András, Mesterházy Attila, Molnár V. Attila, Ivan Schanzer, Polina Volkova. Külön köszönet illeti Sramkó Gábort a hosszú ideje tartó közös munka során nyújtott segítségéért, ami nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre. Ezúton is köszönöm Jacques Gerbernek, Csoma Eszternek, Takács Attilának, Jordán Sándornak, Karime Abidkuloval-nak, Bartha Lászlónak és Süveges Kristófnak, akik hozzájárultak a mintagyűjtéshez és a laboratóriumi munkához. Köszönet illeti még a Debreceni Egyetem TTK Növénytani Tanszékének minden kedves munkatársát is.



Nyilvántartási szám: DEENK/79/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Laczkó Levente
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori iskola
MTMT azonosító: 10058659

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Laczkó, L., Sramkó, G.:** *Hepatica transsilvanica* Fuss (Ranunculaceae) is an Allotetraploid Relict of the Tertiary Flora in Europe ? Molecular Phylogenetic Evidence.
Acta Soc. Bot. Pol. 89 (3), 1-14, 2020. ISSN: 0001-6977.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.8934>
IF: 1 (2019)
2. Volkova, P. A., **Laczkó, L.,** Demina, O., Schanzer, I., Sramkó, G.: Out of Colchis: The Colonization of Europe by *Primula vulgaris* Huds. (Primulaceae).
Acta Soc. Bot. Pol. 89 (3), 1-15, 2020. ISSN: 0001-6977.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.89313>
IF: 1 (2019)
3. **Laczkó, L.,** Lukács, B. A., Mesterházy, A., Molnár, V. A., Sramkó, G.: Is *Nymphaea lotus* var. *thermalis* a Tertiary relict in Europe?
Aquat. Bot. 155, 1-4, 2019. ISSN: 0304-3770.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2019.02.002>
IF: 1.71

További közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

4. Takács, A., **Laczkó, L.,** Molnár, V. A.: A herbáriumok "új típusú" felhasználásai.
Bot. Közl. 100 (1-2), 217-238, 2013. ISSN: 0006-8144.





Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (11)

5. Malkócs, T., **Laczkó, L.**, Bereczki, J., Meglécz, E., Szövényi, P., Sramkó, G.: Development and characterization of novel markers in the endangered endemic species.
Appl Plant Sci. 8 (2), 1-4, 2020. ISSN: 2168-0450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aps3.11321>
IF: 1.591 (2019)
6. Németh, A., Csorba, G., **Laczkó, L.**, Mizsei, E., Bereczki, J., Pásztor, J. A., Petró, P., Sramkó, G.: Multi-Locus Genetic Identification of a Newly Discovered Population Reveals a Deep Genetic Divergence in European Blind Mole Rats (Rodentia: Spalacidae: Nannospalax).
Ann. Zool. Fenn. 57 (1-6), 89-98, 2020. ISSN: 0003-455X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5735/086.057.0110>
IF: 0.956 (2019)
7. Lovas-Kiss, Á., Vincze, O., Kleyheeg, E., Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Fekete, R., Molnár, V. A., Green, A. J.: Seed mass, hardness, and phylogeny explain the potential for endozoochory by granivorous waterbirds.
Ecol. Evol. 10, 1413-1424, 2020. ISSN: 2045-7758.
IF: 2.392 (2019)
8. Horváth, O., **Laczkó, L.**, Líztes-Szabó, Z., Molnár, V. A., Popiela, A., Sramkó, G.: The Phylogenetic Position of *Vincetoxicum pannonicum* (Borhidi) Holub Supports the Species' Allopolyploid Hybrid Origin.
Acta Soc. Bot. Pol. 89 (3), 1-14, 2020. ISSN: 0001-6977.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.8931>
IF: 1 (2019)
9. Szinai, M., Nagy, Z., Máté, P., Kovács, D., **Laczkó, L.**, Kardos, G., Sápy, T., Szűcs, A., Szarka, K.: Comparative analysis of human papillomavirus type 6 complete genomes originated from head and neck and anogenital disorders.
Infect. Genet. Evol. 71, 140-150, 2019. ISSN: 1567-1348.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.019>
IF: 2.773
10. Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Volkova, P. A., Bateman, R. M., Mlinarec, J.: Evolutionary history of the Pasque-flowers (Pulsatilla, Ranunculaceae): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution.
Mol. Phylogenet. Evol. 135, 45-61, 2019. ISSN: 1055-7903.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.015>
IF: 3.496





11. Sramkó, G., Paun, O., Brandrud, M. K., **Laczkó, L.**, Molnár, V. A., Bateman, R. M.: Iterative allogamy-autogamy transitions drive actual and incipient speciation during the ongoing evolutionary radiation within the orchid genus *Epipactis* (Orchidaceae).
Ann. Bot. 124 (3), 481-497, 2019. ISSN: 0305-7364.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcz103>
IF: 4.005
12. Cserkészt, T., Fülöp, A., Almerekova, S., Kondor, T., **Laczkó, L.**, Sramkó, G.: Phylogenetic and Morphological Analysis of Birch Mice (Genus *Sicista*, Family Sminthidae, Rodentia) in the Kazak Cradle with Description of a New Species.
J. Mamm. Evol. 26 (1), 147-163, 2019. ISSN: 1064-7554.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10914-017-9409-6>
IF: 2.5
13. Costea, M., El, M. H., **Laczkó, L.**, Fekete, R., Molnár, V. A., Lovas-Kiss, Á., Green, A. J.: The effect of gut passage by waterbirds on the seed coat and pericarp of diaspores lacking "external flesh": evidence for widespread adaptation to endozoochory in angiosperms.
PLoS One. 14 (12), 1-22, 2019. ISSN: 1932-6203.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0226551>
IF: 2.74
14. Pető, Á., Kenéz, Á., Lisztes-Szabó, Z., Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Molnár, M., Bóka, G.: The first archaeobotanical evidence of *Lagenaria siceraria* from the territory of Hungary: histology, phytoliths and (a)DNA.
Veg. Hist. Archaeobot. 26 (1), 125-142, 2017. ISSN: 0939-6314.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00334-016-0566-y>
IF: 2.232
15. Sramkó, G., Molnár, V. A., Tóth, J. P., **Laczkó, L.**, Kalinka, A., Horváth, O., Skuza, L., Lukács, B. A., Popiela, A.: Molecular phylogenetics, seed morphometrics, chromosome number evolution and systematics of European *Elatine* L. (Elatinaceae) species.
PeerJ. 4, 1-25, 2016. EISSN: 2167-8359.
DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.2800>
IF: 2.177





Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (3)

16. Malkócs, T., Almerekova, S., **Laczkó, L.**, Meglécz, E., Cservenka, J., Bereczki, J., Sramkó, G.: A *Gladiolus palustris* populációgenetikai vizsgálata a Kárpát-medencében = The population genetic structure of *Gladiolus palustris* in the Carpathian Basin.
In: XII. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia : program és összefoglalók : Debrecen, 2018. február 23-25. = 12th International Conference "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region" : programme and abstracts : Debrecen, 23-25 February 2018. Szerk.: Molnár V. Attila, Sonkoly Judit, Takács Attila, DE TTK Növénytani Tanszék, Debrecen, 38, 2018. ISBN: 9789634739265
17. Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Sallainé Kapocsi, J., Lisztes-Szabó, Z., Molnár, V. A.: A bókóló zsálya hazai, periférikus állományainak populációgenetikai vizsgálata - tanulságok a természetvédelem számára = Conservation genetics of the endangered steppe relict, *Salvia nutans*, on its distribution periphery - conservation implications.
In: XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia = "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region", Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 63-64, 2016. ISBN: 9789639877252
18. **Laczkó, L.**, Bauer, N., Molnár, V. A., Sramkó, G.: A medvefülkankalinok (*Primula auricula* agg.) filogeográfiája a Kárpát-medencében = Phylogeography of bears's ears (*Primula auricula* agg.) in the Carpathian Basin.
In: XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia = "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region", Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 12-13, 2016. ISBN: 9789639877252

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,572

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,71

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.03.02.



**Short thesis for the degree of doctor of
philosophy (PhD)**

**Application of molecular phylogenetic methods to
assess the biogeographic importance of the
Carpathian Basin**

Levente Laczkó

Supervisor
Dr. Gábor Sramkó



UNIVERSITY OF DEBRECEN
Juhász-Nagy Pál Doctoral School
Debrecen, 2021

Introduction

The application of phylogenetic methods and the combination of biogeographic knowledge can help to understand the evolutionary history of organisms and geographic regions. The approach emerged three decades ago and has since grown into an independent field of science known as phylogeography. The evolutionary history of Europe's wildlife has been studied by many researchers over the past three decades. For many species, glacial cycles of the Quaternary caused the contraction and then expansion of the distribution area. During unfavorable periods species survived in refugia that later became the sources recolonization (Hewitt, 2000). According to the theory of southern richness / northern purity, refuge areas are located in the southern European peninsulas. These populations have long been present in the area and are sources of northward recolonization (Hewitt, 1996). In some cases, the genetic structure reveals cryptic northern refugia (Bhagwat & Willis, 2008), i.e., populations of some species may have survived at higher latitudes that may have served as a source for recolonization. Such a refugium may also have been present in the Carpathians, which is an important source of genetic diversity of certain species (Ronikier et al., 2008; Slovák et al., 2012; Mosolygó-Lukács et al., 2016;

Mráz & Ronikier, 2016). However, the larger-scale role of the Carpathians has been studied in relatively few studies (Bartha et al., 2015; Lendvay et al., 2016). In my dissertation, I present three case studies that help to understand the larger scale biogeographic significance of the Carpathian Basin.

Aims

- In the first case study, our aim was to study the potential Tertiary origin of *Nymphaea lotus* var. *thermalis*, which has been debated for almost 200 year. The subgenus *Lotos* has a (sub)tropical distribution, *Nymphaea lotus* s.s. is distributed throughout Africa. A conspicuous occurrence of the species can be found in Europe at Lake Pețea. If the European plants are of Tertiary origin, in the presence of a roughly uniform speciation rate, we expected a significant genetic distance between the European and African populations. We examined the rate of speciation of *N. lotus sensu lato* and its relatives. Then we investigated the genetic distance between populations collected from different points of the distribution area of *N. lotus*.
- The second case study presents our results on the origin of *Hepatica transsilvanica*, an endemism of the Southeast Carpathians. One parent species of the hybrid

H. transsilvanica, *Hepatica nobilis*, is widespread throughout Europe, whereas the other parent species, *Hepatica falconeri*, occurs exclusively in Central Asia. Using molecular dating, we assessed the divergence time of the species, then using this information we drew conclusions on the significance of the Southeastern Carpathians in the long-term preservation of *H. transsilvanica*.

- The third case study examined the phylogeographic structure of *Primula vulgaris*, a mesophilous species with a continental distribution pattern. The ecological needs of the species are similar to those of *Erythronium dens-canis* (Bartha et al., 2015), which represents a well-separated lineage in the Transylvanian Basin. Volkova et al. (2013) discovered significant genetic variability in populations in the Colchis region and the northern Black Sea coast. We hypothesised that eastern and northern cryptic refugia may have played a role in forming the current distribution. By analyzing the phylogeographic structure of samples collected throughout the distribution area of the species we indirectly drew conclusions on the phylogeographic history of *P. vulgaris*.

Methods

We stored field samples silica gel or in 96 % ethanol prior to DNA isolation. Following DNA isolation, genomic regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR) that were shown to be variable in the target group, then conclusions about the evolutionary history were drawn based on the sequence of the loci.

We analyzed the nuclear ribosomal ITS and three plastid DNA regions (*rpl32-trnL*, *psbM-trnD*, *trnT-trnL*) to reconstruct the phylogeographic structure of *Nymphaea lotus*. Using the sequences of species that separated from *Nymphaea lotus* less than 25.4 million years ago, we estimated the speciation rate characteristic to the lineage. Phylogeographic structure of samples collected from four points of the African range and *Nymphaea lotus* var. *thermalis* was inferred using haplotype network reconstruction.

Given the hybrid origin of *Hepatica transsilvanica*, in addition to the nrITS region we also analyzed the sequences of a low-copy nuclear gene. Such genes, contrary to the nrITS are less sensitive to concerted evolution and might mirror hybrid speciation more faithfully. To identify the maternal parent species we analyzed the plastid encoded *trnL-trnF* and *accD-psaI*

regions. Gene trees were inferred independently by Maximum Likelihood and bayesian methods. Using latter approach we assessed the coalescent times of gene trees and evaluated our results in light of the distribution pattern of species.

To investigate the phylogeographic patterns of *Primula vulgaris* we adopted the methods of Volkova et al. (2013). We sequenced the nrITS and the *rpl32-trnL* and *trnL-trnF* plastid regions. As we observed a shallow genetic differentiation, we applied haplotype network reconstruction to study the phylogeographic pattern of the species.

Results

Is *Nymphaea lotus* var. *thermalis* a Tertiary relict in Europe?

- We found the speciation rate of subgenus *Nymphaea* approximately constant.
- We found the largest genetic differentiation between the West African population and the rest of samples.
- All populations could be separated by the applied markers, except for those collected in Europe and Egypt, that showed the same genotype on five rapidly evolving loci.

Molecular phylogenetic evidences for the Tertiary origin of *Hepatica transsilvanica*

- Using molecular phylogenetic methods we confirmed the hybrid origin of *Hepatica transsilvanica*.
- The analysis of the nrITS region placed the central Asian *Hepatica falconeri* sister to *Hepatica transsilvanica*, whereas the analysis of plastid loci identified *Hepatica nobilis* and *H. transsilvanica* as sister taxa. In the *MLH1* dataset we were able to identify the haplotypes of both parent taxa, that made possible the direct study of hybrid speciation.
- The isolation of *H. transsilvanica* could be traced back to the beginning of the Pliocene at the earliest and to the beginning of the Pleistocene at the latest.

The phylogeographic structure of *Primula vulgaris* at the European scale

- Analysis of the plastid sequences identified samples from the Colchis region as the closest genetic unit to the outgroup (*Primula veris*). Samples from the Black Sea coast showed a complex genetic structure from which the haplotypes common in Central and Western Europe can be derived. Latter group showed a typical star-like pattern. The samples of the Crimean peninsula

and the Hyrcanian forests formed well-separated units that could be deduced from the latter group.

- Analysis of the nrITS region connected the outgroup to the ribotype found exclusively in the Colchis region and the Carpathian Basin. The network generally showed a star-like structure, with 1-3 mutation steps between each ribotype. In addition to identifying endemic ribotypes characteristic of the southern European peninsulas, individuals from the Crimean peninsula and the Hircanyan forests were also well separated in this analysis. A single high-frequency ribotype dominated the Western European area.

Discussion

If *Nymphaea lotus* var. *thermalis* was a Tertiary relict, we would expect a significant genetic distance between the only European and African populations. Contrary to this, within the ingroup the West African population showed the largest genetic differentiation and shared the most recent common ancestor with the rest of the samples *ca* 1.26 Mya. Surprisingly, the European plant was identical to the sample collection at the Nile delta, that suggests recent introduction of the European population. Our results are in line with the findings of Smoleń & Falniowski (2010), who identified *Melanopsis parreysii* –

an other putative relict of the Lake Pețea – as sister species to *Fagotia acicularis*. The Tertiary origin of *N. lotus* var. *thermalis* could be refuted. Although we were not able to identify the exact origin of the European plants, a possible explanation – as Tuzson (1908) outlined – might be the introduction by the Turkish when the Ottoman Empire extended from North Africa to central Europe. This empire was known about its’ advanced horticulture. An other explanation might be zoochory, as migratig shorebirds can be vectors for seed dispersal. Although the Tertiary origin can be refuted, we can still regard *N. lotus* var. *thermalis* as a cultural relict for its unique occurrence. Consequently, we agree with the protection of this habitat type at the EU level as the part of the Natura 2000 network (31A0).

The dated phylogenetic analysis of *Hepatica transsilvanica* and its close relatives confirmed the results of Weiss-Schneeweiss et al. (2007) that the Pliocene may have played an important role in the speciation of the genus. The estimated coalescent times are consistent with isolation events of species with similar distribution patterns (Yokoyama et al., 2000; Lendvay et al., 2016). The contrasting topology of the phylogenetic trees reconstructed from nrITS and plastid loci confirmed the hybrid origin of *H. transsilvanica*. Using the *MLH1*

dataset, in which copies of both parents were discovered, hybrid speciation could be directly studied. Analysis of the plastid sequences suggested that the maternal parent of *H. transsilvanica* was *Hepatica nobilis* and the two species diverged about 2.4 million years ago. Based on the above, the long-term survival of *H. transsilvanica* can be proven in the Southeastern Carpathians, where the species may have survived the Quaternary glaciations due to heterogeneous habitat types and calcareous bedrock (Hurdu et al., 2016) after the majority of the Tertiary flora extincted in Europe (Willis & Niklas, 2004).

By the analysis of the phylogeographic structure of *Primula vulgaris*, we were able to define phylogeographic clusters based on both the nuclear and plastid datasets. Although the nrITS and plastid data sets did not show a completely consistent picture, we were able to draw some conclusions on the evolutionary history of the species. Both analyses placed the Colchis region closest to the outgroup (*P. veris*). Thus, it is conceivable that this region could be the ancestral area of the species, which may have been the source of initial colonization. The effective population size of nrITS and the concerted evolution increases the chance of discovering common ancestral polymorphisms (Schaal et al., 2000), as more time is

required for alleles to fully coalesce. If we accept that the common ribotype found in the Carpathian Basin and in the Colchis is the ancestral ribotype of the species, its presence in the Carpathian Basin can imply the long-term survival of the species in Central Europe. It is possible, however, that nrITS does not fully reflect the evolutionary relationships and that the presence of this ribotype in Central Europe is merely a consequence of the molecular evolution of the marker. In either case, it is conspicuous that the common ribotype is exclusively present in the Carpathian Basin outside the Colchis region. A precise clarification of its origin could provide important information on the evolutionary history of the species. In general, the pattern could be interpreted as a potential evidence of an initial east-to-west colonisation. Although we could infer the long-term persistence of the species in the Carpathian Basin only indirectly, our results are consistent with studies that have shown high genetic diversity in mesophilous species in the Carpathian Basin.

Although the Tertiary origin of *Nymphaea lotus* var. *thermalis* can be refuted, the Tertiary origin of *Hepatica transsilvanica* and the probable long-term persistence of *Primula vulgaris* in the Carpathian Basin confirm the role

of the region in the conservation of endemic lineages of mesophilous species.

Acknowledgements

I would like to thank all my co-authors who contributed to the work with their expertise, namely Olga Demina, Balázs András Lukács, Attila Mesterházy, Attila Molnár V., Ivan Schanzer, Polina Volkova. Special thanks goes to Gábor Sramkó for showing guidance as my supervisor, without which this dissertation would not have been possible. I would also like to thank Jacques Gerber, Eszter Csoma, Attila Takács, Sándor Jordán, Karime Abidkulova, László Bartha and Kristóf Süveges for their contributions to the sample collection and laboratory work. Thanks are also due to all the kind colleagues of the Department of Botany, University of Debrecen, Faculty of Botany.



Registry number: DEENK/79/2021.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Levente Laczkó

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10058659

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (3)

1. **Laczkó, L.**, Sramkó, G.: *Hepatica transsilvanica* Fuss (Ranunculaceae) is an Allotetraploid Relict of the Tertiary Flora in Europe ? Molecular Phylogenetic Evidence.
Acta Soc. Bot. Pol. 89 (3), 1-14, 2020. ISSN: 0001-6977.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.8934>
IF: 1 (2019)
2. Volkova, P. A., **Laczkó, L.**, Demina, O., Schanzer, I., Sramkó, G.: Out of Colchis: The Colonization of Europe by *Primula vulgaris* Huds. (Primulaceae).
Acta Soc. Bot. Pol. 89 (3), 1-15, 2020. ISSN: 0001-6977.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.89313>
IF: 1 (2019)
3. **Laczkó, L.**, Lukács, B. A., Mesterházy, A., Molnár, V. A., Sramkó, G.: Is *Nymphaea lotus* var. *thermalis* a Tertiary relict in Europe?
Aquat. Bot. 155, 1-4, 2019. ISSN: 0304-3770.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2019.02.002>
IF: 1.71

List of other publications

Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

4. Takács, A., **Laczkó, L.**, Molnár, V. A.: A herbáriumok 'új típusú' felhasználásai.
Bot. Közl. 100 (1-2), 217-238, 2013. ISSN: 0006-8144.





Foreign language scientific articles in international journals (11)

5. Malkócs, T., **Laczkó, L.**, Bereczki, J., Meglécz, E., Szóvényi, P., Sramkó, G.: Development and characterization of novel markers in the endangered endemic species.
Appl Plant Sci. 8 (2), 1-4, 2020. ISSN: 2168-0450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aps3.11321>
IF: 1.591 (2019)
6. Németh, A., Csorba, G., **Laczkó, L.**, Mizsei, E., Bereczki, J., Pásztor, J. A., Petró, P., Sramkó, G.: Multi-Locus Genetic Identification of a Newly Discovered Population Reveals a Deep Genetic Divergence in European Blind Mole Rats (Rodentia: Spalacidae: Nannospalax).
Ann. Zool. Fenn. 57 (1-6), 89-98, 2020. ISSN: 0003-455X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5735/086.057.0110>
IF: 0.956 (2019)
7. Lovas-Kiss, Á., Vincze, O., Kleyheeg, E., Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Fekete, R., Molnár, V. A., Green, A. J.: Seed mass, hardness, and phylogeny explain the potential for endozoochory by granivorous waterbirds.
Ecol. Evol. 10, 1413-1424, 2020. ISSN: 2045-7758.
IF: 2.392 (2019)
8. Horváth, O., **Laczkó, L.**, Lisztes-Szabó, Z., Molnár, V. A., Popiela, A., Sramkó, G.: The Phylogenetic Position of *Vincetoxicum pannonicum* (Borhidi) Holub Supports the Species' Allopolyploid Hybrid Origin.
Acta Soc. Bot. Pol. 89 (3), 1-14, 2020. ISSN: 0001-6977.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.8931>
IF: 1 (2019)
9. Szinai, M., Nagy, Z., Máté, P., Kovács, D., **Laczkó, L.**, Kardos, G., Sápy, T., Szűcs, A., Szarka, K.: Comparative analysis of human papillomavirus type 6 complete genomes originated from head and neck and anogenital disorders.
Infect. Genet. Evol. 71, 140-150, 2019. ISSN: 1567-1348.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.019>
IF: 2.773
10. Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Volkova, P. A., Bateman, R. M., Mlinarec, J.: Evolutionary history of the Pasque-flowers (Pulsatilla, Ranunculaceae): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution.
Mol. Phylogenet. Evol. 135, 45-61, 2019. ISSN: 1055-7903.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.015>
IF: 3.496





11. Sramkó, G., Paun, O., Brandrud, M. K., **Laczkó, L.**, Molnár, V. A., Bateman, R. M.: Iterative allogamy-autogamy transitions drive actual and incipient speciation during the ongoing evolutionary radiation within the orchid genus *Epipactis* (Orchidaceae).
Ann. Bot. 124 (3), 481-497, 2019. ISSN: 0305-7364.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcz103>
IF: 4.005
12. Cserkészi, T., Fülöp, A., Almerekova, S., Kondor, T., **Laczkó, L.**, Sramkó, G.: Phylogenetic and Morphological Analysis of Birch Mice (Genus *Sicista*, Family Sminthidae, Rodentia) in the Kazak Cradle with Description of a New Species.
J. Mamm. Evol. 26 (1), 147-163, 2019. ISSN: 1064-7554.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10914-017-9409-6>
IF: 2.5
13. Costea, M., El, M. H., **Laczkó, L.**, Fekete, R., Molnár, V. A., Lovas-Kiss, Á., Green, A. J.: The effect of gut passage by waterbirds on the seed coat and pericarp of diaspores lacking "external flesh": evidence for widespread adaptation to endozoochory in angiosperms.
PLoS One. 14 (12), 1-22, 2019. ISSN: 1932-6203.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0226551>
IF: 2.74
14. Pető, Á., Kenéz, Á., Lisztes-Szabó, Z., Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Molnár, M., Bóka, G.: The first archaeobotanical evidence of *Lagenaria siceraria* from the territory of Hungary: histology, phytoliths and (a)DNA.
Veg. Hist. Archaeobot. 26 (1), 125-142, 2017. ISSN: 0939-6314.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00334-016-0566-y>
IF: 2.232
15. Sramkó, G., Molnár, V. A., Tóth, J. P., **Laczkó, L.**, Kalinka, A., Horváth, O., Skuza, L., Lukács, B. A., Popiela, A.: Molecular phylogenetics, seed morphometrics, chromosome number evolution and systematics of European *Elatine* L. (Elatinaceae) species.
PeerJ. 4, 1-25, 2016. EISSN: 2167-8359.
DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.2800>
IF: 2.177





Hungarian abstracts (3)

16. Malkócs, T., Almerekova, S., **Laczkó, L.**, Meglécz, E., Cservenka, J., Bereczki, J., Sramkó, G.: A *Gladiolus palustris* populációgenetikai vizsgálata a Kárpát-medencében = The population genetic structure of *Gladiolus palustris* in the Carpathian Basin.
In: XII. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia : program és összefoglalók : Debrecen, 2018. február 23-25. = 12th International Conference "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region" : programme and abstracts : Debrecen, 23-25 February 2018. Szerk.: Molnár V. Attila, Sonkoly Judit, Takács Attila, DE TTK Növénytan Tanszék, Debrecen, 38, 2018. ISBN: 9789634739265
17. Sramkó, G., **Laczkó, L.**, Sallainé Kapocsi, J., Lisztes-Szabó, Z., Molnár, V. A.: A bókóló zsálya hazai, periférikus állományainak populációgenetikai vizsgálata - tanulságok a természetvédelem számára = Conservation genetics of the endangered steppe relict, *Salvia nutans*, on its distribution periphery - conservation implications.
In: XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia = "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region", Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 63-64, 2016. ISBN: 9789639877252
18. **Laczkó, L.**, Bauer, N., Molnár, V. A., Sramkó, G.: A medvefülkankalinok (*Primula auricula* agg.) filogeográfiája a Kárpát-medencében = Phylogeography of bears's ears (*Primula auricula* agg.) in the Carpathian Basin.
In: XI. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia = "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region", Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 12-13, 2016. ISBN: 9789639877252

Total IF of journals (all publications): 29,572

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 3,71

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

02 March, 2021



Irodalomjegyzék – References

Bartha, L., Sramkó, G., Volkova, P. A., Surina, B., Ivanov, A. L., & Banciu, H. L. (2015). Patterns of plastid DNA differentiation in *Erythronium* (Liliaceae) are consistent with allopatric lineage divergence in Europe across longitude and latitude. *Plant Systematics and Evolution*, 301(6), 1747-1758.

Bhagwat, S. A., & Willis, K. J. (2008). Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits?. *Journal of Biogeography*, 35(3), 464-482.

Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.

Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58(3), 247-276.

Hurdu, B. I., Escalante, T., Puşcaş, M., Novikoff, A., Bartha, L., & Zimmermann, N. E. (2016). Exploring the different facets of plant endemism in the South-Eastern Carpathians: a manifold approach for the determination of biotic elements, centres and areas of endemism. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 649-672.

Lendvay, B., Kadereit, J. W., Westberg, E., Cornejo, C., Pedryc, A., & Höhn, M. (2016). Phylogeography of *Syringa josikaea* (Oleaceae): Early Pleistocene divergence from east Asian relatives and survival in small populations in the Carpathians. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 689–703.

Mosolygó-Lukács, A., Sramkó, G., Barabás, S., Czeglédi, L., Jávör, A., Molnár V., A., & Surányi, G. (2016). Molecular genetic evidence for allotetraploid hybrid speciation in the genus *Crocus* L. (Iridaceae). *Phytotaxa*, 258(2), 121–136.

Mráz, P., & Ronikier, M. (2016). Biogeography of the Carpathians: Evolutionary and spatial facets of biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 528–559.

Ronikier, M., Cieślak, E., & Korbecka, G. (2008). High genetic differentiation in the alpine plant *Campanula alpina* Jacq. (Campanulaceae): Evidence for glacial survival in several Carpathian regions and long-term isolation between the Carpathians and the Alps. *Molecular Ecology*, 17(7), 1763–1775.

Schaal B. A, Olsen K. M. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7024–7029

Slovák, M., Kučera, J., Turis, P., & Zozomová-Lihová, J. (2012). Multiple glacial refugia and postglacial colonization routes inferred for a woodland geophyte, *Cyclamen purpurascens*: Patterns concordant with the Pleistocene history of broadleaved and coniferous tree species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(4), 741–760.

Smoleń, M. (2009). Molecular phylogeny and estimated time of divergence in the central European Melanopsidae: *Melanopsis*, *Fagotia* and *Holandriana* (Mollusca: Gastropoda: Cerithioidea). *Folia Malacologica*, 17(1), 1-9.

Tuzson, J., (1908). A *Nymphaea lotus* csoport morfológiája és rendszertani tagolódása. *Mathematikai és Természettudományi Értesítő* 26, 101–137.

Volkova, P. A., Schanzer, I. A., & Meschersky, I. V. (2013). Colour polymorphism in common primrose (*Primula vulgaris* Huds.): Many colours – many species? *Plant Systematics and Evolution*, 299(6), 1075–1087.

Weiss-Schneeweiss, H., Schneeweiss, G. M., Stuessy, T. F., Mabuchi, T., Park, J. M., Jang, C. G., & Sun, B. Y. (2007). Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytologist*, 174(3), 669–682.

Willis, K. J., & Niklas, K. J. (2004). The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or

the rule?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1442), 159-172.

Yokoyama, J., Suzuki, M., Iwatsuki, K., & Hasebe, M. (2000). Molecular phylogeny of *Coriaria*, with special emphasis on the disjunct distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(1), 11–19.