

Az nrITS szekvencia változatosság a mediterrán bangó (*Ophrys* L.) nemzetség poszméhbangó (*O. fuciflora*) fajkomplexében

Doktori (PhD) értekezés

Sramkó Gábor

Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Debrecen, 2008. Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biodiverzitás programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2008. augusztus 1.

Sramkó Gábor

Tanúsítom, hogy Sramkó Gábor doktorjelölt 2004-2007. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biodiverzitás programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2008. augusztus 1.

Dr. Molnár V. Attila

Tanúsítom, hogy Sramkó Gábor doktorjelölt 2004-2007. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biodiverzitás programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2008. augusztus 1.

Prof. Dr. Varga Zoltán

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, irodalmi előzmények1
1.1. A bangó (Ophrys L.) nemzetség bemutatása1
1.2. Korábbi molekuláris vizsgálatok a nemzetségben14
1.3. Az nrITS tulajdonságai és használata a molekuláris taxonómiában22
2. Anyag és módszer
2.1. Növényanyag31
2.2. DNS kivonás, az nrITS PCR amplifikálása és direkt szekvenálása38
2.3. Klónozás41
2.4. Adatanalízis
3. Eredmények
3.1. Direkt szekvenciák illesztése és ribotípusai48
3.2. A klón szekvenciák illesztése és ribotípusai
3.3. A direkt és klón szekvenciák filogenetikai vizsgálata63
3.4. A klón szekvenciák populációgenetikai vizsgálata67
4. Megvitatás
4.1. Ortológ nrITS ribotípusok70
4.2. Erőteljes génáramlás a fajcsoporton belül73
4.3. Leszármazási vonalak a Fuciflora fajkomplexen belül
4.4. Szisztematikai, taxonómiai vonatkozások78
4.5. Fajfogalom a bangó nemzetségben81
5. Összefoglalás
6. Summary
7. Köszönetnyilvánítás95
8. Irodalomjegyzék96

1. Bevezetés, irodalmi előzmények

1.1. A bangó (Ophrys L.) nemzetség bemutatása

Kontinensünk talán egyik legérdekesebb növénynemzetsége a bangó (Ophrys L.) nemzetség, melybe az orchidea-félék (Orchidaceae) népes családjának egyik szintén számos fajt számláló taxonja. Az ide tartozó, elsősorban a Mediterráneumban gyakori (Wood 2001) fajok legnevezetesebb tulajdonsága a szexuális becsapáson alapuló megporzása (Schiestl et al. 1999). Ez a különleges megporzási típus már Darwin (1862) figyelmét felkeltette, de a rovarokra emlékeztető bangó virágokra "kis ördögökként" támadó méhek viselkedése mögötti motivációt nem sikerült megfejtenie. Ezt a francia Pouvanne tette meg, aki megfigyelte, hogy a virágokat (O. vernixia Brot.) kizárólag egy darázsfaj, a Dasyscolia ciliata hímjei látogatják, és határozottan párzó mozdulatokat tesznek rajta (Correvon & Pouyanne 1916). Ebből helyesen azt a következtetést vonta le, hogy a virág mimikrit folytat: a megporzó méh nőstényét utánozza, ezáltal elérve, hogy a becsapott hím miközben megpróbál közösülni a virággal – megporozza azt (1. ábra). Ezt a jelenséget Pouyanne-mimikrinek, vagy elterjedtebb nevén pszeudokopulációnak ("pseudocopulation") nevezzük (Paulus 2006). Habár kora tudományos közvéleménye hitetlenkedve fogadta megfigyelését, később a svéd entomológus, Kullenberg (1961) vizsgálatai világosan megmutatták Pouyanne eredeti értelmezésének helyességét, és számos esetben specifikus kapcsolatot mutattak ki a bangó és a megporzó rovar között. Eszerint bizonyos bangófajok megporzását csak egy bizonyos rovarfaj hímje végzi el, azaz a növény és a hártyásszárnyúak között erős koevolúciós kapcsolat áll fenn (Schiestl 2005). Megfigyelte, hogy a virágok egy részén a megporzó fejjel a polliniumok felé próbálkozik (cefálikus pszeudokopuláció), másoknál

potrohhal fordul a polliniumok felé (abdominális pszeudokopuláció). Ez a megfigyelése is alátámasztotta a bangó nemzetség korábbi (Godfery 1928), morfológiai és pollinációs alapon történt felosztását két alnemzetségre: az *Euophrys* (cefálikus pollináció) és a *Pseudophrys* (abdominális pollináció) alnemzetségekre.



1. ábra *Eucera longicornis* pszeudokopulációja *Ophrys fuciflora* virágon. (M. Fiedler fényképfelvétele)

А bangó nemzetség Pouyanne-mimikrijének vizsgálatában fordulópontot jelentett Paulus & Gack (1990) összefoglaló cikke, akik elsőként hangsúlyozták a bangók és a megporzó hártyásszárnyúak közti specifikus kapcsolat evolúciós következményeit. Értelmezésük szerint a specifikus pollinátorok roppant erős, "nász előtti" (pre-mating) vagy prezigótikus izolációs faktorokként működnek, azaz - mivel egy adott bangófaj csak egy adott rovarfajt vonz – megakadályozzák a szimpatrikus fajok hibridizációját (Paulus & Gack 1990). Másrészt a specifikus pollinátor a közelrokonoktól elválasztja a megporzott faj genetikai állományát, ezért a biológiai fajfogalom alkalmazása esetén minden, a hasonló fajoktól szaporodásilag izolálódott alakot önálló fajnak lehet tekinteni (Paulus 2006). Ugyanakkor az erős pre-mating izoláció azt is jelenti, hogy ha egy populáció új pollinátorfajt kezd használni, az könnyen új, a korábbi alaktól izolálódott taxon kialakulásához vezet (Cozzolino & Widmer 2005) az erős irányító szelekció és izoláció révén, amit a specifikus pollinátor a növényre fejt ki.

A fenti elképzelésnek erőteljes hatása volt a bangók rendszerezésére. Míg a korábbi szerzők a génusz teljes faj és alfaj számát 100 alattira tették, addig Paulus & Gack (1990) utáni monográfusok 300 körüli taxont ismertek fel a nemzetségen belül (2. ábra). Ez a gyors növekedés valószínűleg nem csak a biológiai fajfogalom szigorú értelmezéséből adódik, hanem abból is, hogy a 70-es, 80-as évektől kezdődően a műkedvelő orchidea-kedvelők és hivatásos taxonómusok számára könnyebbé vált és divatos lett a mediterrán területek vizsgálata, és ez a nemzetség ismert variabilitásának kiszélesítését is jelentette. Mindenesetre roppant nagy a biológiai fajfogalom szigorú értelmezésének szerepe az új alakok faji rangú leírásában, mert a specifikus pollinátor meglétét, mint lehetséges izolációs faktort tekintik a változatok önálló biológiai entitásának értékeléséhez. Emiatt számos taxonómus kritizálta a jelenlegi monográfusokat mondván, hogy a fajon belüli

változatosságot nem veszik figyelembe, és sokszor populáció szintjén megjelenő változatokat választanak le fajokként (Wood & Cribb 2001), ezáltal "taxonómiai elértéktelenedést" (taxonomic inflation – Isaac *et al.* 2004) okozva a nemzetségben. Ezért a kisebb változatok faji szintre emelésével, és a nemzetségen belüli roppant nagy fajszámmal egyet nem értő taxonómusok napjainkban a fajszám erős redukálását, és csak a jelentős földrajzi önállósággal bíró alakok alfaji rangú elismerését szorgalmazzák. Ezt tükrözi a legutóbbi monográfia (Pedersen & Faurholdt 2007), ami – napjaink monográfiáival ellentétben – csupán 86 taxont sorol fel a nemzetség európai áreáján (2. ábra).



2. ábra Az elkülönített fajok és alfajok számának változása a bangó nemzetségben a nemzetségről megjelent monográfiák alapján 1851-től napjainkig. Paulus & Gack (1990) cikkének megjelenési idejét nyíl mutatja.

Habár a különböző alakok taxonómiai besorolása nem egységes, abban mindenki egyetért, hogy a bangó nemzetség roppant változatos, és ez a variabilitás a hártyásszárnyú pollinátorral való koevolúció eredményeként lezajlott gyors adaptív radiáció eredménye (Wood & Cribb 2001, Soliva et al. 2001). Ugyanakkor ennek a radiációnak a közelmúltban lezajlott voltát jelzi, hogy a génuszon belül olyan nagyfokú a kromoszómális hasonlóság, hogy az akár távolabbi rokonok közötti hibridizációt nem akadályozza post-zygotikus izolációs barrier (Ehrendorfer 1980), habár egyes szimpatrikus populációk között ez szolgáltat alapot az elkülönülésre (Cozzolino et al. 2004). Valóban, a fajok közötti gyakori hibridizációt - mely a diploid szinten marad, ezért pontosabban homoploid hibridizációnak (Rieseberg 1997) nevezhetjük számos szerző a nemzetségen belüli fajkeletkezés egyik mozgatórugójának tartja (Stebbins & Ferlan 1955, Danesch & Danesch 1972, Delforge 2006, Pedersen & Faurholdt 2007). Azonban a számos esetben detektált, gyakorinak mondható F1 hibridek ellenére viszonylag kevés stabilizálódott hibridogén fajt ismerünk [Pedersen & Faurholdt (2007) a 25 európai fajból ötöt tart hibridogén eredetűnek, illetve stabil hibrid-komplexnek: Ophrys × brigittae (O. fusca \times omegaifera), Ophrys \times delphinensis (O. argolica \times oestrifera), Ophrys × vicina (O. fuciflora × oestrifera), Ophrys × arachnitiformis (O. fuciflora × sphegodes) és Ophrys × flavicans (O. bertolonii × sphegodes)]. Ugyanakkor felmerülhet a kérdés, hogy hogyan lehetséges az erős, a pollinátorok által közvetített pre-mating izolációs barrier ellenére a gyakori hibridizáció?

Hogy jobban megértsük a nemzetségen belüli speciációt és az ahhoz kapcsolódó izolációt, és ezen keresztül magyarázatot kapjunk az F₁ hibridek gyakori jelenlétére, de a stabilizálódott hibridogén fajok ritka voltára, különleges figyelmet kell szentelni a *pre-mating* barrier részleteire. Ehhez

ismernünk kell a pollinátor méhek párkereső viselkedését. A bangókat megporzó méhek hímjei nagy távolságból észlelt nőstény szexuálisferomonok "ösvényét" követve, olfaktórikus inger segítségével közelítik meg a párjukat. A "feromon ösvényt" követve látótávolságból már vizuális ingerekre támaszkodva közelíti meg a nőstényt a hím, majd rászállva taktilis ingerek (elsősorban a nőstény szőrözöttsége) alapján választja meg a hím a kopulációs testhelyzetet (Paulus 2006). Azaz ezek azok a stimulusok, olfaktórikus, vizuális és taktilis ingerek, melyek a hímek párzási reakcióját kiváltják, és amelyeket a bangó virágoknak utánozniuk kell. Habár már korábban is sejtették ezen ingerek nagy jelentőségét a bangók megporzásában (Kullenberg 1961), csak az utóbbi évek technológiai újításai tették lehetővé a bangó-pollinátor méh kapcsolat behatóbb vizsgálatát, és a korábban nem sejtett részletekre vetettek fényt.

Nagy érzékenységű analitikai módszerek (gázkromatográfia és tömegspektrometria), valamint a pollinátor faj hímjének csápjából elvezetett ingerület érzékelésének ("electroantennographic detection") egyidejű kombinálásával lehetővé vált az egyes specifikus megporzók ingerületet kiváltó specifikus alkotóelemek meghatározása (Schiestl et al. 1999, Ayasse et al. 2003) egyes Ophrys – pollinátor párokban. Kiderült, hogy az attraktív anyagok teljesen megegyeznek a vonzott pollinátor nőstényének szexuális feromonjaival, sőt, a közelrokon Ophrys fajok ugyanazokat a kulcsvegyületeket (ún. aktív összetevők) használják a megfelelő arányban, mint a közelrokon pollinátorok nőstényei, így - hasonlóan az utánzott modellhez – ugyanazoknak a vegyületeknek a mennyiségi kombinálásával faj-specifikus illatot hoznak létre. Ez különösen igaz a fajgazdag bangó csoportokra, amelyeket hasonlóan faj- és alakgazdag méhnemek poroznak be (Paulus 2006), így például a dolgozat témájául szolgáló poszméhbangók körére, melyeket az Eucerini tribuszba sorolt méhek (Eucera s.l.,

Tetraloniella nemek) poroznak be, és amelyek között a legfőbb izoláció a fajspecifikus feromonokon alapul. Így aztán a bangók faj-specifikus illata a modell nem csupán identikus másolata, de egyben a modell evolúciós viszonyait is tükrözi.

A vizuális ingereknek – amely elsősorban a mézajak rajzolatában manifesztálódik – szintén nagy szerepe van a faj-specifikus pollinátor vonzásban, de a szerepe alárendeltebb, mint az olfaktórikus ingeré (Paulus 2006). Habár e tekintetben igen eltérőek az egyes bangó-csoportok, és egyesek (pl. *Ophrys speculum*) az emberi szem számára is feltűnően hasonlítanak a modellre, a legtöbb esetben – így a jelen dolgozat szempontjából érdekes poszméhbangó alakkör fajainál is – csak a nőstény általános színezettségét utánozzák. Ugyanakkor ezeket a fajokat jellemzi, hogy roppant változatos mézajak-rajzolatot találunk, mely – egy bizonyos típusú minta keretein belül – erősen változékony, még egyazon növény virágzatán belül is eltérhet, de populáción belül, és populációk között bizonyosan eltérő. Ennek a tényezőnek – az illatbeli variabilitás mellett – kulcsszerepe van a növények megporzásában.

A taktilis ingernek elsősorban a hím párzási testhelyzetének orientálásában van szerepe, az ugyanis a virág szőrözöttsége alapján veszi fel a kopulációs pózt (Paulus 2006). Ennek megfelelően már Kullenberg (1961) kimutatta, hogy a cefálikus pszeudokopulációval jellemezhető fajok (Euophrys szekció) esetében a szőrök bibe felől a mézajak vége felé néznek, míg az abdominális pszeudokopulációval jellemezhető fajok (Pseudophrys szekció) esetében ez éppen fordított. Ugyanakkor a faj-specifikus felismerésben a taktilis ingereknek valószínűleg nincs szerepe (Paulus 2006).

Összegezve a három, a pollinátor párkereső aktivitásában szerepet játszó ingert látható, hogy az olfaktórikus, vizuális és taktilis stimulusok

kombinációja együttesen teszi lehetővé a sikeres mimikrit, igaz, ennek sikerében az elsőnek van oroszlánrésze.

Ugyanakkor roppant változatosságot találunk mind a bangók virágának megjelenésében (Nelson 1962), mind pedig illatában (Ayasse et al. 2000), mely sokszor virág-specifikus (Paulus 2006). Ennek okát a Pouyannemimikri sajátos tulajdonságában kell keresni. A pollinátorok ugyanis képesek tanulni (Paulus & Gack 1990, Ayasse et al. 2000, Paulus 2006), és következőkben a becsapott hímeknek először csökken érdeklődésük további virágok iránt, majd teljesen elvesztik érdeklődésüket a növényi "guminő" iránt. Ugyanakkor azonos fajba tartozó más populációk ugyanezen hímek érdeklődését a kezdeti vehemenciával keltik fel (Paulus 2006). Mindenesetre a pollinátorok felismerik és elkerülik a már megismert virágokat, illetve a populációban gyakoribb szag- és színmintázatú virágokat, míg a ritkákat nagyobb eséllyel nem. Ennek fontos következménye van a gyakori alak fitnesszére, mely természetesen romlik, míg a ritkábbaké javul. Az ilyen szelekciót negatív gyakoriság-függő szelekciónak nevezik, és a Bates-féle mimikri alapkritériumaként is ismert (Roy & Widmer 1999). Ennek sajátsága, hogy az utánzónak (jelen esetben a virág) mindig az operátor (a pollinátor hím) által megszabott keretek között, de a modell (a pollinátor nősténye) által megengedett legnagyobb variabilitást kihasználva kell utánoznia azt. Ugyanakkor a favorizált alakok és az elkerültek frekvenciája között hosszútávon egyensúlyi állapot áll be, amiben a variációs spektrum két vége közötti teljes skála jelen van, így tartva a populációban egy, a mimikriben érintett jegyek (jelen esetben a virágok illata és morfológiája) tekintetében roppant variábilis állapotban. Jó példa erre a hazánkban is ismert, táplálék-becsapó ("food-deceptive", azaz nektárt nem nyújtó, de nektárt termelő fajokat utánzó) Dactylorhiza sambucina (L.) Soó, melynek hazánkban is sárga és vörös színváltozata keverten fordul elő (Molnár 2000).

Itt a két színváltozat a variációs spektrum két végpontja, és a két színváltozat a közös populációban a pollinátorok közvetítette negatív frekvencia-függő szelekció eredményeként marad fenn (Gigord *et al.* 2001).

Minden bizonnyal hasonló szelekciót feltételezhetünk a bangók esetén is, ahol a *post-zygotikus* barrier hiánya miatt fellépő esetleges introgresszió ellenére a pollinátorok faj-specifikus illatok iránti preferenciája fenntartja a fajok közti különbséget és a fajon belüli változatosságot (Schiestl 2005). Miután a pollinátor populációk különböző mértékben lehet érzékenyek a szex-feromonokra, így a bangók illatára, azok változatos mértékű szelekciót okoznak a bangó populációkban. A szelektív operátor (pollinátor) ilyen fluktuációi a bangó alakok (fajok) közötti izoláció majd "egyesülés" közti oszcillációit eredményezhetik, és ún. szüngameon-ként ("syngameon") evolválódnak (Schiestl 2005).

Ezt ismerve már másképp tekinthetünk a bangó nemzetségben jelzett extrém magas fajok közti hibridizációs rátára (Danesch & Danesch 1972). Valóban, a morfológiai alapon képzett taxonok (az akkor ismertek száma 62) közötti átmeneti alakok (feltételezett hibridek) számát Danesch & Danesch (1972) 144-ben adta meg. Jogosan tételezhetjük fel, de megfigyelésekkel is alátámasztották (Baumann & Baumann 2007), hogy a pollinátorok – a specifikus kapcsolat ellenére – "tévednek" (Paulus 2006)! Ez könnyen érthető, hiszen a pollinátorok nőstényei is közelrokonok, és fajspecifikus szexuális feromonjaik egymástól elsősorban aktív összetevőinek mennyiségi arányaiban különböznek, akárcsak a bangók hasonló szaganyagai (Schiestl *et al.* 1999, Ayasse *et al.* 2003). Így aztán könnyebben előfordul a tévedés, hiszen az izolációs faktorként szolgáló szaganyagok között kicsi a különbség. Mindez kombinálódik a virágok fent részletezett roppant variabilitásával, ami még valószínűbbé teszi a tévedést. Így keletkezhetnek fajspecifikus hibridek a bangó nemzetségben, amely az introgresszió lehetőségét teremti meg,

melynek erőteljes voltát Soliva & Widmer (2003) kísérletes megfigyelésekkel támasztotta alá.

Ezért az aktív fajkeletkezésben lévő bangó nemzetség rendszerezése különösen bonyolult, hiszen a negatív gyakoriság-függő szelekció alá eső, és ezáltal roppant variábilis virágmorfológiai bélyegekre hagyatkozó hagyományos osztályozásuk sokszor a fajok határait hibásan határozza meg. Két tendenciát figyelhetünk az utóbbi időben meg. Az egyik irányt a biológiai fajfogalom roppant szűk alkalmazása jellemzi, amely ha potenciális esélyt lát (az ismert pollinátort nem vonzó, vagy morfológiailag különálló alakokat talál) pre-mating izolációs barrier (specifikus pollinátor) létére, azt az alakot külön fajként értelmezi. Jellemzően ritkán használják a faj feletti és a faj alatti taxonómiai kategóriákat a nemzetség osztályzásában. Ennek az irányzatnak első képviselői Devillers & Devillers-Terschuren (1994), majd az őket követő Delforge (1994, 2001, 2005), aki 286 fajba és alfajt ismer fel a nemzetségen belül, amit két szekcióra és számos "fajcsoportra" oszt fel, illetve egyes "közelebbi rokon" fajcsoportokat 3 "fajkomplexbe" sorol be. Ezt a felfogást számos szerző kritizálta (Wood & Cribb 2001, Pedersen & Faurholdt 2002, Devey et al. 2008), elsősorban azért, mert apró változatokat faji szinten ismer el, másrészt mert nem használja a taxonómiában meghonosodott taxonómiai rangfokozatokat. Ennek kiküszöbölésére az utóbbi időben Pedersen & Faurholdt (2002) alakított ki egy fajfogalmat, amely a fajok jóval tágabb, számos alfajjal képviselt értelmezését igyekszik elérni. Sajnos ez utóbbi megközelítés hátránya, hogy a politipikusnak tekintett fajokba olyan alakokat is bevon (általában alfaji rangon), melyek morfológiai hasonlósága a tőfajhoz egyértelműen konvergencia eredménye (pl. Ophrys kotschyi hasonlósága az Ophrys cretica rokonsági köréhez, lásd Gölz & Reinhardt (1985), Paulus & Gack 1990a, Sramkó et al. ined.), ezáltal filogenetikai értelemben polifiletikus fajokat képez.

Habár a bangók faji szintű rendszertana még messze nem kiforrott, a legtöbb szerző általában Delforge (2005) monográfiájának harmadik kiadása alapján tárgyalja a fajokat, hiszen ez adja a legátfogóbb ismertetést az eddig megismert bangó alakokról. Az alábbiakban a dolgozat is a nemzetség fenti munkában feltételezett szisztematikáját követi, azzal a megjegyzéssel, hogy teljesen biztos, hogy az itt faji rangon elkülönített alakok közül számos legfeljebb *varietas* értékű, és számos alak az egy biológiai fajon belüli variációs spektrum végpontjait képviselik.

Delforge (2005) a bangó génuszon belül 250 fajt, 31 alfajt és 5 változatot oszt be 32 "fajcsoportba" (3. ábra). A nemzetségen belül két nagy monofiletikus egységet tételez fel, melyeket két szekciónak tart: ezek a Godfery (1928) által felállított, cefálikus pszeudokopulációval jellemezhető Euophrys Godfery (számos szerző szerint helyesen Ophrys sectio) és az abdominális pszeudokopuláció jellemezhető Pseudophrys Godfery szekciók. Az Euophrys szekción belül öt nagyobb csoportot különít el, melyek közül a három jelentősebb fajszámút szintén monofiletikus egységekként kezeli, és ezt a három egységet "fajkomplex" csoportba vonja össze. Ezek az Sphegodes fajkomplex (hat fajcsoporttal), valamint a testvércsoport helyzetűnek tekintett Argolica (három fajcsoporttal bíró) és Fuciflora (9 fajcsoporttal rendelkező) fajkomplexek (3. ábra). Delforge (2005: 358) a Pseudophrys szekciót tartja az ősibbnek, és az Orchis s.l. nemzetségből eredezteti azt. Az Euophrys-on belül pedig hat radiációt különböztet meg, melyek közül hármat izolált, feltehetőleg ősibb csoportnak vél (Insectifera, Speculum és Tenthredinifera fajcsoportok), míg a maradék három csoportot jól fejlett, közelrokon és fiatalabb csoportoknak tartja (a fent részletezett három fajkomplex).



3. ábra Delforge (2005) monográfiájában elkülönített rokonsági körök ("fajcsoportok") és azok feltételezett leszármazási viszonyai a bangó (*Ophrys*) nemzetségen belül. Az ábrát a szövegben közölt információk alapján rekonstruáltuk.

A dolgozat szempontjából kissé nagyobb figyelmet az *O. fuciflora* fajkomplex érdemel. Ide nyolc fajcsoportba osztott 77 fajt sorol, melyeket rövid, szőrös, gyakran fülecskés belső lepel, és a mézajakhoz kapcsolódó, gyakran háromajkú, sima, bemetszésbe illeszkedő, kiemelkedő függelék jellemez. Az ide tartozó bangók legnagyobb hányadát az *Eucera* nembe sorolt közelrokon méhfajok porozzák meg (Delforge 2005, Paulus 2006). A csoport feltételezett leszármazási viszonyait – Delforge (2005) munkájában közölt adatok alapján – a 4. ábrán mutatjuk be.



4. ábra A Fuciflora fajkomplex szisztematikája Delforge (2005) munkája alapján, az ide tartozó 8 fajcsoport mellett feltüntetve az adott fajcsoportba sorolt fajokat is.

A fenti rendszer alapján a komplexen belül legősibb faj a méhbangó (O. apifera), amelynek levezetett karaktere az obligát autogámiája (Pedersen & Faurholdt 2007), mely a génuszon belül csak erre a fajra jellemző (Devey et al. 2008). A következő leágazáson találjuk a Delforge (2005: 360) szerint központi csoportot а komplexen belül. а Bornmueller-bangókat (Bornmuelleri fajcsoport), melynek közelrokonai a köldök bangók (Umbilicata fajcsoport). Ezután a "szarvas bangók" és a poszméhbangók monofiletikus, fiatal csoportja következik. Ezen belül a legősibbnek a nyugati mediterrán szarvas bangókat (Scolopax fajcsoport) tartja, majd két fejlődési vonalon a keleti mediterrán szarvas bangók (Oestrifera fajcsoport) és Heldreich-bangók (Heldreichii fajcsoport), valamint a korai virágzású poszméhbangók (Fuciflora fajcsoport) és a kései virágzású poszméhbangók (Tetraloniae fajcsoport) képviselik a komplex legfiatalabb, levezetett csoportjait (4. ábra). Fontos megemlíteni, hogy a nyugati mediterrán szarvasbangók (Scolopax fajcsoport) és a keleti mediterrán szarvas bangók (Oestrifera fajcsoport) csoportjait külön fejlődési ágakra helyezi, ezzel is kiemelve a korábbi, nálunk is elterjedt közös csoportosításuk (Soó 1970: O. scolopax subsp. scolopax, O. scolopax subsp oestrifera, O. scolopax subsp. cornuta, O. scolopax subsp. heldreichii) polifiletikus voltát.

1.2. Korábbi molekuláris vizsgálatok a nemzetségben

A neutrális (vagy gyakorlatilag neutrális) öröklődésű gének, gének közötti intronok vizsgálata nagy valószínűséggel visz közelebb az élőlények közti valós leszármazási viszonyok tisztázásához (Avise 2004), mert ezek evolúcióját nem (vagy csak kissé) befolyásolja a szelekció, ezáltal kisebb a homoplázia (evolúciós értelemben a konvergenciából adódó hasonlóság) 4esélye (Doyle & Gaut 2000). A gének – és így, ha a szóban forgó gének

ortológok (lásd 27. oldal), a populációk (fajok) – közti leszármazási viszony vizsgálatának leggyakrabban alkalmazott módja a filogenetikai törzsfarekonstrukció, mely során egy faszerkesztési eljárás algoritmusával igyekszünk a vizsgált gének közti legoptimálisabb (legrövidebb, legvalószínűbb, legegyszerűbb) kapcsolatrendszert ("törzsfát") felderíteni (Nei & Kumar 2000, Podani 2007). Hasonló vizsgálatokkal sikerült a kosborfélék családján belüli filogenetikai viszonyt, így például a bangó nemzetséget is tartalmazó Orchideae tribusz leszármazási viszonyait tisztázni (Bateman et al. 2003). Az orchideákat tárgyaló legutóbbi, átfogó monográfia (Chase et al. 2001) szerint a hozzávetőleg 21 950 ismert fajt tartalmazó Orchidaceae családot öt alcsaládra lehet felosztani, melyek közül a legfiatalabb, az Orchidoideae tartalmazza az európai fajok legnagyobb részét. Ezen belül két fő fejlődési irány figyelhető meg (5. ábra): az egyik elsősorban trópusi nemzetségeket tartalmazó tribuszokat (Diurideae, Cranichideae) foglal magában, míg a másik a Codonorchideideae és a Diseae mellett utóbbi testvércsoportjaként - található az Orchideae (Chase et al. 2001). A számos mérsékelt övi, terresztris orchideát magába foglaló Orchideae tribusz két fejlődési irányát az nrITS szekvenciák alapján (Bateman et al. 2003) a Habenariinae altribusz (Habenaria és Herminium nemzetségek) és az Orchidinae altribusz képviseli (5. ábra). Az altribuszon belül a Neottianthe, Hemipilia, Ponerorchis nemzetségek jelentkeznek a többi ide tartozó nemzetség testvércsoportjaként. Ez utóbbiakon belül két fejlődési irányból az egyiket az Orchis (s.str.), Dactylorhiza, Gymnadenia, Platanthera, Pseudorchis, Traunsteinera génuszok képviselik, míg a másikon a Neottinea, Himantoglossum (s.l.), Ophrys, Serapias és Anacamptis (s.l.) nemzetségeket találjuk (5. ábra). A bangó nemzetség ezen csoporton belüli helyzetére vizsgálatok vagy vonatkozó Himantoglossum (s. l.) csoport а 1999), a Serapias nemzetség testvérnemzetségeként (Aceto et al.

testvérnemzetségeként (Aceto *et al.* 1999), a *Serapias* nemzetség testvércsoportjaként (Soliva *et al.* 2001, Bernardos *et al.* 2006), vagy pedig a *Serapias* és *Anacamptis* (s. l.) csoport testvérnemzetségeként (Pridgeon *et al.* 1997, Bateman *et al.* 2003) szerepeltetik a filogenetikai kladogramon (utóbbi véleményt lásd 5. ábra).



5. ábra Az Orchidaceae család filogenetikai kladogramja Chase *et al.*(2001) munkája alapján, különös tekintettel az Orchideae tribusz
filogenetikai viszonyaira Bateman *et al.* (2003) alapján

A bangó nemzetségen belüli filogenetikai viszonyok első felderítését Pridgeon *et al.* (1997) kísérelte meg, akik az nrITS-t használták munkájukban, ami 16 faj közti filogenetikai viszonyát mutatta be. Később Grünanger *et al.* (1998) a teljes növényi genomot mintázó RAPD módszert használták az *Ophrys bertolonii* rokonsági körének vizsgálatára. Sajnos azonban sem ők, sem az őket követő és már a teljes génuszt az nrITS magi

génszakasszal, valamint a kloroplaszt DNS *trnL-trn*F IGS génszakasz szekvenálásával mintázni igyekvő Soliva *et al.* (2001) nem kapott megfelelő felbontást a filogenetikai törzsfáik végágain. Sőt, utóbbi munkában a kpDNS intronja önmagában nem is volt alkalmas a törzsfakészítésre, mert olyan kevés variábilis helyet tartalmazott, így csak az nrITS-t tudták törzsfaszerkesztésre használni. Megjegyzendő, hogy nem vették figyelembe az nrITS-ben esetlegesen jelen lévő paralógokat, így törzsfájuk igen kis felbontást eredményezett, és számos feloldatlan elágazást tartalmazott (6. ábra).



6. ábra Soliva *et al.* (2001) nrITS és kpDNS trnL-trnF szekvenciákon alapuló legnagyobb parszimónia módszerrel kapott szoros konszenzus filogenetikai törzsfája

Ezt követően Bateman *et al.* (2003) altribusz szintű vizsgálatában találunk eredményeket a génuszon belüli filogenetikai viszonyokra vonatkozóan (7. ábra), ami lényegében Pridgeon *et al.* (1997) munkájának ismétlése a nemzetségen belüli megemelt mintaszámokkal. A törzsfaszerkesztést nrITS szekvenciákra alapozták, és maximum parszimónia módszerrel kapott 10 000 törzsfa szoros konszenzusát elemezték úgy, hogy csak az 50% feletti statisztikai bizonyosságú ("bootstrap támogatottságú") elágazásokat különítették el.



7. ábra Az *Ophrys* nemzetség filogenetikai viszonyai maximum parszimónia módszerrel kapott fák szoros konszenzus törzsfája alapján Bateman *et al.* (2003) vizsgálataiban. A kladogrammon csak az 50% feletti statisztikailag támogatott elágazásokat különítették el, a számok az ágak felett ezek számszerűsített értékei.

Bateman et al. (2003) munkájában közölt törzsfarészlet (7. ábra) már jobb felbontást eredményez a nemzetségen belül, de még mindig nagyon sok feloldatlan elágazással, politómiával találkozunk. Ezen vizsgálat alapján jól elkülönülnek a Pseudophrys szekció fajai (95% "bootstrap támogatottság"), ezek monofiliája bizonyított, ugyanakkor az Euophrys szekció monofiliája bizonytalan, mert egy nagy "alapi politómia" feloldatlanságot okoz a törzsfán. Ennek a politómiának az ágaihoz tartoznak az O. insectifera, O. tenthredinifera, O. bombyliflora, O. speculum, O. regis-ferdinandii fajok. A Fuciflora, Argolica és Sphegodes komplexek (sensu Delforge 2005) fajai mellett helyezkednek el, és a méhbangó ezek *(O. apifera*) testvércsoportjaként jelentkeznek (más szavakkal az O. apifera a három komplexbe tartozó fajok alapi kládját képviseli), méghozzá mérsékelt (84%) statisztikai támogatottság mellett (7. ábra). A komplexeken belül újfent nagy politómiát látunk, igaz némely esetben magas (95%) támogatottságú fajpárok (O. scolopax, O. heldreichii), vagy alacsony támogatottságú (60% és 64 %) fajcsoportok jelennek meg (előbbibe az O. biancae, O. oxyrrhynchos, O. fuciflora, O. sphegifera fajok, míg utóbbiba az O. umbilicata, O. levantina fajpár került). A fennmaradó fajok nagy politómiát alkotnak. Habár ez a vizsgálat már nagyobb betekintést adott a nemzetségen belüli filogenetikai viszonyokba, még mindig jelentős politómiákat tartalmaz, ami talán abból is adódik, hogy a szerzők nem végezték el az nrITS minták klónozását, így az esetleges paralógok jelenlétéből adódó torzításokat nem szűrhették ki.

A későbbiekben elsősorban egyes kisebb fajcsoportok, rokonsági körök molekuláris filogenetikai vizsgálatát végezték el. Bernardos *et al.* (2005) a Pseudophrys szekció Ibériai-félszigeti fajait vizsgálta morfometriai elemzéssel és az nrITS szekvenálásával, Gulyás *et al.* (2005) az *O. fuciflora* és *O. oestrifera* fajok közötti génáramlást mutatta ki az nrITS klónozásával, míg Schlüter *et al.* (2007b) az AFLP módszerrel vizsgálta az *O. omegaifera*

fajcsoport fajait. Habár a molekuláris vizsgálatok mellett karológiai vizsgálatok is történtek (Bernardos *et al.* 2003, D'Emerico *et al.* 2005) a nemzetségen belül, faji szinten azok (is) kis felbontást eredményeztek, elsősorban a szekciók és egyes fajcsoportok között tudtak különbséget kimutatni. Összességében kijelenthető, hogy a hagyományosan alkalmazott citológiai módszerek és molekuláris filogenetikai vizsgálatok (és génszakaszok) nem adnak a nemzetségen belül megfelelő felbontást az evolúciós viszonyok tisztázásához. Talán ezért is igyekeztek egyes munkacsoportok más módszerek (pl. Véla *et al.* (2007) a virág szagmintázat feltárásával), vagy új, variábilisabb génszakaszok (pl. Schlüter *et al.* (2007a) a *LFY* gén) bevonásával közelebb jutni a nemzetségen belüli evolúciós viszonyok feltárásához. Sajnos ezek a módszerek még csak vizsgálati fázisban vannak, így nem tudjuk, vajon tényleg alkalmasak lesznek-e a nemzetségen belüli kapcsolatok feltárásához.

A legutóbbi molekuláris filogenetikai vizsgálat Devey et al. (2008) munkája, akik roppant nagy mintában (85 bangó fajt mintáztak) vizsgálták az nrITS szekvenciákat (heterológ ITS változatok jelenlétére utaló szekvenciákat klónozták!), a trnD-trnT és a trnH-psbA kloroplaszt IGS szekvenciákat, valamint 74 fajban AFLP DNS ujjlenyomat módszerrel is generáltak filogenetikai adatokat. Eredményeik közül a két kloroplaszt IGS kombinált felhasználásával is csupán elégtelen felbontást kaptak a filogenetikai rekonstrukciókor. Az alkalmazott AFLP technika (elsősorban a szelektív amplifikációk során alkalmazott primerek megválasztása) döntő jelentőségű az AFLP felbontóképességének eldöntésében, ugyanakkor túl specifikus primerek használata szűkíti felhasználhatóság taxonómiai szélességét (Bensch & Åkesson 2005). Devey et al. (2008) munkájában alkalmazott módszer - talán mert a nemzetség teljes spektrumát igyekezett lefedni – ezért kis faj-specifikus felbontást eredményezett. Az AFLP technika

kis felbontásáért ugyanakkor felelős lehet az, hogy a génusz közelmúltbeli adaptív radiációja miatt csak az erős direkcionális szelekció alá eső génekben és a roppant gyorsan evolválódó nem kódoló régiókban különböznek egymástól, a teljes genomban alig. Ezért a teljes gonomot mintázó AFLPtechnika számára eleve nem áll rendelkezésre megfelelő variabilitás. A legrészletesebb felbontást, mint korábban is, az nrITS szekvenálásával kapott dikert szekvenciák, és a polimorf minták klónozásával kapott klónozott nrITS szekvenciák használatával nyerték.

A közel 130 nrITS szekvencia illesztett mátrixából 6287 egyenlően leginkább takarékos ("maximum parsimonious") fát kaptak, melynek ágain az 50% feletti statisztikai támogatottságú ágak alapján 10 monofiletikus csoportot mutattak ki, igaz, számos politómiát is tartalmaz a fa (8. ábra). Ugyan igazolták a Pseudophrys szekció monofiletikus voltát, de az Euophrys szekció polifiletikusnak bizonyult. Az nrITS szekvenciák alapján a bangó nemzetségen belüli legelső leágazást, az összes többi faj testvércsoportját az O. insectifera faj és rokonai (Insectifera klád) képzik (8. ábra), igaz, kis támogatottsággal (61%). Ezen belül két határozott (97%-os támogatottságú) kládot találunk, az egyik a Tenthredinifera, Speculum és Bombyliflora csoportokat, valamint a Pseudophrys szekciót tartalmazza, míg a másik a Fuciflora, Sphegodes és Argolica komplexeket (sensu Delforge 2005). Ez utóbbi csoporton belül nagy valószínűséggel (91% bootstrap mellett) az Apifera csoport az összes többi testvércsoportjaként jelentkezik a kladogrammon, míg a fennmaradó csoportok feloldatlan helyzetben (politóm elágazásokkal) négy monofiletikus egységre bomlanak: a Sphegodes, a Fuciflora, a Scolopax és az Umbilicata kládokra (8. ábra). Az itt vázolt képet megerősíti a munkában közölt, a két kloroplaszt IGS kombinált adathalmazára épülő kladogram is, melynek topológiája gyakorlatilag identikus az itt rekonstruálttal. Sőt, egyes csoportosításokat az AFLP adatok

sokváltozós elemzése (PCo) is megerősített. Így joggal bízhatunk abban, hogy a Devey *et al.* (2008) által közölt filogram a bangó nemzetségen belüli evolúciós viszonyokat napjaink ismereti szintjén tükrözi.



8. ábra Devey *et al.* (2008) által bemutatott filogram egyszerűsített kladogram változata az ott feltüntetett bangó nemzetségen belüli főbb leszármazási vonalak (monofiletikus csoportok) feltüntetésével, a kládok felett a munkában megadott statisztikai támogatottság ("bootstrap percentage") jelzésével

1.3. Az nrITS tulajdonságai és használata a molekuláris taxonómiában

A fentiekben láthattuk, hogy a bangó nemzetség filogenetikai viszonyainak feltárásában legeredményesebben a nukleáris riboszómális ITS ("internal transcribed spacer") régió használható, hiszen a legtöbb esetben ez a régió jobb felbontást eredményezett a többi, a különböző munkákban

22

alkalmazott régiónál, illetve a mai napig legteljesebb, legjobb felbontású képet is (Devey *et al.* 2008) az nrITS használatával nyerték. Valóban, az nrITS az egyik legkedveltebb növényi molekuláris taxonómiai génszakasz a nemzetség vagy azalatti szintű filogenetikai vizsgálatokban, az első áttekintés (Baldwin *et al.* 1995) óta 2002-ig publikált összes ilyen témájú cikk 66%-a használta ezt a régiót, sőt, 34%-a kizárólag erre alapult (Álvarez & Wendel 2003)!

Az nrITS a sejtmagi DNS-ben lévő, a riboszómális alegységek összeszereléséhez szükséges információkat kódoló számos, ún. NOR ("nucleolus organizing region") lókuszokon található génszakasz (Álvarez & Wendel 2003). Miután a NOR lókuszokon lévő riboszómális gének által kódolt riboszómák a magi transzláció kulcshelyei, és az intenzív sejtfolyamatok során általában roppant nagy számú riboszómán történik egyidejűleg a transzláció, a riboszómákból is rövid időn belül roppant nagy mennyiségre lehet szükség. Ezért a riboszómákat kódoló génekből sem csupán egy, hanem egy-egy sejten belül általában sok (akár pár ezer kópia) van egyszerre jelen (Hillis & Dixon 1991, Álvarez & Wendel, 2003, Eickbush & Eickbush 2007), lehetővé téve ezáltal, hogy szükség esetén számos lókuszról egyidejűleg történjen a riboszómák összeszerelése. Azaz, egy-egy sejten belül a NOR lókuszok száma, így az nrITS génszakasz száma is magas, és ezek a lókuszok egymás után, ún. tandem elrendeződésben fordulnak elő a DNS-szálon (9. ábra). Egy-egy eukarióta növényi NOR lókuszt mindig ugyanaz a 7 génszakasz épít fel: egy egység egy ún. nrIGS ("nuclear ribosomal intergenic spacer") régióval kezdődik, mely a DNS-ről nem íródik át, majd egy nagyobb, pre-mRNS-re átíródó egységgel folytatódik (9. ábra). Ez utóbbi három, a két riboszóma alegységet kódoló génszakaszt és három ún. "spacer" (átíródó, de a pre-mRNS érése során kivágódó) régiót tartalmaz. A három gén (a megfelelő riboszómális alegység nevének

megfelelően) a 18S, az 5,8S és a 26S nevet viselik, míg a "spacer"-ek az nrETS (helyzete miatt, mivel a géneken kívül találjuk "external transcribed spacer"), valamint az nrITS1 ("nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1") és az nrITS2 ("nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2"). A központi helyzetű ITS1-5,8S-ITS2 szakaszokat összefoglalóan nrITS-nek nevezik.



9. ábra A növények magi DNS-ben lévő, riboszómákat kódoló NOR lókuszok felépítése Eickbush & Eickbush (2007) alapján (fent) és az egyes génszakaszok jellemző divergenciájának relatív foka Jorgensen & Cluster (1988) alapján (lent)

A NOR lókuszokon található génszakaszokra – funkciójukból adódóan – különböző erősségű szelekció hat (Hillis & Dixon 1991). Míg az át nem íródó nrIGS szakaszra alig hat szelekció, addig a riboszómális alegységeket kódoló szakaszokra erőd szelekció hat. Az átíródó spacer régiókra – habár a pre-mRNS érése során kivágódik – kismértékű szelekció hat, mert a két nrITS szakasz másodlagos szerkezetének hatása van a premRNS érésére, ezért a bázissorend változatlanságára kis fokú kényszer hat

(Hershkovitz & Zimmer 1996, Mai & Coleman 1997). Ennek ellenére az nrITS1 és nrITS2 szakaszokat, mint neutrálisan öröklődő génszakaszt tekinthetjük (Álvarez & Wendel 2003). A szelekció mértéke pedig befolyásolja a bázissorend variabilitását, hiszen mennél kisebb szelekció hat a génszakaszra annál nagyobb a neutrális mutációk valószínűsége, így a szekvencia-változatosság várható foka (Jorgensen & Cluster 1988). Ennek megfelelően a kódoló génszakaszokhoz képest az nrIGS egy nagyságrenddel, míg a "spacer" régiók 0,4-0,6 nagyságrenddel variábilisabbak (9. ábra). Az egyes génszakaszok variábilitása pedig meghatározza felhasználhatóságukat: míg a neutrális mutációkat elvétve tartalmazó 18S gént távoli rokonok, pl. a zárvatermők nagyobb csoportjainak elkülönítésére használták (lásd APG II 2003), addig a jóval variábilisabb nrITS a nemzetségek, fajok közti evolúciós viszonyok tisztázására alkalmas (Baldwin et al. 1995, Álvarez & Wendel 2003, Eickbush & Eickbush 2007). Habár az nrIGS ennél is variábilisabb génszakasz, rutinszerű alkalmazása azonban nem terjedt el, mert ez egy általában 1,5-2 kbp (kilobázispár, ezer bp) hosszú szakasz, melynek PCRamplifikálása a gyakorlatban jóval nehezebb.

A funkcióból következő szelekciós nyomás különböző mértékéből adódó szekvencia-változatosság különbségek további következménye, hogy az invariábilis szakaszokba könnyen tervezhetők univerzális (széles taxonómiai spektrumot lefedő) PCR primerek. Az nrITS amplifikálására használt leggyakrabban alkalmazott primerpár (White *et al.* 1990) a 18S génszakaszba kötő ITS1 primer és párja, a 26S génszakaszba kötő ITS4 primer alkalmas valamennyi eukarióta nrITS-ének felszaporítására. Ugyanakkor a fenti primerek hosszának növelésével szűkíthető a primerek által lefedett taxonómiai spektrum, pl. a Rudnóy Szabolcs által tervezett ITS1A primer (Gulyás *et al.* 2005) specifikusan alkalmas a zárvatermő növények nrITS-ének felszaporítására.

Az nrITS további előnyös tulajdonsága biparentális öröklésmenete, amely – szerencsés esetben – alkalmas eltérő nrITS szekvenciákkal bíró szülők hibridjének kimutatására, mert a hibrid a két szülő jellemző ribotípusait keverten fogja tartalmazni (Baldwin *et al.* 1995, Álvarez & Wendel 2003). A magas kópiaszám és a zárvatermőkben átlagos 500-700 bp hossz megkönnyíti ennek a régiónak a PCR-amplifikálását, és már viszonylag kis labortapasztalat is elegendő az nrITS sikeres felszaporításához.

Az nrITS-hez hasonlóan több, egymás után rendeződött másolatban jelen lévő génszakaszok (az ún. multi-gén családok, "multi-gene families") roppant sajátos vonása, hogy az egyes NOR lókuszok nem egymástól függetlenül, hanem egymással összehangolva evolválódnak (ezt a jelenséget "concerted evolution" néven ismerik) (Elder & Turner 1995, Álvarez & Wendel 2003, Nei & Rooney 2005, Eickbush & Eickbush 2007). Ennek során az egyeden belüli szekvencia-változatok (ribotípusok) egy, általában a domináns változattal azonos ribotípussá alakulnak, homogenizálódnak. Ebben a folyamatban elsősorban olyan molekuláris mechanizmusok játszanak szerepet, mint az ismétlődő elemek közötti egyenlőtlen átkereszteződés ("unequal crossing-over") és a gyakori gén átalakítás ("high frequency gene conversion"). Ezek, populációgenetikai folyamatokkal együtt, vezettek ahhoz a korai feltételezéshez (Baldwin et al. 1995), hogy az nrITS fajon belül invariábilis, míg fajok között eltérő, ezért is teszik ezt a génszakaszt különösen alkalmassá nemzetség- és fajszintű filogenetikai vizsgálatokra. Habár már a korai munkák is kiemelték az együttes változatok jelenlétének lehetőségét, (és ilyen esetben a régió klónozását javasolták!) azt inkább kivételnek mint szabályszerűségnek tartották (Baldwin et al. 1995).

Az ezredforduló utáni években ugyanakkor egyre több bizonyíték gyűlt össze arra nézve, hogy hibridizációs esemény után az együttes evolúció nem mindig gyors folyamat, illetve nem mindig megy teljesen végbe (Bailey

et al. 2003), és jelentős egyeden belüli nrITS polimorfizmus lehet egyes növénycsoportokban jelen. Ezért hívta fel a fenti munka a figyelmet arra, hogy teljesen lezajlott együttes evolúció nem tételezhető fel bármely növénycsoport filogenetikai vizsgálatába kezdünk is. Ennek pedig alapvetően fontos következménye van az nrITS filogenetikai felhasználhatóságára.

Filogenetikai rekonstrukcióra ugyanis azok a (gyakorlatilag) neutrálisan öröklődő, homológ (közös őstől származó) génszakaszok alkalmasak, amelyek közti különbségek fajkeletkezésből származó eltéréseket tükröznek, azaz ortológok (Doyle & Gaut 2000, Avise 2004). Ha az adott genomon belül egy gén megduplázódik, és a duplikáció utáni kópiák közt szekvencia-eltérés áll fent, akkor azok nem fajkeletkezésből, hanem a duplikációból származó eltéréseket hordoznak, azaz paralógok (Doyle & Gaut 2000, Avise 2004). A paralógok bevonása a filogenetikai rekonstrukcióba komolyan félreviheti az eredmények interpretációját, hiszen a paralógok evolúciója nem tükrözi az adott szervezet evolúcióját (Doyle & Gaut 2000, Bailey et al. 2003, Avise 2004), mint ahogy az ortológoké igen. Az nrITS-ben pedig - akár hibridizációval, akár spontán mutációval keletkezhetnek egyeden (vagy populáción) belüli szekvencia-változatok, melyek paralógok, és korlátozzák a filogenetikai rekonstrukciót (Vollmer & Palumbi 2004). Ugyanakkor a paralógok mellett az nrITS változatok között ott vannak a fajok (vagy fajcsoportok) izolációjából, azaz a fajkeletkezési folyamatokból származó szekvencia-változatok, az ortológok is. Ezek "kiválogatása" kulcsfontosságúnak tűnik az nrITS paralógok jelenlétével jellemezhető fajokban. Ennek egy lehetőségét veti fel LaJeunesse & Pinzón (2007), akik a domináns változatok, mint igen valószínű ortológok használatát javasolják filogenetikai rekonstrukcióra. Érvelésük szerint, roppant kicsi az esélye annak, hogy egy hirtelen keletkező változat hosszabbrövidebb idő (több-kevesebb generáció) alatt az egész genomon (populáción)

belül szétterjedjen, és a legnagyobb számban előforduló változattá váljon. Sokkal nagyobb az esély arra, hogy a paralógok keletkeznek és eltűnnek, emiatt csak kis frekvenciával vannak jelen a genomon belül, míg az evolúciós időskálán mérhető ideig fennmaradók az uralkodó változatok, melyek nagy eséllyel ortológok.

Habár az itt közölt modell a paralógok roppant tetszetős, logikusnak tűnő kezelését veti fel, nevezetesen csak a genomon belül nagy gyakorisággal talált ribotípusokat használjuk filogenetikai rekonstrukcióra, nem veszi figyelembe az együttes evolúció azon lehetőségét, mely egy favorizált ribotípus (feltehetőleg a legstabilabb szekunder szerkezetű) gyors elterjedését segíti (Buckler et al. 1997, Eickbush & Eickbush 2007). Más szavakkal, feltételezi, hogy minden, az együttes evolúciónak kitett ribotípus azonos eséllyel esik át az ismétlődő elemek közötti egyenlőtlen átkereszteződés és a gyakori gén átalakítás folyamatán, és nincsenek favorizált ribotípusok. Ez pedig nincs így, pedig a fenti folyamat gyökeresen megváltoztathatja a genomon belüli paralóg összetételt, és a favorizált alak kiemelkedő mennyiségben várható. Másrészt azzal is számolnunk kell, hogy eltérő leszármazási vonalak (melyek feltehetőleg ortológ nrITS ribotípusokat hordoznak) hibridizációja során a két eltérő ortológ közötti egyenlőtlen átkereszteződés "kiméra" paralógokat hoz létre. Ezeket a folyamatokat figyelembe kell venni akkor, ha az nrITS-sel dolgozunk.

Az nrITS használatában további potenciális hibaforrást jelent a pszeudogének esetleges jelenléte. A pszeudogének olyan gének, amelyek kikerülnek a szelekciós kényszer alól, ezért szabadon, roppant nagy rátával mutálódnak (Bailey *et al.* 2003). Felismerhetők onnan, hogy bennük nagyon sok pontmutáció van, illetve hosszú régiók törlődtek, sokszor egyébként konzervatív génszakaszokon is (Buckler *et al.* 1997, Bailey *et al.* 2003), például az nrITS esetében a 5,8S génben. Az ilyen pszeudogének

használhatósága a filogenetikai rekonstrukcióban vitatott. A legtöbb szerző (Buckler *et al.* 1997, Álvarez & Wendel 2003, Bailey *et al.* 2003, Wörheide *et al.* 2004) általában elveti a pszeudogének használhatóságának lehetőségét, újabban mások (pl. Razafinamdimbison *et al.* 2004, Bayly & Ladiges 2007, Ochieng *et al.* 2007) a pszeudogének filogenetikai felhasználhatóságát tapasztalták. Valószínűleg a pszeudogének használhatósága az adott taxontól függ: egyes esetekben, ha a pszeudogének ortológoknak tekinthetők (lásd Ochieng *et al.* 2007), használhatóak filogenetikai rekonstrukcióra, míg más esetekben nem, és téves leszármazási viszonyokat tükröznek. Mindenesetre valószínű, hogy funkcionális paralógok (ideértve az ortológokat is) és pszeudogének nem vonhatók össze a vizsgálatokban, vagy csak az egyik, vagy pedig a másik típust kell használni. Mindenesetre bátran kijelenthető, hogy az nrITS klón szekvenciák válogatás nélküli bevonása a filogenetikai rekonstrukcióba (lásd pl. Devey *et al.* 2008) nagy valószínűséggel paralógok bevonásával jár, ami könnyen tévútra vezetheti a vizsgálatot.

Munkacsoportunk 2002-ben kezdett hozzá a bangó nemzetség egyes fajai közti hibridizáció események nrITS alapján történő vizsgálatához. Felismertük, hogy az nrITS-ben a hibridizációra utaló ún. kettős csúcsok (APS, "additive polymorphic sites") vannak, majd klónozással az egyes szülői ribotípusokat igyekeztünk elkülöníteni (részletesebben lásd 40. oldal). Meglepve tapasztaltuk azonban, hogy a hibrid eredetű Holuby-bangó egyik legvalószínűbb szülőjében, a poszméhbangóban is találunk APS-eket (Gulyás *et al.* 2005). A felmérések folytatásával, illetve mind földrajzi, mind taxonómiai értelemben kiszélesítésével (gyakorlatilag a poszméhbangó komplexre és annak áreájára tágítva) azt találtuk, hogy szinte a teljes poszméhbangó komplex adriato-mediterrán áreáján hibridizációra (és introgresszióra) utaló APS-eket találunk (10. ábra) az nrITS szekvenciákban (Gulyás 2007).



10. ábra Az nrITS paralógokat tartalmazó (világos kör) és a paralógokat nem tartalmazó (sötét kör), Gulyás (2007) által vizsgált bangó populációk. A közép-európai és adriato-mediterrán térségben leszármazási vonalak keveredésére (ún. varrat zóna) figyelhető meg.

Mivel az APS-eket tartalmazó nrITS szekvenciák csak korlátozottan alkalmazhatók filogenetikai rekonstrukcióra (hiszen a legtöbb filogenetikai program nem értelmezi a kettős csúcsokat), célul tűztük ki az *Ophrys fuciflora* fajkomplexen belül található közép-európai varrat zóna (leszármazási vonalak hibrid zónája) részletesebb vizsgálatát, az ortológ ribotípusok elkülönítését és bevonását a filogenetikai rekonstrukcióba, ezzel igyekezve mélyebb betekintést nyerni a fajkomplex evolúciós viszonyaiba.

2. Anyag és módszer

2.1. Növényanyag

A bangó nemzetség elterjedési területének nagy részéről kb. 2-4 cm²es levéldarabok és alsó murvalevelek terepi begyűjtését végeztük el 95 lelőhelyről származó (11. ábra) 119 *Ophrys* populációból (1. táblázat) 2003 és 2007 között. A mintákat a lelőhelyen 96%-os alkoholba helyeztük, majd felhasználásukig 4-5°C-on tartottuk. A taxonok meghatározásában és elnevezésében a teljes munka során Delforge (2005) könyvét követtük.



11. ábra A dolgozatban felhasznált 119 minta 95 lelőhelye (sötét körök) és a Fuciflora, Argolica és Sphegodes fajkomplexek (sensu Delforge 2005) elterjedési területe (szürke árnyalatú poligon)

					Besorolás			
			Szekvencia		Delforge (2005)		Devey et al. (2008)	
Taxon	Lelőhely	Rövidítés	direkt	klón	fajkomplex	fajcsoport	klád	
O. aeoli	Gr: Astypaleia	aeoAst	1		fuciflora	bornmuelleri	NA	
O. apifera	Hu: Balatonfüred	apiBal	2		fuciflora	apifera	apifera*	
O. apulica	It: Céglie Messápica	apuCeg	1	10	fuciflora	fuciflora	scolopax & fucilora *	
O. apulica	It: Locorotondo	apuLoc	2	12	fuciflora	fuciflora	scolopax & fucilora *	
O. apulica	It: Mattinata	apuMat	1	10	fuciflora	fuciflora	scolopax & fucilora *	
O. apulica	It: Sannicandro Garganico	apuSan	1	13	fuciflora	fuciflora	scolopax & fucilora *	
O. attica	Cr: Riza	attRiz	2		fuciflora	umbilicata	umbilicata	
O. attica	Gr: Githio	attGit	1		fuciflora	umbilicata	umbilicata	
O. attica	Gr: Pylos	attPyl	2	9	fuciflora	umbilicata	umbilicata	
O. biancae	Si: Noto Antica	biaNot	2		fuciflora	bornmuelleri	fuciflora	
O. biancae	Si: Palazzolo Acréide	biaPal	3	15	fuciflora	bornmuelleri	fuciflora	
O. bornmuellerii	Cy: Neo Chorion	borNeo	3	7	fuciflora	bornmuelleri	umbilicata *	
O. brachyotes	Ga: Saint-Pierre d'Allevard (loc. class.)	braSai	1	10	fuciflora	tetraloniae	NA	
O. brachyotes	It: San Bernardo	braSan	1	10	fuciflora	tetraloniae	NA	
O. calliantha	Si: Carlentini	calCar	1		fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. calliantha	Si: Noto	calNot	1	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. calypsus	An: Datça	cayDat	1		fuciflora	heldreichii	scolopax	
O. calypsus	Gr: Lipsi	cayLip	1		fuciflora	heldreichii	scolopax	
O. calypsus	Rh: Kattavia	cayKat	1		fuciflora	heldreichii	scolopax	
O. candica	Rh: Apollona	canApo	2		fuciflora	bornmuelleri	scolopax	

1. táblázat A vizsgált bangó populációk és besorolásuk különböző irodalmak alapján.

* klónozott minta ill. NA nem vizsgált faj Devey et al. (2008) tanulmányában

folytatva

Taxon	Lelőhely				Besorolás			
		Rövidítés	Szekvencia		Delforge (2005)		Devey et al. (2008)	
			direkt	klón	fajkomplex	fajcsoport	klád	
O. celiensis	It: Céglie Messápica (loc. class.)	celCeg	2	9	fuciflora	fuciflora	NA	
O. cerastes	Ae: Chios	cerChi	1		fuciflora	oestrifera	NA	
O. ceto	Ae: Chios	cetChi	2		fuciflora	oestrifera	NA	
O. ceto	Rh: Laerma	cetLae	2		fuciflora	oestrifera	NA	
O. cornutula	Gr: Epirus	corEpi	1		fuciflora	oestrifera	NA	
O. cornutula	Rh: Kattavia	corKat	2	10	fuciflora	oestrifera	NA	
O. dodekanensis	Rh: Apollona	dodApo	1		fuciflora	oestrifera	scolopax	
O. elatior	Ge: Bad Bellingen	elaBad	3	8	fuciflora	tetraloniae	NA	
O. episcopalis	Cr: Agios Vasilios	epiAgi	2		fuciflora	bornmuelleri	scolopax	
O. episcopalis	Rh: Charaki	epiCha	2		fuciflora	bornmuelleri	scolopax	
O. flavomarginata	Cy: Lefkara	flaLef	2	5	fuciflora	umbilicata	NA	
O. fuciflora	Au: Klosterneuburg	fucKlo	1	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Au: Perchtoldsdorf	fucPer	2	8	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Be: Tienne Bremount	fucTie	1		fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Be: Torgny	fucTog	1	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Cro: Bale	fucBal	3	11	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Fr: Bédoin	fucBed	1	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Ga: San Laurent du Pont	fucSan	2		fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Ge: Landsberg am Lech	fucLan	1	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora	
O. fuciflora	Hu: Maróc	fucMar	3	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora	

1. táblázat A vizsgált bangó populációk és besorolásuk különböző irodalmak alapján. (folytatás)

* klónozott minta ill. NA nem vizsgált faj Devey et al. (2008) tanulmányában

folytatva
						Besoro	lás
			Szekv	vencia	Delfor	ge (2005)	Devey et al. (2008)
Taxon	Lelőhely	Rövidítés	direkt	klón	fajkomplex	fajcsoport	klád
O. fuciflora	It: Barrea	fucBar	3	13	fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. fuciflora	It: Gavelli	fucGav	2	9	fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. fuciflora	It: Palena	fucPal	2	13	fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. fuciflora	It: Torri del Benaco	fucTor	4	8	fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. fuciflora	Rh: Epta Piges	fucEpt	2		fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. gracilis	Fr: Beaufort	graBea	2	10	fuciflora	fuciflora	NA
O. gracilis	It: Forli del Sannio	graFor	3	14	fuciflora	fuciflora	NA
O. gracilis	It: Gavelli	graGav	2		fuciflora	fuciflora	NA
O. gracilis	It: Vandra	graVan	2	12	fuciflora	fuciflora	NA
O. heldrechii	Cr: Spili	helSpi	1		fuciflora	heldreichii	scolopax
O. heldreichii	Cr: Ardaknos	helArd	1		fuciflora	heldreichii	scolopax
O. heldreichii	Cr: Kamilari	helKam	1		fuciflora	heldreichii	scolopax
O. heterochila	Rh: Embonas	hetEmb	2		fuciflora	bornmuelleri	NA
O. holubyana	Cz: Velká nad Veličkou	holVel	1	10	fuciflora	oestrifera	NA
O. holubyana	Hu: Balatonfüred	holBal	3	9	fuciflora	oestrifera	NA
O. holubyana	Sl: Krásna Ves	holKra	2		fuciflora	oestrifera	NA
O. holubyana	Sl: Šípkov	holSíp	4	10	fuciflora	oestrifera	NA
O. kotschyi	Cy: Akrotiri	kotAkr	3	10	fuciflora	umbilicata	NA
O. lacaena	Gr: Skoutari	lenSko	1		fuciflora	bornmuelleri	NA
O. lacaitae	It: Calvello	lacCal	4	13	fuciflora	fuciflora	fuciflora & sphegodes

1. táblázat A vizsgált bangó populációk és besorolásuk különböző irodalmak alapján. (folytatás)

* klónozott minta ill. NA nem vizsgált faj Devey et al. (2008) tanulmányában

folytatva

						Besore	olás
			Szekv	vencia	Delforg	ge (2005)	Devey et al. (2008)
Taxon	Lelőhely	Rövidítés	direkt	klón	fajkomplex	fajcsoport	klád
O. lacaitae	It: Forli del Sannio	lacFor	1	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora & sphegodes *
O. lacaitae	Si: Ferla-Pantalica	lacFer	1	16	fuciflora	fuciflora	fuciflora & sphegodes *
O. minutula	Ae: Chios	minChi	1		fuciflora	oestrifera	scolopax *
O. oestrifera	Cro: Žman	oesZma	4	10	fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera	Gr: Kalamata	oesKal	2		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera	Gr: Litohoron	oesLit	2		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera	Gr: Megali Mandinia	oesMeg	1		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera	Rh: Apolakkia	oesApo	2		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera	Ua: Inkerman	oesInk	1		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera	Ua: Nikita	oesNik	1		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera subsp. bicornis	Hu: Budapest	oesBud	3		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera subsp. bicornis	Hu: Dabas	oesDab	2		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera subsp. bicornis	Hu: Kunpeszér	oesKun	3		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera subsp. bicornis	Hu: Pécs (loc. class.)	oesPec	5	10	fuciflora	oestrifera	apifera
O. oestrifera subsp. bicornis	Hu: Siklós	oesSik	4		fuciflora	oestrifera	apifera
O. oxyrrhynchos	Si: Carlentini	oxyCar	1		fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. oxyrrhynchos	Si: Ferla-Pantalica	oxyFer	2	10	fuciflora	fuciflora	fuciflora
O. oxyrrhynchos	Si: Palazzolo Acréide	oxyPal	3	11	fuciflora	fuciflora	fuciflora

1. táblázat A vizsgált bangó populációk és besorolásuk különböző irodalmak alapján. (folytatás)

* klónozott minta ill. NA nem vizsgált faj Devey et al. (2008) tanulmányában

folytatva

						Besord	olás
			Szekv	vencia	Delfo	rge (2005)	Devey et al. (2008)
Taxon	Lelőhely	Rövidítés	direkt	klón	fajkomplex	fajcsoport	klád
O. parvimaculata	It: Sannicandro Garganico	parSan	1	8	fuciflora	bornmuelleri	NA
O. picta	Lu: Santa Barbara de Nexe	picSan	2		fuciflora	scolopax	NA
O. picta	Lu: Sao Bras de Alportel	picSao	2		fuciflora	scolopax	NA
O. picta	Tn: Jabbes2	picJab	3		fuciflora	scolopax	NA
O. posidonia	It: Laurino	posLau	1	8	fuciflora	tetraloniae	NA
O. rhodia	Cy: Pissouri	rhoPis	2		fuciflora	oestrifera	umbilicata *
O. rhodia	Rh: Lindos	rhoLin	1		fuciflora	oestrifera	umbilicata *
O. santonica	Fr: Canals	sanCan	1	10	fuciflora	tetraloniae	NA
O. santonica	Fr: Vallier	sanVal	1	10	fuciflora	tetraloniae	NA
O. scolopax	Fr: Galargue	scoGal	1	10	fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Ga: StVallier de-Thiey	scoSai	4	7	fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Hs: Alhaurin el Grande	scoAlh	2		fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Hs: Castillo d. Rugoll	scoCas	4	8	fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Lu: Santa Barbara de Nexe	scoSan	2		fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Lu: Sao Bras de Alportal	scoSao	2		fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Lu: Serra de Sico	scoSer	1		fuciflora	scolopax	scolopax
O. scolopax	Tn: Dar Chichou	scoDar	2		fuciflora	scolopax	scolopax
O. serotina	It: Pico	serPic	2		fuciflora	tetraloniae	NA
O. serotina subsp. lorenae	It: Grizzana Morandi	serGri	2	10	fuciflora	tetraloniae	NA
O. sphegifera	Tn: Jabbes2	sphJab	2		fuciflora	scolopax	fuciflora

1. táblázat A vizsgált bangó populációk és besorolásuk különböző irodalmak alapján. (folytatás)

* klónozott minta ill. NA nem vizsgált faj Devey et al. (2008) tanulmányában

folytatva

						Besore	olás
			Szekv	vencia	Delfo	rge (2005)	Devey et al. (2008)
Taxon	Lelőhely	Rövidítés	direkt	klón	fajkomplex	fajcsoport	klád
O. tetraloniae	It: Forli del Sannio	tetFor	2	14	fuciflora	tetraloniae	NA
O. tetraloniae	It: Vandra	tetVan	1	10	fuciflora	tetraloniae	NA
O. umbilicata	Ae: Chios	umbChi	2	10	fuciflora	umbilicata	umbilicata
O. umbilicata	An: Kizilkir	umbKiz	2		fuciflora	umbilicata	umbilicata
O. umbilicata	Cy: Kato Drys	umbKat	1	8	fuciflora	umbilicata	umbilicata
O. untchjii	Cro: Bale	untBal	2		fuciflora	tetraloniae	NA
O. zinsmeisteri	Cro: Pavičini	zinPav	1		fuciflora	heldreichii	NA
O. argolica	Gr: Githio	argGit	2	10	argolica	argolica	NA
O. ariadnae	Cr: Spili	ariSpi	2	10	argolica	reinholdii	NA
O. biscutella	It: Cagnano Varano	bisCag	2		argolica	argolica	sphegodes
O. crabronifera	It: Alberese	craAlb	4	9	argolica	argolica	NA
O. cretica	Cr: Rethimna	creRet	3	10	argolica	reinholdii	sphegodes
O. cretica	Rh: Kattavia	creKat	3	9	argolica	reinholdii	sphegodes
O. cretica subsp. bicornuta	Cr: Makrigialos	creMak	3	10	argolica	reinholdii	sphegodes
O. elegans	Cy: Neo Chorion	eleNeo	3		argolica	argolica	NA
O. gortynia	Cr: Makrigialos	gorMak	1		argolica	mammosa	sphegodes
O. helenae	Gr: Arta	hleArt	1		argolica	mammosa	NA
O. lucis	Gr: Archipoli	lucArc	2		argolica	argolica	NA
O. morisii	Corse: St Florent	morSai	1		argolica	argolica	sphegodes
O. reinholdii	Cr: Nectaros	reiNec	3	10	argolica	reinholdii	sphegodes
O. reinholdii	Gr: Pigi	reiPig	2	10	argolica	reinholdii	sphegodes

1. táblázat A vizsgált bangó populációk és besorolásuk különböző irodalmak alapján. (folytatás)

Mintáink legnagyobb része (105 populáció) az Ophrys nemzetség Fuciflora fajkomplexéből (sensu Delforge 2005) származik, míg kisebbik hányada (14 populáció) a Delforge (2005) által testvérkládnak tartott (3. ábra), és a Sphegodes komplex felé átvezetőként értékelt Argolica fajkomplexből származott. Korábbi vizsgálatok (Soliva et al 2002, Bateman et al. 2003, Devey et al. 2008) világosan megmutatták, hogy a Fuciflora -Argolica Sphegodes fajkomplexeknek legközelebbi rokona, testvércsoportja az Apifera csoport, így az ide tartozó méhbangó (Ophrys apifera Huds.). Ezért - mint legközelebbi testvércsoportot - ezt a fajt használtuk külcsoportként a vizsgálatokban, noha Delforge (2005) - a molekuláris információk fényében tévesen – a Fuciflora komplexbe helyezi ezt a fajt (lásd 1. táblázat). A belcsoporton belül részletesen csak a Fuciflora komplexbe sorolt populációkat vizsgáltuk, hiszen erre irányult eddigi mintagyűjtésünk, mellyel a Delforge (2005) által említett taxonok (77 faj) 52%-át (40 faj) fedtük le. Egyes, széles elterjedésű fajok (mint pl. az Ophrys fuciflora (F. W. Schmidt) Moench, O. oestrifera M. Bieb., O. scolopax Cav.) több populációval szerepelnek az adatsorban. A gyengébben mintázott (ide sorolt fajszám 24 %-át szekvenáltuk) Argolica komplex szekvenciáit csak összehasonlításul használtuk fel, részletesebb vizsgálatoknak nem tettük ki.

2.2. DNS kivonás, az nrITS PCR amplifikálása és direkt szekvenálása

Az alkoholban tárolt levéldarabokból módosított CTAB-módszerrel (Doyle & Doyle 1987) vontuk ki a teljes genomiális DNS-t. Ennek során hozzávetőleg 50 g mintát gyümölcsszárítóban megszárítottunk, majd spatulahegynyi kvarchomok és vízoldhatatlan PVP (polivinil-pirrolidon) hozzáadása után dörzsmozsárban folyékony N₂ alatt lisztfinomságig porítottunk. Ezt követően 750 μl CTAB oldatot (2% CTAB, 100 mM Trisz-

HCl, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA) adtunk a mintákhoz, mely 3% vízoldékony PVP-t és 2‰ β-merkapto-etanolt tartalmazott, és a teljes szuszpenziót rázótermosztátban minimum 45 percig 63°C-on inkubáltuk. 16 550 g-n történő 10 perces pellettizálás után a felülúszóhoz 1 térfogatnyi (750 µl) 24:1 arányú kloroform izoamil-alkohol elegyet adtunk, majd tíz perc óvatos rázogatás után 10 percig 16 550 g-n centrifugáltunk, és a felülúszót óvatosan átpipettáztuk üres csövekbe. Utóbbi, fehérjéket kicsapó tisztítást egyszer megismételtük, majd az átszívott felülúszóhoz 2,5-szeres térfogatú -20°C-os 96%-os etanolt adtunk, és hogy a DNS-CTAB-komplexet nagyobb hatásfokkal kicsapjuk, a mintákat legalább fél órára -20°C-ra helyeztük. Ezután 16 550 g-n 30 percig pellettizáltuk a mintát, majd a kapott DNS-CTAB pellettet kétszer 200 µl-nyi, -20°C-os 70%-os etanollal mostuk, a mosások között 6 perces 3420 g-n történő centrifugálásokkal. A felülúszókat minden esetben leöntöttük a pellettekről, és végül a pellettet 35°C-os termosztátban megszárítottuk. A kiszárított DNS pellettet 40 µl steril 0,1 M Trisz pufferben (pH=8) oldottuk fel.

Az így kapott DNS kivonat kvantifikálását – a kivonat inhomogén volta miatt – nem végeztük el fotometriás méréssel, hanem a korábbi tapasztalatok [hígítási sorok PCR-amplifikálása, lásd Gulyás (2007)] alapján 1 µl templátot vittünk a PCR reakcióelegybe, melyet steril Milli-Q vízzel 25 µl-re egészítettünk ki. Ehhez a mintához adtuk az alábbi PCR-keverék ("master mix") 25 µl-jét, melynek összetétele – egy egységre vonatkoztatva – az alábbi volt: 8,75 µl steril Milli-Q víz, 5 µl 10×-es reakciópuffer (Fermentas), 5 µl mindegyikre 2mM-os dNTP keverék (Fermentas), 4 µl 25mM-os MgCl₂ oldat (Fermentas), 1 µl 10 mM-os ITS1A primer (Gulyás *et al.* 2005) mint előre ("forward") irányú primer, 1µl 10 mM-os ITS4 primer (White *et al.* 1990) mint hátra ("reverse") irányú primer és 0,25 µl 5U/µl-es Taq-polimeráz (Fermentas). Így a PCR-elegy végtérfogata 50 µl volt, mely

minták amplifikálását 0,2 ml-es csövekben az alábbi paraméterekkel programozott PCR-készülékben (Perkin-Elmer GeneAmp 2400) végeztük el: iniciális denaturáció 94°C-on 4 perc 30 másodpercig, majd 33 ciklus az alábbiak szerint: 30 másodperc denaturáció 94°C-on, 30 másodperc primerkötés (hibridizáció) 51°C-on, majd 30 másodperc DNS-szintézis (elongáció) 72°C-on, illetve ciklusonként 1 másodperccel növelve az időt 63 másodpercig. 33 ciklus után 7 perces, 72°C-os végső szintézis szakasz következett, majd a készülék 4°C-os eltartással fejezte be a programot. A PCR-amplifikáció sikerét 1%-os, 0,06 ‰ etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen ellenőriztük úgy, hogy 6 µl mintát vettünk a PCR-termékekből, majd azt kb. 0,8 µl feltöltő festékkel ("loading dye", Fermentas) keverve a gélre töltöttük. 45 perces, 100 V-os elektroforézis után UV-fényben vizsgáltuk a gélt, és csak az erős csíkot adó PCR-termékeket vizsgáltuk tovább.

A PCR-termék tisztítását Montague szűrőegység (Millipore) segítségével végeztük el. Az ultraszűrő membrán fölé helyezett PCR-terméket 2180 g-n 15 percig centrifugáltuk, mely során a fölösleges kismolekulasúlyú anyagok (be nem épült dNTP, primerek, DNS-polimeráz, sók, stb.) a membránon átmentek, míg a nagyobb súlyú, frissen amplifikált DNS nem, így azt a membránról – a szűrőt megfordítva – tiszta oldatba lehetett vinni 30 μl steril Milli-Q vízzel.

A felszaporított nrITS DNS-szakaszok bázissorrendjét lánc-termináló ciklikus szekvenáló-PCR módszerrel derítettük fel. Ennek során 3 µl tisztított PCR-termékhez 9 µl szekvenáló PCR-keveréket [összetétele egy egységre vetítve: 4 µl steril Milli-Q víz, 1,5 µl hígító puffer (Applied Biosystems), 0,75 µl 10 µM-os ITS1A primer, 1 µl Big Dye Terminator v. 3.1 (egyes esetekben v. 1.1, mindkettő Applied Biosystems)] adtuk, majd a 10 µl-nyi elegyet szekvenáló PCR-reakcióba vittük, az alábbi körülmények szerint

programozott PCR-készülékbe (Perkin-Elmer GeneAmp 2400): 4 perces iniciális denaturáció 96°C-on, majd 32 ciklus az alábbiak szerint: 30 másodperc denaturáció 96°C-on, 15 másodperc primerkötés 50°C-on, szintézis 4 percig 60°C-on, majd a ciklusokat követően 4 perc elongáció 60°C-on, végül eltartás 4°C-on. A szekvenáló reakció eredményeképp kapott szekvenált DNS-t (szekvenáló-PCR terméke vagy szekvenátum) alkoholos kicsapással tisztítottuk meg. Ennek során a 10 µl szekvenátumot 42 µl 75%os izo-propanollal kevertük össze, majd 20 percet sötétben inkubáltuk, ezután 18 620 g-n 30 percig pellettizáltuk, majd a felülúszót leöntöttük. A cső alján lévő, láthatatlan pellettet kétszer mostuk 150 µl 80%-os, -20°C-os etanollal, amit 10 percig 18 620 g-n fugáltunk. Végül újra leöntöttük a felülúszót, és a pellettet lefelé fújó steril fülkében szárítottuk be. A tisztított és beszárított mintákat a Biomi Kft. gödöllői laboratóriumában futtattuk meg.

2.3. Klónozás

Azon minták egy részében (lásd eredmények), ahol a direkt nrITS szekvenciákban leszármazási vonalak keveredésére utaló kettős csúcsokat (APS-ek, lásd 29. oldal) találtunk klónozást végeztünk. Mint említettem, az olyan, nagy másolatszámban jelen lévő génszakaszok, mint a nrITS esetében nem csak egy ribotípus lehet jelen az egyeden belül. Miután a direkt szekvenálás során számos nrITS másolat szolgál alapot a PCR-amplifikáláshoz, ha több szekvencia-változat (ribotípus) van jelen, akkor a direkt szekvenciákban kettős csúcsok (APS-ek, lásd bevezetés) utalnak az egyeden belüli polimorfizmusra, az ún. SNP (ejtsd: "sznip"), azaz "single nucleotide polymorphism" variabilitásra (Vignal *et al.* 2002, Morin *et al.* 2004). A SNP-ek, ahogy az angol névből is adódik, olyan nukleotid variabilitást jelölnek, ahol egy bizonyos nukleotid helyen egynél több

nukleotis (A, G, C, vagy T) van jelen a populációban (Morni *et al.* 2004). Az nrITS esetében észlelt APS-ek egyeden belüli SNP-re utalnak, amelyet klónozással lehet feltárni. A klónozás az egyeden belüli ribotípusok elkülönítését teszi lehetővé, mert ennek során egy kompetens baktériumsejt által a PCR-reakcióban kapott PCR-termékből (milliónyi nrITS kópia) egy darab "ragadós végekkel" ellátott nrITS másolatot vetetünk *in vitro* fel, majd a baktériumot megfelelő táptalajon elszaporítva osztódással identikus másolatokat tartalmazó telep létrehozására sarkallunk. Egy baktériumtelep így egy ribotípust fog hordozni, melyből a DNS kivonása után az nrITS PCRreakcióban felszaporítható, majd szekvenálható. Ha pedig több telepből végezzük el a szekvenálást, némi betekintést nyerünk az egyeden belüli ribotípus-összetételbe.

A fenti gondolatmenetnek megfelelően a PGem T Vector System (Promega) klónozó készlet segítségével végeztük el a APS-eket hordozó nrITS-szekvenciájú Ophrys egyedek egy részének klónozását, mindenütt ragaszkodva a gyártó által közölt használati útmutatóhoz. Ennek során a ragadós végűvé tett, kiválasztott PCR-termékeket (ugyanazt, amelyből korábban a APS-eket hordozó direkt szekvenciákat kaptuk) JM109-es szuperkompetens sejtekbe (Promega) illesztettük, olyan mesterséges kromoszómán (mesterséges plazmid), amely tartalmaz néhány olyan enzimet, mely lehetővé teszi a plazmidot (így a mi inzertünket, az nrITS-t) is felvett sejtnek a növekedést egyébként letális környezetben. A mesterséges plazmid felvetetése után a sejteket inkubáljuk, majd ampicillint (a baktériumok számára letális baktericid), X-galaktózt (felhasználhatatlan, mérgező tápanyag) és IPTG-t (fetékanyag) tartalmazó LB-agarra szélesszük, és inkubáljuk. Itt tértünk kicsit el a gyári klónozási protokolltól, mert csak 50 µl kompetens sejtet szélesztettünk ki egy LB-agaros lemezre. Mivel a táptalaj számos olyan anyagot tartalmazott, mely a baktériumok fejlődését gátolja,

egy éjszakás inkubálás után csak azok nőttek ki, és alkottak telepet, amelyek tartalmazták az általunk beültetett plazmidot, benne a gátló anyagokat lebontó enzimeket és az nrITS-t.

A fehér színű telepekből 5-16 darabot véletlenszerűen kiválasztva steril fogpiszkálóval leszedtük az LB-agar felszínéről, majd külön-külön 50 µl steril Milli-Q vízbe mostuk. Ezt 5 percig 98°C-ra hevítettük, majd 18 620 g-n 3 percig centrifugáltuk, hogy aztán a felülúszó 45 µl-jét leszívva a baktériumokból az nrITS inzetünket tartalmazó DNS-t kinyerjük. Ezt a felülúszót vittük a direkt szekvenciák generálásánál leírt PCR-reakcióba, majd a reakció eredményeképp kapott PCR-termékek egy részét ugyanúgy kezeltük, mint a direkt szekvenciákat eredményező PCR-termékeket, más részét (a vizsgálatok későbbi szakaszában) kiküldtük a Macrogen Inc. (Dél-Korea) céghez, mely a PCR-termékek tisztítását majd lánc-termináló, ciklikus szekvenálását és futtatását elvégezte.

2.4. Adatanalízis

A szekvenátumok futtatásával eredményül kapott elektroferogrammokat Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty.) programmal figyelmesen végignéztük, az egyértelmű szekvenálási hibából adódó báziscseréket kijavítottuk. A direkt szekvenciák esetében a csak itt előforduló APS-eket ún. IUPAC bizonytalansági szimbólumokkal (Cornish-Bowden 1985) kódoltuk. Habár a IUPAC szimbólumokat eredetileg a bizonytalanul olvasható bázisok (pl. C vagy T) jelzésére vezették be, mi abban az értelemben használjuk, ha két bázis ugyanazon a helyen egyszerre jelenik meg (pl. C és T = Y, lásd 12. ábra). A javított szekvenciákat FASTA formátumba exportáltuk.

A többváltozós elemzéseket ter Braak & Smilauer (2002) CANOCO v4.5 programcsomagjával végeztük el.



12. ábra APS-ek és kódolásuk IUPAC szimbólumokkal a direkt szekvenciákban. Különböző APS-ek láthatók a 12., 14., 15. és 16. helyeken.
A 12. helyen pl. C és T egyszerre jelenik meg, amit Y-nal kódoltunk

A FASTA fájlt a MEGA v4.0 (Tamura et al 2007) ClustalX algoritmusával, alapbeállítások alapján illesztettük el. Az illesztett fájlt a BioEdit v7.0.5 (Hall 1999) szekvencia-olvasó program segítségével vizsgáltuk. Ennek során a feltűnően sok pontmutációt és/vagy nagy deléciókat hordozó szekvenciákat, mint feltételezhető pszeudogéneket, töröltük az adathalmazból. A maradék szekvenciák között az 1% alatti pontmutációkat Vignal et al. (2002) útmutatása alapján figyelmen kívül hagytuk az elemzések során. Ezzel a lépéssel ugyan felülírtuk az eredeti szekvenciákat, de nagy valószínűséggel PCR-hibából adódó szekvenciákat vagy egyeden belüli paralógokat javítottunk át. A javított, immár már csak a valódi SNP-eknek tekinthető mutációkat tartalmazó szekvenciákból a Collapse v1.2 (elérhető: http://darwin.uvigo.es) program segítségével képeztünk ribotípusokat. A ribotípusok közti leszármazási viszonyt a TCS v1.21 (Clement et al. 2000) haplotípus-hálózat építő programmal mutattuk be. Az illesztett szekvenciák evolúcióját legjobban leíró modellt a Modeltest v3.7 (Posada & Crandall 1998) segítségével választottuk ki. Az itt kapott

44

modellt használtuk fel a filogenetikai törzsfarekonstrukció során a MEGA programmal lefuttatott "szomszéd-csatolás" ("Neighbor-Joining", NJ) módszerével készített törzsfa, és az ún. bayesi utólagos valószínűségek ("Bayesian posterior probability", BP) módszerével, a MrBayes v.3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) programmal készített törzsfa esetében. Az evolúciós modell használatát nem igénylő maximum parszimónia ("Maximum Parsimony", MP) törzsfarekonstrukciót is végeztünk a MEGA program segítségével. A NJ és MP módszerrel kapott törzsfák elágazásainak statisztikai támogatottságát "bootstrap" módszerrel, a MEGA program segítségével számítottuk ki. Mivel általában több hasonlóan legvalószínűbb, illetve legtakarékosabb törzsfát kaptunk, ezeket konszenzus törzsfakereséssel mutattuk be, csak az 50% feletti gyakoriságú elágazásokat jelenítve meg ("Majority Rule" módszer) MEGA programban. A klónozások során egyedenként számos klónt (átlag±szórás: 10,1±1,93) szekvenáltunk, hogy azt populációgenetikai módszerekkel elemezzük. Ezzel elfogadtuk azt a feltételezést, hogy a klónozott egyed leszekvenált klónjai reprezentálják a populációt, ami nem feltétlenül igaz, hiszen ezt nem vizsgáltuk.

Az egyedek közti, a ribotípusok gyakoriságának különbségéből adódó genetikai differenciálódást AMOVA (Analysis of Molecular Variance) vizsgálattal elemeztük az Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.* 2005) programcsomag segítségével. Az AMOVA egy olyan, populációs elkülönülést vizsgáló nem-parametrikus statisztikai módszer, mely különböző elkülönülést okozó hipotézisek statisztikai vizsgálatára alkalmas a populációk allélfrekvanciái alapján (Lowe *et al.* 2004). A módszer hierarchikus alkalmazás esetén három F-statisztikát (fixációs indexet) kapunk, melyeket a genetikai varianciából vezetünk le (F_{ST} : a populációkból véletlenszerűen választott minták genetikai varianciája a teljes populációhoz képest; F_{CT} : egy alcsoporton belülről véletlenszerűen választott minták genetikai varianciája a

teljes populációból választottakhoz képest; F_{SC}: egy populáción belülről véletlenszerűen választott minták genetikai varianciája az alcsoport populációból választottakhoz képest). Ezek egy adott csoportból véletlenül kiválasztott egyedpár genetikai varianciáját hasonlítják össze egy tágabb csoportosításból véletlenszerűen kiemelt egyedpár genetikai varianciájával, így mutatva be a genetikai változatosság viszonylagos felosztását a vizsgált csoportok között. Ezen indexek permutációs vizsgálatával teszteli az elkülönülés statisztikai valószínűségeit. A végeredményül kapott táblázatban a módszer becsli az előre megadott csoportok közti, csoportokon belüli populációk közti és populációkon belüli felosztott genetikai változatosságot, és ennek szignifikanciáját. Amennyiben szignifikánsan nagyobb variabilitást találunk az előre definiált csoportok között, mint a csoportokon belül, akkor a tesztelt csoportosítás genetikai differenciációért felelős. A vizsgálat során feltételeztük, hogy a klónozott egyed reprezentálja az adott populációt, ami nem feltétlenül igaz, hiszen ezt nem vizsgáltuk, azaz egy populációból napjaink gyakorlatának megfelelően – csak egy klónozást készítettünk, és nem többet.

Az előre definiált csoportosításokat úgy igyekeztünk megadni, (más szavakkal: a tesztelendő hipotetikus csoportokat úgy alakítottuk ki,) hogy valamilyen biológiai csoportosítási elvet tesztelhessünk. Így hierarchikus AMOVA-val teszteltük a genetikai differenciációt 1.) a Delforge (2005) által felállított fajok közt; 2.) a Delforge (2005) által megadott fajcsoportok közt (lásd 1. táblázat); 3.) földrajzi régiók közt; 4.) a virágzási idő alapján képzett fenológiai csoportok közt.

A földrajzi régiók esetében a mintákat 5 csoportba soroltuk: 1. Szicília, 2. közép Olaszország, 3. Alpok és környéke, 4. Alpoktól nyugatra, 5. Alpoktól keletre lévő minták (13. ábra).



13. ábra Az AMOVA vizsgálat során alkalmazott földrajzi csoportosítás. a) A vizsgálatokba bevont 38 populáció földrajzi helyzete. b) A vizsgálatokba bevont populációk és azok relatív ribotípus összetétele. A piros vonal az előre magadott földrajzi csoportokat választja el.

A virágzási idő alapján képzett fenológiai csoportokat Delforge (2005) összefoglaló munkájában közölt virágzási adatok alapján – és saját tereptapasztalatainkat figyelembe véve – alakítottuk ki (14. ábra).



14. ábra A fenológiai izoláció vizsgálatához kialakított csoportosítás, és az ennek alapjául szolgáló, Delforge (2005) munkájában közölt a virágzási idők.

3. Eredmények

3.1. Direkt szekvenciák illesztése és ribotípusai

A direkt szekvenálások során 230 egyed nrITS szekvenciáját szekvenáltuk, melyek 119 populációt (populációnkénti átlag±szórás: 1,93±0,94 egyedet) mintáznak (lásd 1. táblázat). Ez 29 szekvencia bevonását jelenti a vizsgálatokba Gulyás (2007) munkájához képest. A 230 szekvencia bizonytalanság nélkül illeszthető volt, és 625 bp hosszú mátrixot eredményezett, melyben egy inzerció (a külcsoport, apiBal populációra jellemző) volt megfigyelhető. A variábilis helyek száma 28, míg a

parszimónia számára informatív helyek száma 18 volt (1. táblázat). A Collapse program a szekvenciákat 61 ribotípussá (unikális szekvenciává) vonta össze (2. táblázat). Ezek közül csupán 7 ribotípus (H01, H14, H16, H31, H48, H51, H56 és API) volt "tiszta", APS nélküli szekvencia, a többi (88,5%) nrITS génáramlásra utaló kettős csúcsokat hordozott (2. táblázat). Az APS-ek nélküli ribotípusok gyakoriságában jelentős eltérés volt. A leggyakoribb, H01-es ribotípust 68 szekvencia hordozta, ezt követte a H16, amely 23 szekvenciában volt jelen. Jelentős volt a H14 részesedése 9 szekvenciával, illetve a H31 5 szekvenciával. Megemlíthető még a H48, amely 2 szekvenciában volt jelen. A maradék két ribotípus csak egyszer fordult elő.

2. táblázat A vizsgált *Ophrys* populációk polimorf nrITS helyei, és ezek alapján képzett ribotípusai

											Рc	li	.mc	brf	Ēł	nel	Lye	€k												
												1	1	1	1	2	2	2	3	4	4	4	5	5	5	5	5	6	Ribot	APS
	1	1	1	1	1	2	5	6	7	9	9	0	1	4	7	0	1	2	8	1	1	5	0	4	4	5	7	1	ıpus	tipusa
	2	4	5	6	9	0	8	0	5	4	8	8	5	3	3	3	3	1	0	5	6	4	6	0	2	9	5	1		
apiBall	С	G	A	G	С	A	A	С	Т	A	G	С	С	С	A	A	G	A	A	A	Т	С	С	С	G	G	Т	Τ	API	NA
apiBal2		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	API	NA
aeoAst1	•					G	-		С		Т				Т		A		G				A	Т			С	С	H01	NA
apuCeg1	•				Т	G	-		С					Т	Т		A	Т	G			Y	A	Т			С	С	H02	APS1
apuLoc1	•					G	-		С				Y	Y	Т		A		G				A	Т			С	С	Н03	APS1+3
apuLoc2					Y	G	-		С					Y	Т		Α	W	G			Y	А	Т			С	С	H04	APS1
apuMat1			•		Y	G	-	•	С		•			Y	Т		A	W	G			Y	А	Т	•	Κ	С	С	H05	APS1
apuSan1			•		Y	G	-	•	С		Κ			Y	Т		A	W	G			Y	А	Т	•	•	С	С	H06	APS1
argGit1			•			G	-	Y	С		•		Y		Т		A		G				А	Т	•	•	С	С	H07	APS3
argGit2	•					G	-	Т	С	W			Т		Т		A		G				A	Т			С	С	H08	APS3
ariSpi1	•	•	•			G	-	Τ	С	W			Т		Τ		A	•	G	W	•	•	A	Τ	•	•	С	С	H09	APS3
ariSpi2		•	•	•		G	-	Τ	С		•	•	Т	•	Т	•	A	•	G	W	•	•	A	Т	•	•	С	С	H10	APS3
attGit1	Y	Κ	R	A		G	-	•	С		•	•		•	Т	•	A	•	G	•	Y	•	A	Т	A	•	С	С	H11	APS2
attPyl1	Y	Κ	R	R		G	-	•	С		•				Т		A		G		Y		А	Т	А	•	С	С	H12	APS2
attPyl2	Y	Κ	R	R		G	-	•	С		•	•		•	Т	•	A	•	G	•	•	•	A	Т	A	•	С	С	H13	APS2
attRiz1	Y	Κ	R	R		G	-	•	С		•				Т		A		G		Y		А	Т	А	•	С	С	H12	APS2
attRiz2	Y	Κ	R	R		G	-	•	С		•				Т		A		G		Y		А	Т	А	•	С	С	H12	APS2
biaNot1			•		Т	G	-	•	С		•			Т	Т		A	Т	G				А	Т	•	•	С	С	H14	NA
biaNot2			•		Т	G	-	•	С		•			Т	Т		A	Т	G				А	Т	•	•	С	С	H14	NA
biaPal1		•	•	•	Т	G	-	•	С	•	•	•	•	Т	Т	•	A	W	G	•	•	•	A	Т	•	•	С	С	H15	APS1
biaPal2	•	•	•	•	Т	G	-	•	С	•	•	•	•	Т	Т	•	Α	•	G	•	•	•	A	Т	•	•	С	С	H16	NA

biaPal3					Т	G	-		С					Τ	Т		A	W	G				A	Т			С	С	H15	APS1
bisCagl					Т	G	_		С					Т	Т		A	Т	G			Y	A	Т		K	С	С	H17	APS1
bisCag2					Y	G	_		С		K			Y	Т		A	W	G				A	Т			С	С	H18	APS1
borNeo1	Y	K				G	_		С						Т		A		G				A	Т	A		С	С	H19	APS2
borNeo2	Y	K	R	R		G	_		С						Т		A		G		Y		A	Т	A		С	С	H12	APS2
borNeo3	Y	K	R	R		G	_		С						Т		A		G		Y		A	Т	A		С	С	H12	APS2
braSai1					Y	G	_		С		K			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т		K	С	С	H20	APS1
braSan1					Y	G	_		С		K			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т		K	С	С	Н20	APS1
calCar1					Т	G	_		С					Т	Т		A	Т	G				A	Т			С	С	H14	NA
calNot1					Т	G	_		С					Т	Т		A	W	G			Y	A	Т		K	С	С	Н21	APS1
canApo1						G	_		С		Т				Т		A		G				A	Т			С	С	Н01	NA
canApo2						G	_		С		Т				Т		A		G				А	Т			С	С	H01	NA
cavDat1						G	_		С		Т				Т		A	÷	G			÷	А	Т			С	С	Н01	NA
cavKat1						G	_		Ċ		Т				T		A		G				A	Т			C	Ĉ	H01	NA
cavLipl						G	_		C		- Т				- Т		A		G				A	- Т			C	C	H01	NA
celCeq1	•	•	·	·	· Y	G	_	·	C	·	ĸ	•	•	• Y	Ť	•	Δ	W	G	·	•	·	Δ	T	•	•	c	C	H18	APS1
celCeg2	•	·	•	·	T	G	_	·	C	·	1.	·	•	т	T	•	Δ	T	G	·	·	· v	Δ	т	•	к	c	c	н17	APS1
cerChil	•	·	•	·	Ŧ	G	_	·	C	·	• T	•	·	Ŧ	Ť	•	Δ	Ŧ	G	•	·	Ŧ	Δ	T	·	11	c	c	н01	NA
cetChil	•	·	•	·	·	G	_	·	C	·	Ť	·	·	·	Ť	•	Δ	·	G	·	·	·	Δ	T	•	·	c	c	н01	NΔ
cotChi2	•	·	•	•	·	G	_	·	c	·	Ť	•	·	•	Ť	•	7	·	G	•	·	·	71	Ť	·	•	c	C	нот нот	N7
cett pol	•	·	·	·	·	G	_	·	C	·	Ť	·	·	·	т т	·	7	·	G	·	·	·	7	т т	·	·	c	C	1101 1101	NA NA
cetLael	·	·	•	•	·	G	_	·	C	·	т Т	•	•	·	т Т	•	A 7	·	G	•	·	·	A A	т т	•	·	C	C	H01	NA
cerEnil	•	·	·	·	·	G	_	·	C	·	Ť	·	·	·	т т	·	7	·	G	·	·	·	7	т т	·	·	c	C	1101 1101	NA NA
corEpii	·	·	•	•	·	G	_	·	C	·	T	•	•	·	T	•	A	·	G	•	·	·	A	T T	•	·	C	C	1101	NA
corKati	·	·	•	•	·	G	_	·	C	·	T	•	•	·	T	•	A	·	G	•	·	·	A	T T	•	•	C	C	1101	NA
COINAL2	•	·	·	·	·	G	_	·	C	·	T	·	·	·	T T	·	A	·	G	·	·	·	A	T	·	·	C	C	HU1	NA
CIdAIDI	•	·	·	·	•	G	-	·	C	·	I V	·	·	•	T T	·	A	•	G	·	·	·	A	T m	·	·	C	C	TU1 0	
CLAAID2	•	·	·	·	T	G	_	·	C	·	n m	·	·	I	1 m	·	A	VV	G	·	·	·	A	T m	·	·	C	C	П10 1101	APSI
CraAlb3	•	·	·	•	·	G	-	•	C	·	T	·	•	·	Т	•	A	·	G	•	·	·	A	Т	·	•	C	C	HUI	NA NDC1+2
CraAlD4	•	·	·	·	·	G	-	ľ	C	·	n	·	I	·	Т	•	A	·	G	•	•	·	A	Т	•	·	C	C	HZZ	APSI+3
Crekall	•	·	·	•	·	G	-	ľ	C	·	·	·	Т	·	Т	•	A	·	G	W	·	·	A	Т	·	•	C	C	HZ3	APS3
crekat2	•	·	·	·	·	G	-	1	C	·	·	·	Т	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	C	C	HZ4	APS3
creKat3	•	•	·	·	·	G	-	Y	C	•	·	·	Т	·	Т	•	A	·	G	•	•	·	A	Т	•	·	C	C	HZ4	APS3
CreMaki	•	·	·	·	·	G	-	1	C	W	·	·	Т	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	C	C	HZD	APS3
creMak2	•	·	·	·	·	G	-	1	C	•	·	·	Т	·	Т	·	A	·	G	:	·	·	A	Т	·	·	C	C	HZ4	APS3
creMak3	•	•	·	·	·	G	-	Y	C	W	·	•	Т	·	T	•	A	·	G	W	•	·	A	Т	•	·	C	C	H26	APS3
creRetl	•	·	·	·	·	G	-	Y	С	·	·	Y	T	·	Т	·	A -	·	G	W	·	·	A -	Т	·	·	С	С	H27	APS3
creRet2	•	·	·	•	·	G	-	Т	C	W	·	·	Т	·	Т	•	A -	·	G	W	·	·	A -	Т	·	·	C	C	H09	APS3
creRet3	·	·	·	·	·	G	-	Y	С	·	·	Y	Т	·	Т	·	A -	·	G	·	·	·	A -	Т	·	·	С	С	H28	APS3
dodApol	٠	·	·	·	·	G	-	·	С	·	Τ	·	·	·	Т	•	A	·	G	•	·	·	A	Т	·	·	С	С	H01	NA
elaBad1	·	·	·	·	Y	G	-	·	С	·	·	·	·	Y	Т	·	A	W	G	·	·	Y	A	Т	·	·	С	С	H04	APS1
elaBad2	•	·	٠	٠	Т	G	-	·	С	·	·	·	٠	Т	Т	•	A	W	G	٠	·	Y	A	Т	·	٠	С	С	H29	APS1
elaBad3	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A	W	G	·	·	Y	A	Т	·	Т	С	С	Н30	APS1
eleNeol	٠	·	٠	٠	٠	G	-	Τ	С	·	·	·	Т	·	Τ	•	A	·	G	•	·	·	A	Τ	·	٠	С	С	Н31	NA
eleNeo2	•	·	·	·	·	G	-	Τ	С	·	·	·	Т	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Τ	·	·	С	С	Н31	NA
eleNeo3	•	·	·	·	·	G	-	Τ	С	·	·	·	Т	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Τ	·	·	С	С	Н31	NA
epiAgil	•	·	٠	•	·	G	-	Τ	С	·	·	·	Τ	·	Τ	•	A	·	G	•	·	·	A	Τ	·	·	С	С	Н31	NA
epiAgi2	•	•	•	•	·	G	-	•	С	•	Τ	•	•	·	Τ	•	A	•	G	•	•	•	A	Т	•	•	С	С	H01	NA
epiChal	•	•	•	•	·	G	-	•	С	•	Τ	•	•	·	Τ	•	A	•	G	•	•	•	A	Т	•	•	С	С	H01	NA
epiCha2	•	•	•	•	•	G	-	·	С	•	Т	•	•	•	Т	•	A	•	G	•	•	•	A	Т	·	•	С	С	H01	NA
flaLef1	Y	K	R	R	•	G	-	•	С	•	•	•	•		Т	•	А	•	G	•	•	•	A	Т	A	•	С	С	H13	APS2
flaLef2	Y	K	R	R		G	-	•	С	•	•	•	•		Т	•	A	•	G	•		•	A	Т	A		С	С	H13	APS2
fucBal1		•	•	•	•	G	-	•	С	•	Т	•	•	•	Τ	•	A	•	G	•	•	•	A	Т	•	•	С	С	H01	NA

fucBal2		•	Y	G	-		С				Y	Т		А	W	G		•	Y	А	Т	K	С	С	Н05	APS1
fucBal3				G	-		С	Κ			Y	Т		A	W	G				A	Т		С	С	Н32	APS1
fucBar1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
fucBar2			Y	G	-		С				Т	Т		A	Т	G			Y	A	Т	Κ	С	С	Н33	APS1
fucBar3				G	-	Y	С	K				Т		A		G				A	Т		С	С	Н34	APS1+3
fucBed1			Y	G	_		С				Т	Т	W	A	W	G				A	Т		С	С	Н35	APS1+4
fucEpt1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
fucEpt2				G	_		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
fucGav1			Y	G	_		С				Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н05	APS1
fucGav2			Y	G	_		С	Т			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н36	APS1
fucKlo1				G	-		С	K			Y	Т		A	Ŵ	G			Y	A	Т		С	С	Н37	APS1
fucLanl			Y	G	_		С	Κ			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	H20	APS1
fucMar1			Y	G	_		С	K			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н20	APS1
fucMar2			Y	G	_		С	Κ			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	H20	APS1
fucMar3			Y	G	_		С				Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н05	APS1
fucPal1			Y	G	_		С				Y	Т		A	W	G				A	Т		С	С	Н38	APS1
fucPal2			Y	G	_		С				Y	Т		A	Т	G				A	Т		С	С	Н39	APS1
fucPer1			Y	G	_		С	K			Y	Т		A	W	G				A	Т		С	С	H18	APS1
fucPer2			Y	G	_		С	K			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н20	APS1
fucSan1				G	_		С	K			Y	Т		A		G				A	Т		С	С	H40	APS1
fucSan2				G	_		С				Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	H41	APS1
fucTie1			Y	G	_		С				Т	Т	W	A	W	G				A	Т	K	С	С	H42	APS1+4
fucToq1				G	_		С	K			Y	Т	W	A		G				A	Т		С	С	Н43	APS1+4
fucTor1			Y	G	_		С				Y	Т		A	W	G			Y	A	Т		С	С	H04	APS1
fucTor2			Y	G	_		С				Т	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	H44	APS1
fucTor3			Y	G	_		С				Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н05	APS1
fucTor4				G	_		С	Т			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	H45	APS1
qorMak1				G	_	Y	С			Т		Т		A		G	W			A	Т		С	С	Н23	APS3
graBea1			Т	G	_		С				Y	Т		A	W	G			Т	A	Т	Т	С	С	H46	APS1
graBea2			Т	G	_		С	K			Т	Т		A	Т	G			Y	A	Т	Т	С	С	Н47	APS1
_ graFor1			Т	G	_		С				Т	Т		A	Т	G			Т	A	Т	Т	С	С	H48	NA
graFor2			Y	G	_		С				Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н05	APS1
graFor3			Y	G	_		С	Κ			Y	Т		A	W	G				A	Т		С	С	H18	APS1
graGav1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
graGav2				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
graVan1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
graVan2			Y	G	-		С	Κ			Y	Т		A	W	G				A	Т		С	С	H18	APS1
helArd1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
helKam1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
helSpi1				G	_		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
hetEmb1				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
hetEmb2				G	-		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
hleArt1				G	_	Т	С			Т		Т		A		G				A	Т		С	С	Н31	NA
holBal1				G	_		С	K			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т	K	С	С	Н49	APS1
holBal2			Y	G	_		С	Т			Y	Т		A	W	G			Y	A	Т		С	С	Н50	APS1
holBal3				G	_		С	K			Y	Т		А	W	G			Y	А	Т	K	С	С	Н49	APS1
holKral				G	_		С					Т		А		G				А	Т		С	С	Н51	NA
holKra2				G	_		С	Т				Т		A		G				A	Т		С	С	H01	NA
holSip1				G	_		С	K			Y	Т		А	W	G			Y	А	Т	K	С	С	Н49	APS1
holSip2				G	_		С	Т				Т		А		G				A	Т		С	С	H01	NA
holSip3				G	_		С	Т				Т		А		G				A	Т		С	С	H01	NA
holSip4			•	G	_	•	С	Т	•	•		Т	•	A		G		•		Α	Т		С	С	H01	NA

holVel1						Y	G	-		С		Κ			Y	Т	•	A	W	G		•	Y	А	Т		Κ	С	С	H20	APS1
kotAkr1	Y	K					G	-		С						Т		A		G		Y		А	Т	A		С	С	Н52	APS2
kotAkr2	Y	K					G	-		С						Т		A		G		Y		А	Т	A		С	С	Н52	APS2
kotAkr3	Y	K					G	-		С						Т		A		G		Y		A	Т	А		С	С	Н52	APS2
lacCal1						Т	G	_		С					Т	Т		A	Т	G				A	Т			С	С	H14	NA
lacCal2						Т	G	_		С					Т	Т		A	Т	G				A	Т			С	С	H14	NA
lacCal3							G	_		С		Т				Т		A		G				A	Т			С	С	H01	NA
lacCal4						Т	G	_		С					Т	Т		A	Т	G				A	Т			С	С	H14	NA
lacFer1						Т	G	_		С					Т	Т		A	W	G				A	Т			С	С	Н15	APS1
lacFor1						Т	G	_		С					Т	Т		A	Т	G			Т	A	Т		Т	С	С	H48	NA
lcnSkol							G	_		С		Т				Т		A		G				A	Т			С	С	H01	NA
lucArc1							G	_		С		Т				Т		A		G				A	Т			С	С	H01	NA
lucArc2							G	_		С		Т				Т		A		G				А	Т			С	С	H01	NA
minChi1							G	_		С		Т				Т		A		G				А	Т			С	С	H01	NA
morSai1						Y	G	_		С		K			Y	Т		A	W	G			Y	А	Т		K	С	С	Н20	APS1
oesApol							G	_		С		Т				Т		A		G				А	Т			С	С	Н01	NA
oesApo2							G	_		С		Т				Т		A		G				A	Т			С	С	H01	NA
oesBud1							G	_		C		Т				T		A		G				A	Т			C	Ċ	H01	NA
oesBud2							G	_		C		- Т				- Т		A		G				A	T			C	C	H01	NA
oesBud3	•	•			·	•	G	_	·	C	·	Ť	•	•	•	Ť	•	Δ	•	G	·	•	•	Δ	T	•	·	C	C	H01	NA
oesDab1	•	•		•	•	·	G	_	·	C	·	т	·	•	·	Ť	•	Δ	·	G	•	·	·	Δ	т	·	·	c	C	H01	NA
oesDabi	•	•		•	•	·	G	_	•	C	·	т	·	·	·	Ť	•	Δ	·	G	•	·	·	Δ	т	·	·	c	C	H01	NA
oesInk1	•	•		•	•	·	G	_	•	c	·	T	·	·	·	Ť	•	Δ	·	G	•	·	·	Δ	T	·	·	c	C	н01	NΔ
oesKall	•	•		•	•	·	G	_	•	c	·	T	·	·	·	Ť	•	Δ	·	G	•	·	·	Δ	T	·	·	c	C	н01	NΔ
oesKal2	·	•		•	•	·	G	_	·	C	·	Ť	•	·	·	Ť	•	Δ	·	G	•	·	·	Δ	Ť	•	·	C	C	н01	NΔ
oosKunl	·	•		•	•	·	G	_	·	C	·	т Т	·	·	·	т Т	·	7	·	G	·	·	·	Л	T	·	·	C	C	нот нот	NA NA
oosKun2	•	•		•	•	·	G	_	·	C	·	т Т	·	·	·	т Т	·	Л	·	G	•	·	·	Л	т Т	·	·	c	C	н01	NA NA
oogKun2	·	•		•	•	·	G	_	·	c	·	т т	·	·	·	Ť	·	7	·	G	·	·	·	7	т т	·	·	C	C	1101 1101	NA NA
oogtit1	•	•	•	•	·	·	G	_	·	C	·	т т	·	•	•	т Т	•	A 7	•	G	•	•	•	A	т т	•	·	C	C	пот пот	NA NA
ooglit2	·	•	•	•	·	·	G	_	·	C	·	T	·	·	•	т Т	•	A 7	·	G	•	•	•	A	т т	•	·	C	C	H01	NA NA
oeshitz	•	•	•	•	·	·	G	_	·	c	·	T	·	•	•	T	•	A	•	G	•	·	·	A	T	•	·	C	C	101	NA NA
oesmegi	·	•		•	•	·	G		·	C	·	T m	·	·	·	T	·	A	·	G	·	·	·	A	T m	·	·	C	C	ПU1	NA
Oesniki	·	•		•	·	·	G	-	·	C	·	Т	·	·	•	T	•	A	·	G	·	•	•	A	T	·	·	C	C	HUL	NA
0especi	·	•		•	•	·	G		·	C	·	T m	·	·	·	T m	·	A	·	G	·	·	·	A	T m	·	·	C	C	ПU1	NA
0especz	·	•		•	•	•	G		·	C	·	1	·	·	•	T m	·	A	•	G	·	·	•	A	T m	·	•	C	C	101	NA NDC1
oespecs	·	•		•	·	1 V	G	-	·	C	·	r.	·	·	1 V	T	•	A	W	G	·	•	1 V	A	Т	·	n v	C	C	HZU HZO	APS1
oesPec4	·	•	•	•	•	1 V	G	_	·	C	·	ĸ	·	·	1 V	Т	·	A	W	G	·	·	Y V	A	Т	·	ĸ	C	C	HZU	APS1
oespecs	•	•	•	•	•	ĭ	G	-	·	C	·	n m	·	•	I	T	•	A	W	G	•	•	I	A	Т	·	n	C	C	HZU	APSI
oessiki	·	•	•	•	•	·	G	_	·	C	·	Т	·	·	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	C	C	HUL	NA
oesSik2	·	·		•	·	·	G	-	·	C	·	Т	·	·	•	T	•	A	·	G	·	•	•	A	Т	·	·	C	C	HUL	NA
oesSik3	·	·		•	·	·	G	-	·	С	·	Т	·	·	·	T	·	A -	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	HOI	NA
oesSik4	•	·	•	•	•	·	G	-	·	С	·	Т	·	•	·	T	•	A -	·	G	·	·	·	A -	Т	·	·	C	C	HUI	NA
oesZmal	·	·		•	·	Y	G	-	·	С	·	K	·	·	Y	Т	·	А	W	G	·	·	Y	А	Т	·	K	С	С	H20	APSI
oesZma2	·	·		•	·	Y	G	-	·	С	·	K	·	·	Y	Т	•	A	W	G	·	•	Y	A	Т	·	K	С	С	H20	APS1
oesZma3	·	·		•	·	Y	G	-	·	С	·	Т	·	·	Y	Т	·	A	W	G	·	·	Y	A	Т	·	K	С	С	Н36	APS1
oesZma4	·	·		•	·	Y	G	-	·	С	·	K	·	·	Y	Т	·	A	W	G	·	·	Y	A	Т	·	K	С	С	H20	APS1
oxyCar1	·	·		•	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A	Т	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H14	NA
oxyFer1	•	•		•	·	Y	G	-	Y	С	·	·	·	Y	Y	Т	·	A	W	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	Н53	APS1+3
oxyFer2	·	·		•	•	Y	G	-	·	С	·	K	·	•	Y	Τ	•	A	W	G	·	•	•	A	Т	·	·	С	С	H18	APS1
oxyPal1	•	•		•	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Τ	Т	·	A	Т	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H14	NA
oxyPal2	·	•		•	•	Y	G	-	·	С	·	Κ	·	•	Τ	Τ	•	A	W	G	·	•	•	A	Т	·	·	С	С	Н54	APS1
oxyPal3	•	•		•	·	Т	G	-	·	С	·	•	·	·	Τ	Т	·	A	Т	G	•	·	Y	A	Т	•	Κ	С	С	H17	APS1
parSan1	•	•			•	Y	G	-	·	С	·	K	·	•	Y	Τ	•	A	W	G	•	•	Y	A	Τ	·	K	С	С	H20	APS1

picJab1					Т	G	-		С					Т	Т		Α		G				A	Т			С	С	H16	NA
picJab2					Т	G	_		С					Т	Т		A		G				A	Т			С	С	H16	NA
picJab3					Т	G	_		С					Т	Т		A		G				A	Т			С	С	H16	NA
picSan1					Т	G	_		С					Т	Т		А		G				А	Т			С	С	Н16	NA
picSan2					Т	G	_		С					Т	Т		A		G				A	Т			С	С	H16	NA
picSaol					Т	G	_		С					Т	Т		А		G				А	Т			С	С	H16	NA
picSao2					Т	G	_		С					Т	Т		A		G				A	Т			С	С	H16	NA
posLaul					Y	G	_		C					Ŷ	T		А	W	G			Y	A	- Т		т	C	C	н55	APS1
reiNec1	·				Ē	G	_	т	С	W			· т	÷	Ť		Α		G	W		Ē	A	T		Ē	С	С	H09	APS3
reiNec2	•	•	·	•	•	G	_	Ŷ	C		·	•	Ť	•	T	•	Δ	·	G		·	•	Δ	T	•	·	C	C	н24	APS3
reiNec3	•	·	•	•	•	G	_	Ť	c	• 177	·	·	Ť	·	Ť	·	Δ	·	G	• 107	·	·	Δ	T	·	·	c	C	нО9	ADC3
reiPig1	•	·	•	•	•	G	_	Ť	c	W	·	·	Ť	·	Ť	·	Δ	·	G	W	·	·	Δ	T	·	·	c	C	ноо	ADC3
reiPig2	•	·	•	•	·	G	_	Ť	c	W	·	•	Ť	·	Ť	•	Δ	·	G	M	·	·	Δ	Ť	·	·	C	C	ноо	ADG3
rbolin1	·	י ע	Þ	· Þ	·	G	_	T	C		·	•	Ŧ	·	Ť	•	71	·	G	~~	·	·	71	T	• ⊼	·	C	c	нор н13	711 00
rhoDig1	T	11	11	11	·	G	_	·	c	·	·	·	·	·	Ť	·	7	·	G	·	·	·	7	т т	7	·	C	C	1115 1156	NA
rhoDig?	·	• v	р	р	·	G	_	·	c	·	·	·	·	·	Ť	·	7	·	G	·	· v	·	7	т т	7	·	C	C	п.50 ц1.2	1002
INOFISZ	T	IV.	Г	Г	·	G	_	·	C	·	·	•	·	• ጥ	т т	• TAT	A	·	G	•	T	•	A	т т	А	·	C	C	пт2 u57	AFGZ ADC1±4
sanCall	•	•	•	•	ı v	G	_	·	C	•	•	•	·	ı v	т т	VV	A	•	G	•	·	·	A	т т	·	• v	C	C	пЈ/ ц20	AFSIT4 ADC1
Sanvall	·	·	•	•	T T	G	_	·	C	·	17	•	·	T	T	•	A	vv	G	•	·	T	A	T	·	I	C	C	п20 1116	MALOT
SCOAINI	•	·	·	·	T T	G	_	·	C	·	·	·	·	T m	T	·	A	·	G	·	·	·	A	T	·	·	C	C	п10 1116	NA NA
SCOAINZ	·	·	•	•	T T	G	_	·	C	·	·	•	·	T	T	•	A	·	G	•	·	•	A	T	·	·	C	C	H10	NA NA
scocasi	•	·	·	·	T T	G	_	·	C	·	·	·	·	T T	T	·	A	·	G	·	·	·	A	T	·	·	C	C	п10 1116	NA NA
scocasz	•	·	·	·	T T	G	_	·	C	·	·	·	·	T T	T	·	A	·	G	·	·	·	A	T	·	·	C	C	п10 1116	NA NA
scocass	·	·	•	•	т Т	G	_	·	C	·	·	•	·	т т	т т	•	A	·	G	•	·	•	A	т т	·	·	C	C	пто u16	NA NA
scocas4	·	·	•	•	T T	G	_	·	C	·	·	•	·	T	T	•	A	·	G	•	·	•	A	T	·	·	C	C	H10	NA NA
scobari	•	·	·	·	T T	G	_	·	C	·	·	·	·	T T	T	·	A	·	G	·	·	·	A	T	·	·	C	C	п10 1116	NA NA
scobarz	٠	·	·	•	T	G	-	·	C	•	·	·	·	т	Т	·	A	•	G	•	·	•	A	Т	·	·	C	C	HI0 HI0	NA NDC1
scogall	·	·	·	•	I	G	-	·	C	·	•	•	·	T	Т	·	A	w	G	•	·	•	A	Т	·	•	C	C	HD8 HE0	APSI ADC1
scosall	٠	·	·	•	Т	G	-	·	C	•	•	·	·	I V	Т	·	A	T	G	•	·	ĩ	A	Т	·	n	C	C	нэ9	APSI ADC1
scosal2	·	·	·	·	•	G	-	·	C	·	ĸ	·	·	1 	Т	·	A	•	G	·	·	•	A	Т	·	:	C	C	H40	APSI
scoSai3	٠	•	·	·	Y	G	-	·	C	•	ĸ	·	·	Y 	Т	·	A	W	G	•	·	Y	A	Т	·	K	C	C	HZU	APSI
scoSa14	٠	•	·	·	Y	G	-	·	C	•	K	·	·	Y	Т	·	A	·	G	•	·	•	A	Т	·	·	C	C	H60	APSI
scosani	·	·	·	·	Т	G	-	·	C	·	·	·	·	Т	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	C	C	HI6	NA
scoSan2	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A -	·	G	·	·	·	A -	Т	·	·	С	С	HI6	NA
scoSaol	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	А	·	G	·	·	·	А	Т	·	·	С	С	HI6	NA
scoSao2	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	HI6	NA
scoSerl	٠	·	·	٠	Т	G	-	·	С	•	·	·	·	Т	Т	·	A	·	G	•	·	•	A	Т	·	·	С	С	H16	NA
serGril	·	·	٠	٠	·	G	-	·	С	·	Т	٠	·	·	Т	·	A	·	G	٠	·	٠	A	Т	·	·	С	С	H01	NA
serGri2	·	·	·	·	·	G	-	·	С	·	·	·	Y	Y	Т	·	A	W	G	·	·	Y	A	Т	·	K	С	С	Н61	APS1+3
serPic1	·	٠	·	٠	·	G	-	·	С	·	Т	·	·	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H01	NA
serPic2	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A	Т	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H14	NA
sphJab1	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H16	NA
sphJab2	·	·	·	·	Т	G	-	·	С	·	·	·	·	Т	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H16	NA
tetFor1	·	·	·	·	·	G	-	·	С	·	Т	·	·	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	H01	NA
tetFor2	٠	·	٠	٠	·	G	-	٠	С	·	Κ	•	٠	Y	Τ	·	A	Ŵ	G	•	٠	٠	A	Т	·	·	С	С	Н32	APS1
tetVanl	•	•	·	•	Y	G	-	·	С	•	Κ	·	·	Y	Τ	·	A	Ŵ	G	•	·	Y	A	Τ	·	Κ	С	С	H20	APS1
umbChi1	Y	K	R	R	·	G	-	·	С	·	·	·	·	·	Т	·	A	·	G	·	Y	·	A	Т	А	·	С	С	H12	APS2
umbChi2	Y	K	R	R	·	G	-	٠	С	·	·	•	٠	·	Τ	·	A	·	G	•	٠	٠	A	Т	A	·	С	С	Н13	APS2
umbKat1	Y	K	R	R	·	G	-	٠	С	·	·	•	٠	·	Τ	·	A	·	G	•	٠	٠	A	Т	A	·	С	С	Н13	APS2
umbKiz1	Y	K	R	R	·	G	-	·	С	·	·	٠	·	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	A	·	С	С	Н13	APS2
umbKiz2	Y	K	R	R	•	G	-	·	С	·	·	٠	·	·	Т	·	A	·	G	·	·	·	A	Т	A	·	С	С	Н13	APS2
untBall	·	·	·	·	Y	G	-	·	С	·	Т	·	·	Y	Т	·	А	·	G	·	·	·	A	Т	·	·	С	С	Н50	APS1
untBal2	٠	•	·	•	•	G	-	·	С	•	Т	·	·	·	Т	·	A	·	G	•	·	•	A	Т	·	·	С	С	H01	NA
zinPav1	•	•	•	•	Y	G	-	•	С	•	Κ	•	•	Y	Τ	•	Α	W	G	•	•	Y	Α	Т	•	Κ	С	С	H20	APS1

Az APS-ek nélküli ribotípusok egy része csak bizonyos mintákra volt jellemző. Így például kizárólag a leggyakoribb, H01-es ribotípust hordozta az Ophrys aeoli, az O. candica, az O. calypsus, O. cerastes, az O. ceto, az O. cornutula, az O. dodekanensis, az O. heldreichii, az O. heterochila, az O. lacaena, az O. lucis és az O. minutula fajok minden mintája. Feltűnően gyakori volt ez a ribotípus az O. oestrifera, azaz a keleti szarvasbangó mintáiban. A nyugati szarvasbangókban (O. scolopax) ugyanakkor a H16 uralkodott, igaz nem csak ez fordult elő ebben a fajban. Mindamellett a közelrokon O. picta és O. sphegifera fajok direkt nrITS szekvenciáiban csak a H16 ribotípust találtuk. Hasonló kizárólagosság ritka volt, az O. elegans esetében találtuk kizárólagosnak a H31 ribotípust a faj nrITS direkt szekvenciáiban. Az APS-ek nélküli ribotípusok közül külön említést érdemel a H14, amely az O. biancae, O. calliantha, O. lacaitae, O. oxyrrhynchos és O. serotina fajokban, utóbbi kivételével minden esetben Szicíliában megjelenő ribotípus volt. A fajok közötti erős nrITS-ben mutatkozó génáramlást jelzi, hogy az O. lacaitae közép-olaszországi egy példányából – az ugyanarról a lelőhelyről származó O. gracilis egy példányával - a H48 ribotípust mutattuk ki.

A fennmaradó ribotípusok jó része kettős csúcsokat (APS-eket) hordozott nrITS direkt szekvenciáiban. További különbség mutatkozott ugyanakkor az APS-ek helyzetében. Voltak bizonyos helyek, amelyeket az APS-ek illesztésben SNP-ek) (vagy az megjelenése alapján összekapcsolhattunk: ha egy bizonyos helyen volt APS (vagy SNP) akkor törvényszerűen találtunk APS-t (ill. SNP-t) más, jól meghatározott helyeken. Például, ha a 19. helyen APS-t találtunk, akkor sokszor a 98-as, 143-as, 221es, 454-es, 559-es helyen is APS-t találtunk, illetve az illesztésben itt SNP-t láttunk. Az összetartozó APS-helyek (illetve SNP-k) által definiált három csoportot találtunk így. Az elsőt, az APS1-et a fenti 6 hely karakterizálta (2.

táblázat), míg az APS2-őt a 12., 14., 15., 16. és 416. helyeken lévő, illetve az APS3-at a 60., 94., 108., 115. és 415. helyen lévők (2. táblázat). Érdekes volt, hogy a 203. helyen lévő APS 4 nyugat-európai (belga és francia) *O. fuciflora* és *O. santonica* mintára volt jellemző (APS4) és mindig az APS1-gyel jelent meg. Ezek az összekapcsolt APS helyek legtöbb esetben taxonómiailag közelebbi rokonoknak ítélt bangókat kötöttek össze. Az APS1 elsősorban az Fuciflora fajkomplex egyes fajcsoportjaira (Fuciflora, Heldreichii, Oestrifera, Scolopax, Tetraloniae) volt jellemző, az APS2 a Fuciflora fajkomplex Umbilicata csoportjára, míg az APS3 az Argolica fajkomplexre.

Érdekes volt a direkt szekvenálásokkal kapott ribotípusok elterjedése (15. ábra). A leggyakoribb, H01 ribotípus a keleti mediterrán



15. ábra Az *Ophrys fuciflora* fajkomplexre jellemző ribotípusok és APS-ek elterjedése. A körök mérete arányos a direkt szekvenálással vizsgált populációnkénti egyedszámmal. Az osztott körök populáción belül eltérő ribotípust hordozó egyedekre utalnak. A részletesen nem elemzett Argolica fajkomplexre jellemző ribotípusokat és APS3-at nem tüntettük fel

térségre volt jellemző, áreája a Krím-félszigettől Közép-Olaszországig terjedt. Ehhez hasonlóan a H16 ribotípust a nyugati mediterrán és északafrikai területeken találtuk, és egy esetben (*O. biancae*, Si: Palazzolo Acréide) Szicíliában is kimutattuk. Ugyanakkor Szicíliára a H14 ribotípus volt jellemző, mely olykor a teljes populációban megjelent. Kiterjedt területen (Szicíliától Dél-Belgiumig, Magyarországtól DNy-Franciaországig) APS1-gyel jellemezhető, eltérő nrITS paralógokat hordozó populációkat találtunk, azaz ebben a régióban a leszármazási vonalak számos fajt érintő keveredését, varrat zónáját mutattuk ki. Kiemelendő a Közép-Olaszországban kimutatott H48 ribotípus jelenléte a direkt szekvenciákban. Az APS2 a keletimediterrán térség (Dél-Görögország, Égei-szigetek, Antália és Ciprus) jellemző, paralógokat hordozó ribotípusa volt.

Az itt közölt eredmények nagyban megegyeznek a Gulyás (2007) által közöltekkel (lásd pl. jelen dolgozat 10. ábra), hiszen azonos adathalmazból indultunk ki. Az ott közölt eredményekhez képest az alábbi, ott nem vizsgált fajok direkt nrITS szekvenciája jelent újdonságot: az *O. aeoli, O. cerastes, O. minutula* fajokban a H01 ribotípus, az *O. morisii* és *O. santonica* fajban pedig a Fuciflora fajkomplexre jellemző APS1 paralógok jelenléte. Újabb populációk vizsgálatával megerősítettük a korábbi vizsgálatban közölt ribotípus jellemző voltát az alábbi fajoknál: *O. brachyotes* (APS1), *O. calypsus* (H01), *O. ceto* (H01), *O. episcopalis* (H01), *O. gracilis* (APS1), *O. heldreichii* (H01), *O. scolopax* (H16 és APS1) és *O. umbilicata* (APS2). Érdekes újdonságot jelentett az APS4 kimutatása egyes ÉNy-európai *O. fuciflora* populációkban.

Mivel az itt közölt új minták mind besorolhatók a már korábban megállapított (Gulyás 2007) ribotípusokba, a direkt nrITS szekvenciák kladisztikai elemzését nem végeztük el újra. Sokkal inkább a már korábban is kimutatott varrat zóna elemzése volt a célom, annál is inkább, mert az APS-

sekkel rendelkező szekvenciák kevés információt szolgáltatnak a filogenetikai rekonstrukciókor, hiszen a programok – habár az APS-ek megfelelően vannak kódolva – hiányzó adatként, egységesen kezelik őket (Clement *et al.* 2000, Ronquist & Huelsenbeck 2003, Tamura *et al.* 2007), így nem veszik figyelembe a szekvenciák közötti evolúciós viszony rekonstrukciójában. Ezért elsősorban az APS-sel rendelkező populációk klónozással történő vizsgálatára fektetem az alábbiakban a hangsúlyt, hogy az APS-eket kialakító paralóg-összetételt feltárjuk, így a varrat zóna szerkezetébe betekintést nyerhessünk.

3.2. A klón szekvenciák illesztése és ribotípusai

59 APS-t hordozó populáció egy-egy egyedének direkt szekvenciáját klónoztuk, egyedenként átlag±szórás 10,1±1,93 klónt szekvenálva meg. Ezek közül 45 APS1-t, 6 APS2-t és 8 APS3-at hordozott (lásd 1. és 2. táblázat). Így összesen 596 szekvenciát kaptunk, melyek közül 78 az Argolica fajkomplexre jellemző APS3-ból származott, míg 49 az APS2-t hordozó Umbilicata fajcsoportot jellemezte. A maradék 479 klón nrITS szekvencia a Fuciflora komplex azon 19 fajának 45 populációjából származott, melyek direkt szekvenciáira az APS1 volt jellemző.

A továbbiakban – a dolgozat célkitűzésének megfelelően – ez utóbbi, 479 klón szekvenciát elemeztük tovább. Minden szekvenciát populációnként (azaz az egy egyedből származó szekvenciákat) illesztettük, és így négy olyan szekvenciát találtunk, amelyben feltűnően sok pontmutációt találtunk. Ezeket, mint feltehetőleg pszeudogéneket, kizártuk a további analízisből. A maradék 475 szekvencia illesztése egy 626 bp hosszú mátrixot eredményezett, melyben 274 variábilis pozíció volt, köztük két AA inzerció és sok indel. Azonban ezek java szingleton mutáció volt, gyakoriságuk nem

érte el a Vignal *et al.* (2002) által megadott 1%-os (5 db) küszöböt. Ezeket a pontmutációkat, mivel nem minősültek SNP-nek, átírtuk az adott pozícióban "uralkodó" bázisra. Így a polimorf helyek száma 17-re csökkent.

Ezeket a módosított klón nrITS szekvenciákat a Collapse program 52 ribotípussá vonta össze (3. táblázat).

3. táblázat A klónozásokkal nyert ribotípusok szekvenciái a polimorf helyek és a klón ribotípusok előfordulási gyakoriságának feltüntetésével

								Pol	Lim	orf	h	elv	7							
Klón									11											Fr
ribot					1	1	2	2	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	(db)
ípus	1	4	5	9	1	4	0	2	3	4	5	0	0	0	1	4	6	8	8	
	9	4	9	7	4	2	2	0	8	5	3	6	7	8	7	3	0	6	7	
CH01	Т	С	С	G	С	Т	A	A	G	G	С	А	-	-	Т	G	G	С	С	34
CH02	·	•	•	•	•	•	·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	78
CH03	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Т	•	•	2
CH04	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	Т	•	•	2
CH05	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Т	•	•	•	•	•	•	•	•	2
CH06	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	А	•	•	•	•	6
CH07	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Т	•	4
CH08	•	•	•	•	•	С	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	2
CH09	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Т	•	•	•	•	•	Т	•	•	103
CH10	С										Т						Т			2
CH11											Т	G					Т			1
CH12						•					Т			•			Т		Т	3
CH13						•					Т			•				Т	•	1
CH14						С		A			Т			•			Т		•	2
CH15	С					•						G		•					•	1
CH16	С																			1
CH17	С										Т						Т		Т	1
CH18	С							A			Т						Т			1
CH19				Т						С	Т						Т			2
CH20										С	Т						Т			2
CH21	С			Т		С		A												147
CH22	С			Т		С		A				G								6
CH23	С			Т		С		A											Т	1
CH24	С	Т		Т		С		А												3
CH25	С			Т		С					Т									1
CH26	С			Т		С		A			Т									2
CH27				Т		С		A												1
CH28	С			Т		С											Т			1
CH29	С					С		A								A				3
CH30	С	•	•			С	•	A	A							A				6
																		fc	olyt	tatva

								Pol	im	orf	h	ely	7							
Klón							~	~				-	-	-	_	-	-	-	-	Fr
ípus	1	л	5	0	1	T	2	2	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	(db)
триз	9	4	9	9 7	4	2	2	2	8	5	3	6	7	8	7	3	0	6	7	
CH01	Т	С	С	G	С	Т	A	A	G	G	С	A	-	-	Т	G	G	С	С	34
CH31	С			Т		С		А		С	Т	G		•					•	1
CH32	С			Т		С								•					•	1
CH33	С	•					Т	А						•					•	8
CH34	С	•			Т		Т	Α												2
CH35	С							А												2
CH36	С		•	Т		С		А	•	•	Т	•	•	•		•	Т	•	•	6
CH37	С		•	Т		С		•	•	•	Т	•	•	•		•	Т	•	•	2
CH38	С	Т	•	Т		С	•	А	•	•	Т	•	•	•	•	•	Т	•	•	2
CH39	•	•	•	Т		С	•	•	•	•	Т	•	•	•	•	•	Т	•	•	1
CH40	С	•	•	•	Т	С		А	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	1
CH41	С	•	Т	•	•	С	•	Α	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	1
CH42	С	•	•	Т		С	•	А	•	•	•	G	•	•	•	•	Т	•	•	1
CH43	С	•	•			С	•	А	А	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1
CH44	С	•	Т				•	А	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1
CH45	С	•	Т		Т	С	•	А	•	•	•	•	•	•	•	•	Т	•	•	1
CH46	С	•	Т		Т	С	•	А	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6
CH47							Т	А					А	Т	G		С			1
CH48	С	•	•				Т	А	•	•	•	•	А	Т	G	•	С	•		12
CH49	С		•	Т			Т	А	•	•	•	•	А	Т	G	•	С	•		1
CH50	С		Т		Т	С		А			Т						Т			1
CH51	С	•				С		А			Т			•					•	1
CH52	С	•	Т				•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1

A klón ribotípusok gyakoriságában jelentős eltérések mutatkoztak (16. ábra). Számos klón ribotípus kiugróan gyakori volt [pl. CH21 (147 db), CH09 (103 db), CH02 (78db), CH01 (34)], ezeket domináns klón ribotípusoknak neveztük el. További 7 ribotípus volt még jelen jelentősebb frekvenciával (CH48, CH33, CH06, CH22, CH30, CH36, CH46), ezeket szubdomináns klón ribotípusoknak tekintettük. A fennmaradó 41 ribotípus alacsony gyakorisággal (általában egyszer vagy kétszer) fordult elő az adathalmazban, ezeket egyeden belül keletkezett paralógoknak tekintettük, és kihagytuk a további vizsgálatokból.



16. ábra A klón ribotípusok gyakorisági eloszlása. A további vizsgálatokba az első 11 klón ribotípust mint feltételezett ortológot vontuk be.

A domináns és szubdomináns (feltételezhető ortológ) klón ribotípusok közti leszármazási viszonyt rekonstruáló TCS program a ribotípusok két csoportját különítette el (17.b ábra). Az egyik csoportba tartoztak a CH21, leggyakoribb klón ribotípus köré rendezett ribotípusok (CH21, CH36, CH22, CH30, CH46), míg a másikba a fennmaradó, közepesen gyakori és ritkább ribotípusok (CH09, CH02, CH01, CH06, CH33, CH48) sorolhatók. A program a legvalószínűbb külcsoportként (azaz az összes többi ribotípus közös őséhez legközelebb állóként) a CH01 ribotípust jelölte meg.

A klón ribotípusok földrajzi elterjedése érdekes mintázatot mutatott (17.a ábra). Egyes klón ribotípusok kisebb földrajzi területekre korlátozódtak, mások szélesebb elterjedésűek voltak, és inkább hiányok volt feltűnő egyes

földrajzi régiókban. A leggyakoribb, CH21 ribotípus például többször megjelent a varrat zóna keleti részén, de ritka volt Franciaországban, és hiányzott Szicíliából. Ugyanakkor itt feltűnően gyakori volt a CH02 ribotípus, de a CH01 is megjelent, melynek másik megjelenési pontja D-Franciaország volt. A varrat zóna Ny-i részére volt jellemző a CH33 és CH48 ribotípusok megjelenése, míg a ritkább CH06 csak Szicíliában fordult elő. A jelentős gyakorisággal bíró CH09 ribotípus elsősorban Közép-Itáliában és az Alpok környékén fordult elő nagyobb arányban.



17. ábra a) A klónozások által feltárt klón ribotípusok földrajzi eloszlása.
Minden egyes tortadiagram a klónozott egyed paralóg összetételét mutatja be.
b) A domináns és szubdomináns (feltételezhetőleg ortológ) klón ribotípusok
TCS programmal készített ribotípus hálózata

A klón ribotípusok taxonómiai affinitását DCA analízissel vizsgáltuk. Ennek alapján (18. ábra) látható, hogy a klón ribotípusokhoz kevésbé lehet kötni bizonyos fajokat, bár egyes esetekben – elsősorban amikor egy fajból csak egy klónozás készült – ez is előfordul. Ilyen az *O. cornutula*, *O. parvimaculata* és *O. serotina*, melyek klónjai mind CH21 ribotípusba tartoztak, illetve ilyen az *O. elatior*, melyben csupa CH09 ribotípus volt.



18. ábra A klón ribotípusok (háromszög) és az azokat hordozó fajok (körök) egymáshoz való viszonya DCA analízis alapján

3.3. A direkt és klón szekvenciák filogenetikai vizsgálata

A vizsgálatok során kapott ribotípusok közti filogenetikai kapcsolatot rekonstruáltuk háromféle filogenetikai törzsfarekonstrukciós eljárással, illetve permutációs tesztekkel elemeztük a kapott fák ágainak statisztikai "megbízhatóságát". Az adathalmazban 22 ribotípus szerepelt. Bevontuk a filogenetikai törzsfarekonstrukcióba a dirket szekvenálásokkal kapott azon ribotípusokat, melyek nem hordoztak APS-eket ("tiszta", génáramlásra nem utaló ribotípusok: H01, H14, H16, H31, H48, H51, H56 és API), valamint a klónozásokkal kapott domináns és szubdomináns ribotípusokat (lásd 18. ábra). Emellett további két, korábbi vizsgálatainkban az Umbilicata csoportból kiklónozott domináns ribotípust (CHU1, CHU8) vontunk be az analízisekbe, hogy a fajcsoportok közti esetleges génáramlást bemutassuk. A vizsgálatokban előre definiált külcsoportként az *O. apifera* két egyedéből származó szekvenciáját használtuk fel.

Így egy 627 bp hosszú mátrixot kaptunk, melyben 26 (4,6%) variábilis hely volt, melyek közül 19 (3,1%) volt parszinómia számára informatív hely. A belcsoportot illetően mindössze 17 (2,7%) variábilis és 10 (1,6%) parszimónia számára informatív hely volt a mátrixban. A vizsgálatok előtt futtatott Modeltest program a "Hierarchical Likelihod Ratio Tests (hLRTs)" alapján a Kimura 2p modellt, míg az "Akiakie Information Criterion (AIC)" alapján a TVMef+I modellt ajánlotta, mint a vizsgált nrITS szekvenciák molekuláris evolúcióját leginkább megfelelően leíró modellt. Így a programok futtatásakor ezeknek a modelleknek megfelelő beállításokat alkalmaztuk. Az eltérő modellek azonban azonos topológiájú fákat eredményeztek, így az alábbiakban csak a Kimura 2p modellel kapott fákat mutatjuk be (19. ábra).



b

19. ábra A klón és direkt *Ophrys* ribotípusok konszenzus törzsfáinak kladogrammjai, ahol az 50% alatti támogatottságú elágazásokat nem tüntettük fel. a) A maximális parszimónia és a bayesi utólagos valószínűségek által felállított törzsfák topológiája megegyezett, ezért ez a kladogram mutatja azt be, a megfelelő ágaknál feltüntetve a bayesi utólagos valószínűségeket, majd attól ferde vonallal elválasztva az 1000 pszeudoreplikációból származó bootstrap értékeket. b) A "szomszéd csatolás" módszerével felállított törzsfa topológiája, a megfelelő ágaknál feltüntetve a 1000 pszeudoreplikációból származó bootstrap értékeket.

A háromféle módszerrel készített törzsfák topológiája nagymértékben hasonlít, az azonos topológiájú MP és BP fáktól (19.a ábra) a NJ fa tér el kissé (19.b ábra). A maximum parszimónia módszerrel kapott bootstrap MR konszenzus törzsfa, melyen a statisztikai bizonyosságokat 1000 bootstrap pszeudoreplikációval állítottuk elő és a bayesi utólagos valószínűségeket használó fa, melyet 1 000 000 generáció után elemeztünk a 19.a ábrán látható. Az előre megadott külcsoportok, a méhbangóra jellemző apiBal1 és apiBal2 direkt szekvenciák magas támogatottságú (bootstrap (bs): 99%; utólagos valószínűség (pp): 100%) leágazása után egy nagy politómia (feloldatlan filogenetikai kapcsolat) látható a kladogrammon, ahonnan öt ág indul ki. Érdekes a H51, egyedülálló ága, mely egy krásna vesi *O. holubyana* APS-ek nélküli direkt szekvenciáját tartalmazza. Emellett két politómikus ág található itt, és két olyan, amely struktúrált leágazásokat tartalmaz.

A két politóm ág közül az alacsony bootstrap (57%), de magas utólagos valószínűségű (93%) a leggyakoribb direkt ribotípust (H01) és a leggyakoribb klón ribotípust (CH21), valamint ez utóbbitól egy (CH22) vagy két (CH36) mutációval különböző (17.b ábra) ribotípust tartalmazza. Az ezekre jellemző fajokat a 18. ábra láthatjuk. A H01 és a CH21 ribotípusok szekvenciája megegyező, így nem csoda, hogy egy ágra kerültek. A másik politóm ág közepes támogatottságú (bs: 66%; pp: 76%) és az Umbilicata csoportra jellemző CHU1 és CHU8, az analízisekbe utólag bevont ribotípusok mellett a CH30 és a H56 ribotípusokat tartalmazza. Előbbit a fucBal és lacFer mintákból klónoztuk ki, míg utóbbit a rhoPis1 egyedben találtuk. A magas támogatottságú (pp: 99%; bs: 89%), csupán két mintát tartalmazó ág az Argolica fajcsoportra jellemző H31 direkt ribotípust (az eleNeo és helArt populációkból, mindkettő Argolica fajcsoportba sorolt) és a CH46 (apuLoc, fucBar és az oxyFer mintákból előkerült) klón ribotípust foglalja magában.

Az "alapi politómia" utolsó, ötödik leágazását egy közepes (79%) utólagos valószínűségű, de kis (57%) bootstrap támogatottságú, több részletében feloldott filogenetikai kapcsolatokat tartalmazó ág adja. Ennek alapi, magas (pp: 98%) illetve közepes (bs: 79%) támogatottságú leágazása két, franciaországi és dél-belgiumi klón ribotípust, a CH33 és a CH48-at tartalmazza. Ezeket a fucBed, fucLan, fucTog, sanCan és scoGal mintákból klónoztuk ki. A másik csoportba tartozó minták kládja közepes (86%) utólagos valószínűségű, de alacsony (54%) bootstrap támogatottságú, és kettős elágazást tartalmaz. A három, alacsony támogatottságú (pp: 60%; bs: 51%) politómiában álló ribotípus (H16, CH01, CH06) egymással közelrokon, mert a H16 megegyezik a CH01-gyel, míg a CH06 az utóbbitól csupán egy mutációval különbözik (17.b ábra). A H16-os direkt ribotípus az Ibériaifélsziget és Észak-Afrika jellemző direkt ribotípusa, míg a CH01 számos szicíliai és dél-franciaországi populáció, a CH06 pedig a szicíliai Ferla településről való oxyFer és lacFer populációk sajátja. Az innen eredő, magas (pp: 96%), illetve alacsony (bs: 55%) támogatottságú kládon három ág található. Kettő ebből (a CH02 és a H14), habár szekvenciájuk megegyezik, csupán alacsony támogatottságú (pp: 61%; bs: 59%) közös ágra került, és a biaNot, calCar, lacCal, oxyCar, oxyPal, serPic populációk direkt ribotípusát, valamint a harmadik leggyakoribb klón ribotípust tartalmazza. A végső, magas (pp: 100%), illetve közepes (bs: 81%) támogatottságú ágon pedig a graFor1 és a lacFor1 egyedekből szekvenált H48, és az ezzel identikus, második leggyakoribb klón ribotípust, a CH09-et tartalmazta.

A NJ fa, amelynek ágait szintén 1000 bootstrap pszeudoreplikációból származó statisztikai támogatottsággal jellemeztünk, roppant hasonló topológiájú és hasonló statisztikai támogatottságú ágakkal bírnak, mint a MP fa (19.b ábra). Különbség, hogy az igen alacsony támogatottságú (50%) H01, CH21, CH22 csoporthoz itt nem csatlakozik a CH36, hanem az "alapi

politómiát" szaporítja. Emellett itt a CH01, CH02, CH09 ribotípusokat tartalmazó klád egymáshoz viszonyított kapcsolata feloldatlan.

3.4. A klón szekvenciák populációgenetikai vizsgálata

A közép-európai varrat zóna (17. ábra) kialakításában részt vevő ribotípusok, így leszármazási vonalak egy része láthatóan a Balkán-félsziget felől (a H01 direkt, illetve ezzel megegyező CH21 klón ribotípus), másik része az Ibériai-félsziget felől (a H16 direkt, illetve a CH01 klón ribotípus) került a közép-európai régióba, ahol a jelen lévő ribotípusokkal keveredve alakította ki a varrat zónát. Ugyanakkor a fenti varrat zónát további – feltételezhetően ortológ – ribotípusok is jellemzik, mindenekelőtt az Appennini-félszigeten jellemző H14 (megfelelője a CH02) és a H48 (megfelelője a CH09), valamint az área északnyugati részén jellemző CH33 és CH48 (17.a ábra).

Míg az ibériai és balkáni ribotípusok eredetét földrajzi izolációval könnyen magyarázhatjuk, addig nem világos, hogy azonos földrajzi régióban (Appennini-félsziget) milyen izolációs tényező választott el két további, széles elterjedésű, feltehetőleg ortológ ribotípust (CH02 és CH09). Ennek, valamint a kevésbé elterjedt CH33 és CH48, közelrokon ribotípusoknak a varrat zónán belüli vizsgálatát AMOVA vizsgálattal elemeztük. Mivel a feltehetőleg ortológ (domináns és szubdomináns, lásd 16. ábra) klón ribotípusok közül számos eredetét a korábbi vizsgálatok felfedték (CH21 és közelrokon ribotípusai (CH22, CH36) balkáni ribotípusok; CH01 ibériai ribotípus és ennek szicíliai leszármazottja, a CH06; CH30 az Umbilicata fajcsoportból származó ribotípus; CH46 az Argolica fajcsoportból származó ribotípus), csak a fennmaradó 4 ribotípust (CH02, CH09, CH33, CH48) tartalmazó populációkat (16. ábra) vizsgáltuk tovább. Ezek száma 38 volt,



összesen 201 klón szekvenciát használtunk itt fel, populációnként átlag±szórás 5,3±2,9 klón szekvenciát elemezve.

20. ábra Az AMOVA vizsgálatokban felhasznált populációk és azok relatív ribotípus összetétele. Az ábrán bemutatott csoportosítás a vizsgálatok során legszerencsésebbnek talált fenológiai csoportosítást követi, az egyes csoportokat piros vonal választva el.

A 38 populációra az nrITS ribotípusok frekvenciája alapján készített AMOVA vizsgálatok (4. táblázat) a földrajzi és a fenológiai csoportosítást részben megerősítették, míg a fajok és fajcsoportok alapján képzetteket nem. A Delforge (2005) által definiált fajokra roppant alacsony fajok közti differenciációt (2,72%), illetve nem szignifikáns F_{CT} értéket kaptunk. Hasonlóan, a Delforge (2005) által képzett fajcsoportokat sem sikerült megerősítenünk (fajcsoportok közti differenciáció: 9,45%; nem szignifikáns F_{CT} érték) az nrITS klón ribotípusok segítségével.

csoportosítási	csoportok	ge	netikai variabi	litás	geneti	kai differer	nciáció
szempont	Ĩ	csoportok közt	csoporton belül, populációk közt	populáción belül	F _{SC}	F _{ST}	F _{CT}
Delforge (2005) fajai	16 faj	2,72%	43,17%	54,11%	0,44***	0,45***	0,03ns
Delforge (2005) fajcsoportjai	5 fajcsoport	9,45%	39,23%	51,33%	0,43***	0,48***	0,09ns
	Szicília vs. Alpok vs. Alpok K vs. Alpok Ny vs. Kö- Olaszo.	23,44%	25,15%	51,41%	0,33***	0,48***	0,23***
földrajzi	Szicília vs. a többi	36,7%	23.31%	40%	0,37***	0,6***	0,37***
	Alpok vs. Alpok K vs. Alpok Ny vs. Kö- Olaszo.	7,65%	31,6%	60,75%	0,34***	0,39***	0,07ns
	korai vs. átmeneti vs. kései	16,95%	32,06%	50,99%	0,38***	0,49***	0,17**
fenológiai	korai vs. átmeneti	10,98%	33,77%	55,25%	0,38***	0,44***	0,11*
	korai vs. kései	43,36%	17,67%	38,97%	0,31***	0,61***	0,43***
	átmeneti vs. kései	8,61%	38,65%	52,74%	0,42***	0,47***	0,08ns

4. táblázat A hierarchikus AMOVA vizsgálatok eredményei a különböző tesztelt csoportosításokra.

A földrajzi izoláció esetében az 5 régió alapján csoportosított minták közt már jelentős differenciációt találtunk a régiók között (23,44%, p=0,001 szinten szignifikáns fixációs indexek). A teljes adatsorra jellemző differenciációt ugyanakkor a szicíliai minták a maradék négy régiótól való jelentős (csoportok közti differenciáció: 36,7%; csoportokon belüli, populációk közötti: 23,31%; p=0,001 szinten szignifikáns fixációs indexek)
elkülönülése okozza. A maradék négy régió elkülönülése már csak kismértékű csoportok közti differenciációt mutat (7,65%).

Hasonlóan érdekes volt a virágzási idők alapján képzett fenológiai csoportosítás (20. ábra) hierarchikus AMOVA vizsgálata (4. táblázat). Ennek vizsgálata során jelentős fenológiai csoportok közötti differenciációt kaptunk (értéke: 16,95%; fixációs indexek: $F_{SC}=0,38^{***}$, $F_{ST}=0,49^{***}$, $F_{CT}=0,17^{**}$), melyért egyértelműen a korai és a kései csoportok közti differenciáció (csoportok közt: 43,36%, csoporton belül, populációk közt: 17,67%, populáción belül: 38,97%; fixációs indexek: $F_{SC}=0,31^{***}$, $F_{ST}=0,61^{***}$, $F_{CT}=0,43^{***}$) felelős. Az átmeneti virágzási idejű csoporthoz képest a korai vagy a kései virágzásúak sem különülnek jelentősebb mértékben el.

4. Megvitatás

4.1. Ortológ nrITS ribotípusok

Az olyan multi-géncsaládok, mint az nrITS használatának egyik legnagyobb nehézsége a filogenetikai szignált hordozó ortológok leválasztása a paralógok közül (Bailey *et al.* 2003). LaJeunesse & Pinzón (2007) a domináns változatok, mint igen valószínű ortológok használatát javasolták filogenetikai rekonstrukcióra, és ennek megfelelően osztályoztuk mi is a klónozásokkal kapott ribotípusainkat (16. ábra): elkülönítettünk 4 igen gyakori, domináns, és további 7, szubdomináns klón ribotípust. A négy domináns klón ribotípus számos érdekes tulajdonsággal bírt. Ilyen, hogy a szekvenciájuk teljesen megegyezett négy direkt ribotípuséval, melyek általában széles elterjedésűek. Így a leggyakoribb direkt, H01-es ribotípus a klónok közt is leggyakoribb CH21-essel (korábbi munkákban és a továbbiakban "fuciA" ribotípus), a széles elterjedésű (ibériai) H16-os a CH01-gyessel ("fuciF" ribotípus), a H14-es a szicíliai CH02-essel ("fuciD"

ribotípus), míg a H48-as a második leggyakoribb klónnal, a CH09-essel ("fuciB" ribotípus) identikus. Az, hogy a négy domináns klón ribotípus megtalálható volt az APS-ek nélküli (hibridizációra nem utaló) direkt nrITS szekvenciákban, valamint az, hogy ezek a legnagyobb elterjedésű (17.a ábra) klón ribotípusok, arra enged következtetni, hogy ez az a négy nrITS ribotípus, amely az *Ophrys fuciflora* alakkört leginkább jellemző négy leszármazási vonalat képviseli. Ezért ezt a négy ribotípust kitüntetve kell kezelnünk. Nem véletlen, hogy éppen ezeknek a ribotípusoknak jelentős taxonómiai és földrajzi affinitásuk van.

A taxonómiai affinitás azonban nem faji szintű elkülönítést jelez, hiszen nem találtunk bizonyos fajokra kizárólag jellemző ribotípusokat, illetve a ribotípusok a fajok közt számos esetben megegyeztek (2. táblázat). Például a keleti szarvasbangók közt a H01 ribotípus nem csak az *O. oestrifera* faj mintáira, hanem számos azzal rokon kisfajra jellemző volt. Ezeket a rendszerezők, pl. Delforge (2005) a Bornmuelleri, Heldreichii, Oestrifera fajcsoportokba sorolják, melyet az nrITS nem erősített meg. Ebből arra következtethetünk, hogy az nrITS nem választja el az adaptív radiációval feltehetőleg a közelmúltban elvált alakokat. A négy domináns ribotípus inkább nagyobb földrajzi régiókhoz, nagyobb taxonómiai egységekhez köthető.

A leggyakoribb H01 ribotípus például a keleti szarvasbangó (*O. oestrifera*) tágabb rokonsági körére volt jellemző, illetve elterjedése a balkáni régióra összpontosult (15. ábra). A nyugati szarvasbangóra (*O. scolopax*) ugyanakkor a H16 ribotípus volt jellemző, mely az Ibériai-félsziget és Észak-Afrika kizárólagos ribotípusa volt (15. ábra). Ebből következik, hogy egyes rendszerezők (pl. Soó 1970, Pedersen & Faurholdt 2007) azon véleménye, mely szerint a szarvasbangók egy fajba (*O. scolopax*) tartoznak, és annak esetleg alfajai a keleti alakok nem szerencsés. Ez látszik a 19. ábrán is, hiszen

az *O. scolopax* fajra jellemző CH01 (=H16) és az *O. oestrifera* fajra jellemző CH21 (=H01) ribotípusok alapján képzett faj parafiletikus lenne.

A H14 ribotípus pedig Szicília jellemző ribotípusa volt (15. ábra), igaz, a klónozások itt már egy másik ribotípust, az ibériai-félszigeti CH01-et (H16) is kimutattak. A H48-as ribotípus már kevésbé széles elterjedésű volt a direkt szekvenciák közt, és két, kései virágzású (14. ábra) fajban fordult elő közép-olaszországban.

А klónozásokkal feltárt ribotípusok között elkülönítettünk szubdomináns ribotípusokat is, melyekről szintén feltételeztük, hogy ortológ szekvenciákról van szó. Ezek közül egyesek más rokonsági körből származó minták szekvenciájával egyeznek meg (a CH30 az Umbilicata fajcsoport, a CH46 pedig az Argolica fajkomplex mintáira jellemző), ami valószínűsíti ortológ jellegüket. Igaz, a homoplázia jelenségét itt sem zárhatjuk ki. A CH01 ribotípushoz közel álló CH06 szintén Szicília, azon belül is Ferla településről származó két minta jellemzője. Ezt, szűk elterjedése miatt tekinthetjük lokális bennszülött ortológnak is (ez esetben az őt hordozó O. lacaitae és O. oxyrrhynchos fajok közt roppant erős génáramlást kell feltételeznünk), de elképzelhető, hogy csupán a CH01 és CH02 szicíliai találkozásából eredő lokális rekombinánst (paralógot) mutattunk ki. A CH22 és a CH46 a H01(=CH21) közelrokon szekvenciái (17.b ábra) sem direkt szekvenciákban nem jelentek meg, sem fajhoz (18. ábra), fajcsoport nem köthetőek. Így ezek, habár viszonylag jelentős mennyiségben vannak jelen, biztos. hogy ortológ szekvenciák, esetleg véletlenszerűen nem megnövekedett gyakoriságú paralógok. A szintén a szubdomináns klón ribotípusok közé sorolt CH48 és azzal közeli rokon CH33 (17.b ábra) elsősorban a fajkomplex áreájának ÉNy-i részén volt jellemző (17.a ábra). Explicit faji kapcsolatot nem mutatott (18. ábra), leggyakrabban az O. santonica fajban jelent meg. Ugyanakkor ezt a ribotípust a direkt

szekvenciákban sajátos APS formájában (APS4) megtaláltuk. Ez utóbbi ribotípuspárról nem dönthető el, hogy ortológok-e, és az área adott részére jellemzőek, vagy véletlenszerűen képződött gyakori alakok.

Az nrITS-re is jellemző együttes evolúció során gyakran előfordul, hogy egy preferált paralóg irányába tolódik el a szekvenciák homogenizációja (Elder & Turner 1995, Álvarez & Wendel 2003). Jelen esetben a "fuciA" ribotípus valószínűsíthető a preferált alakként, mert ennek a legszélesebb az elterjedése (17.a ábra), és messze ez volt a varrat zóna leggyakoribb klón ribotípusa (16. ábra).

Összegezve azt mondhatjuk, hogy LaJeunesse & Pinzón (2007) által közölt módszer, mely a domináns klón ribotípusok tekinti ortológoknak, jelen adatokkal is alátámasztható. Egyrészt ezeknek a klón ribotípusokat ismerjük a direkt szekvenálásokból is, másrészt ezek a legszélesebb elterjedésűek. És a széles elterjedésű ribotípusok nagy valószínűséggel régi, idősebb ribotípusok (Hewitt 2001). Így joggal tételezzük fel, hogy ez a négy, az *Ophrys fuciflora* fajkomplexet jellemző ortológ nrITS ribotípus. Ugyanakkor a jelen dolgozatban szubdominánsokként kezelt klón ribotípusokról sokszor nem dönthető el egyértelműen, hogy hordoznak-e filogenetikai információt, vagy csupán lokálisan keletkezett rekombinánsok (CH06, CH22, CH36), illetve homoplázikus (konvergens) alakok (pl. CH33 és CH48). Így ezek ortológiájának vizsgálata további minták elemzését követeli meg.

4.2. Erőteljes génáramlás a fajcsoporton belül

A vizsgált 230 szekvencia 88,5%-a génáramlásra utaló APS-eket hordozott, ami a nemzetségen belüli nagymérvű hibridizációra és introgresszióra utal. Korábbi vizsgálatainkban (Gulyás *et al.* 2005) az nrITSben hasonló génáramlást találtunk három bangófaj esetében, melyet a

hibridizáció bizonyítékának tekintettünk. A *Dactylorhiza* nemzetség ÉNyeurópai mintáinak vizsgálatakor Devos *et al.* (2006) is hasonlóan sok APS-t talált, melyet a hibridogén fajkeletkezés bizonyítékának tekintett, és az eltérő leszármazási vonalak utólagos hibridizációjából eredeztet, melyet az együttes evolúció nem homogenizált. Hasonló eredmény az orchideákon belül, és más növénycsoportokban sem ritka (lásd Álvarez & Wendel (2003) összefoglaló cikkét).

Ugyanakkor érdekes, hogy bizonyos kettős csúcsok gyakran kapcsoltan jelentek meg, ráadásul azokon a polimorf helyeken, melyek az egyes tágabb rokonsági körökre voltak jellemzőek. Például Fuciflora komplexre jellemző APS1 nem volt jellemző az Umbilicata fajcsoportba sorolt, vagy az Argolica komplexbe tartozó minták közt. Ez a nagyobb fajcsoportok közti izolációra enged következtetni, mely a közelebbi rokonok közt (pl. a Fuciflora fajkomplexen belül) nem jellemző.

A fenti jelenséget támasztja alá a klónozások eredménye is. Egyrészt a direkt szekvenálások alapján sejtett nagy kiterjedésű varrat zóna létét megerősítették a klónozások, melyek változatos nrITS ribotípus összetételt tártak fel ebben a régióban (17.a ábra). Másrészt a klónozott populációk közt taxontól függetlenül megtaláltunk bizonyos szekvenciákat (18. ábra), sőt, alacsony frekvenciával (2,91%) a Fuciflora fajkomplexen kívülről származó szekvenciákat is kimutattunk. Nevesítve, a Fuciflora komplexbe sorolt apuLoc, fucBar és oxyFer populációkban megtaláltuk az Argolica komplexre jellemző CH46 ribotípust, míg a fucBal és lacFer populációkban az Umbilicata fajcsoportra jellemző CH30 ribotípust. Sőt, egyes direkt szekvenciákban (2. táblázat) a Fuciflora komplexre jellemző APS1-et és az Argolica komplexre jellemző APS3-at is megtaláltuk. Mindez – párosulva a feltárt nagy kiterjedésű varrat zónával – világosan jelzi az nrITS-ben tapasztalható jelentős génáramlást.

A talált jelentős hibridizációs övezetet azonban magyarázhatjuk úgy is, mint egy korábbi hibridizációs esemény maradványa, azaz egy korábbi génáramlásból származó polimorfizmust. Ez esetben az adaptív radiációnak, és az azzal járó erős prezigótikus izolációnak időben követni kellett a hibridizációt. Habár ez egy lehetséges alternatív magyarázat a varrat zóna meglétére, nem valószínű, hogy helyes lenne. Ennek oka, hogy ebben az esetben a populációk paralóg összetételében éles genetikai differenciációt kellene látnunk, amit viszont nem találtunk (4. táblázat). Sokkal inkább átmeneti csoportokat, és csak a szélsőséges csoportok között kimutatható genetikai differenciációt találtunk, ami a közelmúltbeli, erőteljes génáramlásra utal. Tovább erősíti a közelmúltban történt génáramlás lehetőségét az a tény, hogy az nrITS szekvenciákban nem ment végbe az együttes evolúció (lásd 26. oldal), mely egy ribotípus felé homogenizálja a paralógokat.

Így joggal mondhatjuk, hogy az *Ophrys fuciflora* fajkomplex fajainak közép-európai mintáiban a közelmúltban lejátszódott erőteljes hibridizáció ment végbe, mely jelentős génáramlással járt az ide tartozó fajok közt, de a közelrokon kládokból is érték hibridizációs hatások. Ez jól egybeesik a korábbi megfigyelésekkel, melyek jelentős génáramlást találtak a nemzetségen belül (Soliva & Widmer 2003; Schiestl 2005).

4.3. Leszármazási vonalak a Fuciflora fajkomplexen belül

A direkt szekvenálásokkal kapott földrajzi mintázat és a közelmúltban kialakult nrITS varrat zóna genetikai szerkezetének ismeretében néhány következtetést vonhatunk le a bangó nemzetség Fuciflora fajkomplexének történetéről. Közismert, hogy az európai élővilágra roppant nagy hatást gyakoroltak a jégkorszakok (Comes & Kadereit 1998; Hewitt 1999, 2004),

melyek közül a legutolsó, Würm glaciálisnak volt a mai élővilágra legerősebb hatása. Ennek során a belföldi jégtakaró előrenyomulásával párhuzamosan a termofil fajok a dél-európai félszigetekre szorultak vissza, ahol sok esetben földrajzilag izolálódott rasszok (fajpárok, alfajok) alakultak az izoláció évezredei alatt ki (Taberlet et al. 1998). Kifejezetten Mediterrán géncentrumú Ophrys nemzetségről joggal feltételezhetjük, hogy a Fuciflora fajkomplex akkori képviselői is déli refúgiumba szorultak, ahol izolálódtak egymástól. A direkt szekvenálásokkal talált ortológ ribotípusok előfordulása valószínűsíti azokat a helyeket (21. ábra), ahol ezek a ribotípusok a legnagyobb arányban voltak a populációban, hiszen itt mai napig sem olvadtak teljesen be. Az ibériai-félszigeti (atlanti-mediterrán) refúgiumban a "fuciF" ribotípus (H16, CH01), a balkáni refúgiumban a "fuciA" (H01, CH21) ribotípus különült el. Érdekes, hogy gyakorlatilag azonos földrajzi helyzetben két ribotípus is elkülönült az appennini-félszigeti (adriatomediterrán) refúgiumban, a "fuciD" (H14, CH02) és a "fuciB" (H48, CH09). A gyakorlatilag szimpatrikus ribotípus izoláció kialakulásához valamilyen egyéb, nem földrajzi barriert kell feltételeznünk a ribotípusok közt, mert a napjainkban is észlelhető erős génáramlás bizonyosan összemosta volna a két ribotípust. Ez az izolációs tényező, az AMOVA vizsgálatok alapján (20. ábra, 4. táblázat) nagy valószínűséggel fenológiai jellegű volt: a "fuciD" ribotípust hordozó populációk a Fuciflora rokonsági kör korán virágzó (április-május) tagjai voltak, míg a "fuciB" ribotípust ugyanezen alakkör későn virágzó tagjai hordozták. Talán innen ered a pollinátorban meglévő jelentős izoláció is: a korai virágzású alakok az Eucera s.str. méhekhez, míg a kései virágzásúak a Tetralonia nembe sorolt méhekhez kötődnek.

A klíma javulásával feltételezzük, hogy a bangók áreája is kiterjedt, és az addig elkülönült leszármazási vonalak találkoztak, majd a nem-teljes izolációjukból adódóan keveredtek. A balkán-félszigeti "fuciA" keleti

irányból, az ibériai-félszigeti "fuciF" ÉK-ről, Franciaország felől, illetve DKről, Tunézia felől keveredett össze a közép-európai "fuciB" és "fuciD" ribotípusokat hordozó populációkkal, létrehozva a ma látott kiterjedt varrat zónát. A legrégebbi génáramlást a "fuciB" és "fuciD" ribotípusok közt feltételezhetjük, ami miatt nem csoda, hogy köztük genetikai értelemben széles átmeneti sáv jött létre (20. ábra), mely nem különül el a két végponttól.



21. ábra A Fuciflora fajkomplexre jellemző ortológ ribotípusok feltételezhető glaciális refúgiuma (színes vonalak) és posztglaciális migrációs útvonalai (színes nyilak).

Az itt vázolt migrációs útvonalakról hangsúlyozni kell, hogy feltételezések, hiszen a pontos útvonaláról nincsenek adataink; azt egy, az nrITS-nél jóval variábilisabb genetikai lókusz segítségével, filogeográfiai módszerekkel tudnánk pontosan megrajzolni. Az azonban igen valószínű, hogy a talált varrat zóna kialakulása a fent vázolt módon, a földtörténeti közelmúltban ment végbe.

A ribotípusok közti filogenetikai viszont bemutató kladogram (19. ábra) alapján a legidősebb ribotípusnak a "fuciA" tűnik. Az área ÉNy-i részén jellemző CH33 és CH48, kérdőjelesen ortológ ribotípusok kládja alkotja a következő leágazást, ami azonban téves is lehet, nevezetesen a "hosszú élek vonzása" miatt (Nei & Kumar 2000) kerülhettek jelenlegi helyükre, ugyanis a bennük lévő két adenin inzerció roppant elkülönülté teszi a legközelebbi rokon (17.b ábra), "fuciF" ribotípustól. Ezt az elágazást tehát nem tekintve a "fuciA" ribotípus után a "fuciF" klád leágazása következik, amely két klád szünpleziomorf karakterének tekinthető a hasonló virágforma: mindkét kládba tartozó bangónak hengeres, háromosztatú mézajka van, amely megnyúlt, szarv-szerű oldalsó karéjokat hordoz. A két csúcsi, fiatalabb klád pedig a két adriato-mediterrán csoportot, a korai és a kései virágzású poszméhbangókat különíti el. Ezek szünapomorf bélyege a lapos, kiterülő mézajak, amin az oldalsó karéjok nem, vagy alig dudorosak.

4.4. Szisztematikai, taxonómiai vonatkozások

A fentiek fényében értékelhetjük Delforge (2005), elsősorban virágmorfológiai bélyegek alapján felállított rendszerét (4. ábra). Az Umbilicata csoport korai leválasztása indokolt, de rokonsága a Bornmuelleri csoporttal nem igazolható. Sőt, a Fuciflora komplexen belül az Umbilicata speciális helyet foglal el, és – a közelrokon Argolica komplexhez hasonlóan – a bangó nemzetség Euophrys szekciójának egyik jól elkülönült, különálló kládját alkotja. Erre az eredményre jutott dolgozatában Gulyás (2007), és ezt hangsúlyozzák munkájukban Devey *et al.* (2008) is, akik a fenti kládon belül négy fő, egyenrangú kládot, a Sphegodes, Fuciflora, Scolopax és Umbilicata kládot különítik el (8. ábra). A mi adataink – direkt szekvenciákban az Umbilicata fajcsoport mintái rendszeresen APS2-t hordoztak, illetve a klón szekvenciák (CHU1, CHU8) is elkülönülnek a filogenetikai fán (19. ábra) –

is mind ezt az elkülönülést támogatják. Így csak szűkebb értelemben beszélhetünk Fuciflora fajkomplexről, mely nem tartalmazza az Umbilicata fajcsoportot (22. ábra).



22. ábra Az nrITS alapján kijelölhető főbb kládok a vizsgált *Ophrys* populációk mintáiban. A csoportok mellett az oda tartozó mintázott fajokat, míg a kládok mellett az adott csoportra jellemző APS típusát tüntettük fel. A Fuciflora s.str. komplexet az APS1 karakterizálja, melyen belül a Fuciflora és Tetraloniae kládokhoz a fajok nem voltak egyértelműen köthetők.

Delforge (2005) rendszeréhez képest az nrITS nem különítette el a keleti-mediterrán régió szarvasbangóit, azaz a Bornmuelleri és Heldreichii fajcsoportokat. Ezért azt mondhatjuk, hogy ezeknek az alakköröknek az elkülönítését az nrITS nem támogatja. Ugyanakkor elképzelhető, hogy az

Oestrifera rokonsági körön belül vannak elkülönült rokonsági körök, de ezek feltárásához a jelenleginél variábilisabb lókuszok vizsgálata szükséges. Így jelen adataink alapján az Oestrifera klád (H01 ribotípusú minták) magába foglalja a Delforge (2005) által a Bornmuelleri és Heldreichii fajcsoportba sorolt fajok egy részét is (1. táblázat). Így jelen eredmények szerint egy tágabb értelmezésű, keleti szarvasbangó fajcsoport különíthető el (Oestrifera fajcsoport), amely magában foglalja Delforge (2005) Oestrifera, Bornmuelleri és Heldreichii kládjait.

A 19. ábra további részletei, a "fuciF" klád leválása már Devey *et al.* (2008) kladogramján feloldatlan elágazást (lásd 8. ábra) is tartalmaz. A "fuciA" kládhoz képest fiatalabb, első leválást a "fuciF" klád ribotípusai és mintái tartalmazzák, amelyek megfelelnek Delforge (2005) Scolopax fajcsoportjának, azaz a nyugati szarvasbangók csoportjának (22. ábra).

A legfiatalabbnak tartott, "fuciB" és "fuciD" kládokhoz jóval nehezebb fajokat kötni, mert sokkal kevesebb direkt szekvenálással kapott ribotípust találtunk itt, hiszen ez a két klád az, amely a közép-európai varrat zónában leginkább érintett. Ráadásul az erőteljes génáramlásból során fellépő véletlen folyamatokat mutatja, hogy ugyanazon faj (*O. lacaitae*) szicíliai példányában véletlenszerűen a H14, míg közép-olaszországi példányában a H48 került uralomra. Tovább bonyolítja a képet a "domináns" CH21 jelenléte a mintákban, mely – úgy tűnik – gyorsan uralomra jut, amint azt az *O. serotina* esete példázza. Ennek klón szekvenciáiban csak a CH21 ribotípust találtuk meg (18. ábra), míg direkt szekvenciája a "fuciD" kládba tartozását valószínűsítené. A varrat zónán belüli véletlenszerű ribotípus összetétel (egyfajta "random drift") ezért nem teszi lehetővé a klón nrITS szekvenciák alapján a fajok egyértelmű kládokhoz kötését (lásd még a 18. ábrát is). Amíg

szerint a *Tetralonia* megporzású bangók a kései, míg az *Eucera* megporzásúak a korai csoportba tartoznak.

Megemlítendő ugyanakkor, hogy a ribotípusok közt talált igen kicsiny különbségek (a belcsoport esetében 2,7% variábilis helyek száma) nem tettek lehetővé robosztus, statisztikailag csak közepes (pp) vagy alacsony (bs) támogatottságú filogenetikai fa (19. ábra) generálását. Ennek feloldásához vagy variábilisabb lókuszt kell keresni (mely jelenleg nem megoldott, lásd bevezető), vagy más, variábilis lókusszal való kombinálását kell elvégezni. Ez folyamatban van, tapasztalatunk szerint a Chung & Staub (2003) által leírt ccSSR-17 primerrel egy, a bangó nemzetségben kismértékben variábilis kloroplaszt lókusz szaporítható fel. Mindenesetre a most kapott, alacsony támogatottságú fák egy, az eddiginél (8. ábra) kicsit mélyebb betekintést engednek az *Ophrys* nemzetség Fuciflora komplexének evolúciós viszonyaiba.

4.5. Fajfogalom a bangó nemzetségben

Az adatok eddigi elemzése során mindig automatikusan elfogadtuk a Delforge (2005) által felállított fajokat, mely Paulus & Gack (1990) munkájának szellemében extrém szűken értelmezi a fajhatárokat a nemzetségen belül. Eszerint minden olyan alak, mely önálló pollinátorral rendelkezik, külön fajba sorolandó, hiszen – elméletileg – prezigótikus barrierrel izolálódott a rokon alakoktól (Paulus 2006). Ez utóbbi nézőpontot pedig már számos szerző (Wood 2001; Pillon & Chase 2006; Pedersen & Faurholdt 2007; Devey *et al.* 2008) vitatta, azt feltételezve, hogy a rendszerezők (Devillers & Devillers-Terschuren 1994; Kreutz 2004; Delforge 2005) esetleg változatokat fogadnak el faji, alfaji rangon, és egymástól genetikailag nem elkülönült alakokat választanak szét.

Ez utóbbi nézőpontot jelen dolgozat nagymértékben támogatja, mert a Fuciflora (s.str.) komplexen belül talált nagymérvű génáramlás az izolációs barrier kis jelentőségére hívja fel a figyelmet. Ha pedig az elkülönített alakok egymástól genetikailag nem teljesen izolálódtak, akkor csupán a faj alatti kategóriák alkalmazhatók az alakok megnevezésére. Így aztán már nem csodálkozhatunk azon, hogy az nrITS nem választja szét a fajokat, mert esetleg azok nem is különültek faji szinten el. Ha pedig elfogadjuk, hogy a Delforge (2005) által közölt fajok inkább faj alatti kategóriákba sorolható alakok, és figyelembe vesszük Schiestl (2005) által közölt "szüngameon elméletet" (lásd 9. oldal), az nrITS tükrében négy "szüngameonként evolválódó" fajt különíthetünk a Fuciflora komplexen (s.str.) belül el. Ezek a keleti szarvasbangó (Ophrys oestrifera), a nyugati szarvasbangó (Ophrys scolopax), a korán virágzó poszméhbangó (Ophrys fuciflora) és a későn virágzó poszméhbangó (Ophrys tetraloniae). Az egyes "szüngameonfajokhoz" tartozó alakok pontos taxonómiai vizsgálata és besorolása az evolúciós viszonyokba az nrITS-énél mélyebb betekintést nyújtó, variábilis génszakaszok alkalmazását szükségeltetik. Ugyanakkor rámutatnak arra is, hogy a virágmorfológia (Delforge 2005), specifikus pollinátor (Paulus 2006) vagy a virág-illat összetétel (Véla et al. 2007) alapján képzett "fajok" nem tükrözik a biológiai fajfogalom szerint kívánatosnak tartott fajokat, legfeljebb azok faj alatti taxonjait.

5. Összefoglalás

A szexuális becsapással megporzott bangó (*Ophrys* L.) nemzetség (Schiestl *et al.* 1999) evolúcióbiológiai szempontból is roppant érdekes európai orchideafajokat foglal magában. A nemzetség zavarbaejtően variábilis virágmorfológiájával és alakgazdagságával tűnik ki, mely közelmúltbeli adaptív radiációjukhoz kapcsolódik (Wood & Cribb 2001, Soliva *et al.* 2001). Speciális, faj-specifikus megporzásuk (Paulus & Gack 1990) miatt számos szerző azt feltételezi, hogy minden olyan alak, mely önálló pollinátorral rendelkezik, külön fajba sorolandó, hiszen – elméletileg – prezigótikus barrierrel izolálódott a rokon alakoktól (Paulus 2006). Ugyanakkor jelentős génáramlást találtak (Soliva & Widmer 2003; Schiestl 2005) a fajok között, mely nehezen magyarázható erőteljes, specifikus pollinátorok általi prezigótikus izoláció esetén.

Munkacsoportunk 2002-ben kezdett hozzá a bangó nemzetség egyes fajai közti hibridizáció események nrITS alapján történő vizsgálatához. Felismertük, hogy az nrITS-ben a hibridizációra utaló ún. kettős csúcsok (APS, "additive polymorphic sites") vannak, és génáramlást találtunk három, elkülönültnek tartott faj között (Gulyás *et al.* 2005). A felmérések mind földrajzi, mind taxonómiai értelemben vett kiszélesítésével (gyakorlatilag a poszméhbangó komplexre és annak áreájára tágítva) a komplex adriatomediterrán áreáján hibridizációra (és introgresszióra) utaló APS-eket találunk (10. ábra) az nrITS szekvenciákban (Gulyás 2007). Mivel az APS-eket tartalmazó nrITS szekvenciák csak korlátozottan alkalmazhatók filogenetikai rekonstrukcióra (hiszen a legtöbb filogenetikai program nem értelmezi a kettős csúcsokat), célul tűztük ki az *Ophrys fuciflora* fajkomplexen belül található közép-európai varrat zóna (számos leszármazási vonal közös hibrid zónája) részletesebb vizsgálatát, az ortológ ribotípusok elkülönítését és

bevonását a filogenetikai rekonstrukcióba, ezzel igyekezve mélyebb betekintést nyerni a fajkomplex evolúciós viszonyaiba.

A poszméhbangó fajkomplexbe sorolt (Delforge 2005; 4. ábra) 77 faj közül 40 faj 105 populációját elemeztünk részletesen, de az elemzésekbe összehasonlító jelleggel bevontuk a korábbi molekuláris vizsgálatok által közelrokonnak tartott Argolica komplex 10 faját. Korábbi vizsgálatok (Soliva *et al.* 2002, Bateman *et al.* 2003, Devey *et al.* 2008) világosan megmutatták, hogy a Fuciflora – Argolica – Sphegodes fajkomplexeknek legközelebbi rokona, testvércsoportja az Apifera csoport, így az ide tartozó méhbangó (*Ophrys apifera* Huds.). Ezért – mint legközelebbi testvércsoportot – ezt a fajt használtuk külcsoportként a vizsgálatokban.

A direkt szekvenálások során kapott nrITS szekvenciákat ribotípusokba (unikális nrITS szekvencia változatok) vontuk össze (2. táblázat), és ábrázoltuk földrajzi elterjedésüket (15. ábra). Kiterjedt varrat zónát, azaz számos faj hibrid zónája által alkotott régiót (Hewitt 1999) mutattunk ki a közép-európai térségben. Az innen vett, egyes kettős csúcsokat (APS-eket) hordozó populációk egy-egy egyedét klónozással tovább vizsgáltuk. Erre azért volt szükség, mert az nrITS egy olyan multigén-család tagja, amely számos, akár pár ezer másolatban is jelen lehet a növényi nukleáris genomban (Hillis & Dixon 1991; Álvarez & Wendel 2003; Eickbush & Eickbush 2007). Ha pedig eltérő másolatok vannak jelen, akkor azok elkülönítése klónozással lehetséges (Baldwin *et al.* 1995), mely során a különböző kópiákból egyet szaporítunk fel, és számos klónt szekvenálva némi betekintést nyerünk a paralógokat tartalmazó egyed nrITS paralóg összetételébe.

A klónozások során 59 APS-t hordozó populáció egy-egy egyedének direkt szekvenciáját klónoztuk, egyedenként átlag±szórás 10,1±1,93 klónt szekvenálva meg. Ebből 479 klón nrITS szekvencia a Fuciflora komplex

azon 19 fajának 45 populációjából származott, melyet tovább elemeztünk. A pszeudogének (4 szekvencia) kizárása után a klón szekvenciákat 52 ribotípussá vontuk össze (3. táblázat). Ezek mennyiségi viszonyai (16. ábra) megmutatták, hogy bizonyos klón ribotípusok nagyon gyakoriak (ezeket domináns klón nrITS ribotípusoknak neveztük), mások ritkábban (szubdomináns klón ribotípusok), míg a többség akcidentálisan fordul elő. LaJeunesse & Pinzón (2007) meglátásának megfelelően mi csak a domináns és szubdomináns klónokat vizsgáltuk tovább, mert ezek nagy valószínűséggel az élőlények közti evolúciós viszonyt tükröző ortológ gének, míg a többi szinte bizonyosan egyeden belül keletkezett, filogenetikai szignál nélküli paralóg.

A domináns és szubdomináns klón ribotípusok földrajzi elterjedése (17.a ábra) sajátos képet mutatott. Egyes klón ribotípusok kisebb földrajzi területekre korlátozódtak, mások szélesebb elterjedésűek voltak, és inkább hiányuk volt feltűnő egyes földrajzi régiókban. Az elemzett ribotípusok közti valószínűsíthető filogenetikai viszonyt a TCS program által készített ribotípus hálózaton mutattuk be (17.b ábra), mely a ribotípusok két nagy csoportját különítette el. Egyik csoportot a nagy elterjedésű, leggyakoribb CH21 és rokonai (CH36, CH22, CH30, CH46), míg a másikat a közepesen gyakori és ritkább ribotípusok (CH09, CH02, CH01, CH06, CH33, CH48) alkották. A klón ribotípusok és a fajok közti viszony a ribotípusok frekvenciája alapján képzett DCA diagrammon nem mutatott feltűnő taxonómiai affinitást (18. ábra).

A domináns és szubdomináns klón ribotípusok, a külcsoport *O. apifera* szekvenciák, valamint az összehasonlításul bevont Argolica és Umbilicata csoportokból származó ribotípusok filogenetikai törzsfarekonstrukciója nagyon hasonló topológiájú fákat adott (19. ábra). A maximális parszimónia és a bayesi utólagos valószínűségek alapján képzett

fák megegyeztek (19.a ábra), míg a szomszéd csatolás módszerével készített fa kissé kisebb felbontást eredményezett (19.b ábra). A ribotípusok közti viszonyt bemutató fák kládjai közepes (bayesi utólagos valószínűségű), illetve alacsony statisztikai ("bootstrap") támogatásúak voltak, ami nagy valószínűséggel a szekvenciák közti roppant kis különbségekből (2,7% variábilis hely a teljes mátrixban) ered. Ezek a fák, alacsony támogatottságuk ellenére, az eddiginél (8. ábra) kicsit mélyebb betekintést engednek az *Ophrys* nemzetség Fuciflora komplexének evolúciós viszonyaiba.

Az Umbilicata és Argolica csoportokból ide került klón ribotípusok mellett az alapi, feloldatlan elágazásból ered a Fuciflora (s.str.) komplex legkorábbi ága, a keleti mediterrán szarvasbangók kládja ("fuciA" klád, CH21, H01 ribotípusok jellemzik). Ezt követi a CH33 és CH48 szubdomináns ribotípusok kládja, mely valószínűleg a "hosszú ágak vonzása" miatt került a fákon látott helyre, és nem bizonyos, hogy ortológ ribotípusokat tartalmaz. A filogenetikai fa csúcsán három klád van, melynek legelső leágazása (19.a ábra) a nyugati szarvasbangókra jellemző klád ("fuciF" klád, CH01 és H16 ribotípusok), majd testvérhelyzetben az Appennini-félszigetről származó két klád, a "fuciB" (CH08 és H48 ribotípusok) valamint a "fuciD" klád (CH02 és H14 ribotípusok).

Ennek megfelelően négy fő kládot sikerült kimutatni az elemzett *Ophrys* populációk nrITS szekvenciáiban, melyek földrajzi affinitása világos (15. ábra és 17.a ábra): a "fuciA" a Balkán-félsziget, a "fuciF" az Ibériaifélsziget és Észak-Afrika jellemző ribotípusa, addig a "fuciB" és "fuciD" kládok viszont mindketten az Appennini-félsziget jellemző ribotípusait tartalmazzák. Az európai élővilág glaciális történetének ismeretében (Hewitt 1999, 2004) joggal feltételezzük, hogy a négy klád a három nagy európai glaciális refúgiumban izolálódott a legutolsó glaciális során, amikor a termofil poszméhbangó ősök nagy valószínűséggel ide húzódtak vissza. A

posztglaciális klímajavulással pedig áreájuk kiterjedt, és az eltérő ősi leszármazási vonalak kereszteződéséből jött létre a napjainkban látható kiterjedt varrat zóna (21. ábra).

Nyitva marad azonban a kérdés, hogy hogyan izolálódhatott két leszármazási vonal ("fuciB" és "fuciD") is ugyanazon elsődleges refúgiumban? Erre populációgenetikai differenciációt tesztelő AMOVA elemzésekkel kerestük a választ a két érintett klád domináns és szubdomináns ribotípusainak bevonásával, mely során partícionáltuk a genetikai variabilitást 1.) a Delforge (2005) által felállított fajok közt; 2.) a Delforge (2005) által megadott fajcsoportok közt (lásd 1. táblázat); 3.) földrajzi régiók közt (13. ábra); 4.) a virágzási idő alapján képzett fenológiai csoportok közt. Habár elemzéseinkben Szicília földrajzi elkülönülését megerősítettük, további földrajzi struktúrát nem találtunk az adatokban (4. táblázat). Érdekes csoportok közötti differenciációt találtunk viszont a korán virágzó és a későn virágzó poszméhbangók közt (20. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy szimpatrikus helyzetben az eltérő virágzási idő, és az ahhoz kapcsolódó külön megporzó méhnem izolálta a két kládot.

Ennek megfelelően az *Ophrys fuciflora* (s.str.) komplexben 4 fő leszármazási ágat különíthetünk el (22. ábra): a tágabb értelemben vett keleti szarvasbangók kládja ("fuciA"), mely az *O. oestrifera* rokonsági köre mellett egyéb, keleti-mediterrán fajcsoportokat is magába foglal; a nyugati szarvasbangók kládja ("fuciF"), mely az *O. scolopax* faj rokonait tartalmazza; a korai virágzású poszméhbangók kládja ("fuciD"), mely a délolasz *O. fuciflora* rokonokat tartalmazza; és a kései virágzású poszméhbangók kládja ("fuciB"), mely a *Tetralonia* nembe tartozó méhek által megporzott *O. tetraloniae* rokonait foglalja magában.

Vizsgálatunk megerősítette a korábban észlelt jelentős génáramlást a csoportban, amit nem csak a Fuciflora fajkomplexen belül, de más, rokon

csoportok között is kimutattunk. Találtunk ugyanis a Fuciflora komplexhez tartozó fajok klónjai között Argolica komplexből, vagy az Umbilicata csoportból származó ribotípusokat is. A talált erős génáramlás felveti a prezigótikus izoláció hangoztatottnál (Paulus 2006) gyengébb voltát, melyre már más kutatók is felhívták a figyelmet (Soliva & Widmer 2003; Schiestl 2005; Devey *et al.* 2008). Sőt, ráirányítja a figyelmet arra a véleményre (Wood 2001; Pillon & Chase 2006; Pedersen & Faurholdt 2007; Devey *et al.* 2008), mely szerint a bangók jelenlegi rendszerezői sokszor változatokat fogadnak el faji rangon, és egymástól genetikailag nem elkülönült alakokat választanak szét.

Ez utóbbi nézőpontot jelen dolgozat nagymértékben támogatja, mert a Fuciflora (s.str.) komplexen belül talált nagymérvű génáramlás az izolációs barrier kis jelentőségére hívja fel a figyelmet. Ha pedig az elkülönített alakok egymástól genetikailag nem teljesen izolálódtak, akkor csupán a faj alatti kategóriák alkalmazhatók az alakok megnevezésére. Ha pedig elfogadjuk, hogy a Delforge (2005) által közölt fajok inkább faj alatti kategóriákba sorolható alakok, és figyelembe vesszük Schiestl (2005) által közölt "szüngameon elméletet" (lásd 9. oldal), az nrITS tükrében négy "szüngameonként evolválódó" fajt különíthetünk a Fuciflora komplexen (s.str.) belül el. Ezek a keleti szarvasbangó (*Ophrys oestrifera*), a nyugati szarvasbangó (*Ophrys scolopax*), a korán virágzó poszméhbangó (*Ophrys fuciflora*) és a későn virágzó poszméhbangó (*Ophrys tetraloniae*). Az egyes "szüngameon-fajokhoz" tartozó alakok pontos taxonómiai vizsgálata és besorolása az evolúciós viszonyokba az nrITS-énél mélyebb betekintést nyújtó, variábilis génszakaszok alkalmazását szükségeltetik.

6. Summary

Sequence variability of the nrITS in the *Ophrys fuciflora* species-complex of the Mediterranean bee-orchid (*Ophrys* L.) genus

The European bee-orchids (*Ophrys* L.) are quite interesting not only because of their pollination by deceit (Schiestl *et al.* 1999), but the genus also serves as an exciting example of adaptively radiated plant groups for evolutionary biologists. The genus is famous for its embarrasingly variable floral morphology, which is attbributable to its recent adaptive radiation (Wood & Cribb 2001, Soliva *et al.* 2001). Their special, species-specific pollination (Paulus & Gack 1990) has a spectacular consequence: many authors assume that all form which has a specific pollinator should be considered to be separate species, since it has the possibility to be isolated from their relatives by a prezygotic barrier (Paulus 2006). On the other hand, Soliva & Widmer (2003) and Schiestl (2005) has reported significant geneflow between *Ophrys* species, a phenomenon being hardly explainable if one accept the existence of a strong, prezygotic isolation mediated by specific pollinators.

Our workgroup has started to investigate hybridisation between certain *Ophrys* species with the nrITS (ribosomal ITS of the nuclear genome) in 2002. We have found hybridisation-caused double-peaks (APSs, "additive polymorphic sites") in the nrITS, and we reported gene-flow between three, distantly related species (Gulyás *et al.* 2005). By expanding the geographical and taxonomical scope of our investigations (in fact, to the *Ophrys fuciflora* species-complex and its area), we have found hybridisation and subsequent introgression related APSs (Gulyás 2007) on the whole adriato-mediterranean

part of its area (10. ábra / Fig. 10.). Since much phylogenetic software do not distinguish between different types of APSs, nrITS sequences with APSs can thus be used for phylogenetic reconstruction limitedly. So we have aimed to investigate the Central-European suture zone (common hybrid zone of many genealogical lineages) of the *Ophrys fuciflora* complex in detail, the identification of orthologous ribotypes, and their involvement in the phylogenetic reconstruction to gain a deeper insight into the evolutionary relationship of the complex.

105 populations of 40 species out of the 77 species (Delforge 2005; 4. ábra / Fig. 4.) in the *Ophrys fuciflora* species-complex were studied in detail, with the addition of 10 species from the related Argolica species-complex for comparison considerations. As earlier studies (Soliva *et al.* 2002; Bateman *et al.* 2003; Devey *et al.* 2008) has clearly indicated, the sister group of the Fuciflora – Argolica – Sphegodes complexes is the Apifera group. Thus, sequences of *Ophrys apifera* Huds., as closest relative, were used as outgroup in the investigations.

The direct nrITS sequences were collapsed into ribotypes (unique nrITS sequence variants) (see 2. táblázat / table 2.), and we mapped their geographic distribution (15. ábra / fig. 15.). An extended suture zone, formed by several species' hybrid zones (Hewitt 1999), was found in the Central European region. Some of these populations with APSs were selected here for further investigation, and one individual was cloned from these populations. Cloning was necessary because nrITS is a so-called multi-gene family, i.e. numerous, up to few thousand copies may present in the plant nuclear genome (Hillis & Dixon 1991; Álvarez & Wendel 2003; Eickbush & Eickbush 2007). And in the presence of heterologous nrITS copies, cloning can unravel the variability (Baldwin *et al.* 1995) by amplifying only one copy out of the numerous present. Furthermore, the sequencing of some clones

throws some light on the nrITS paralogue composition of the paraloguebearing individual.

One individual's direct sequence from 59 APS-bearing populations was cloned with 10.1 ± 1.93 (mean \pm s.d.) sequences per individual. 479 clone nrITS sequences originated from 45 populations of the 19 species of the Fuciflora complex were studied further. After the exclusion of 4 pseudogenes, the remaining clone sequences were collapsed into 52 ribotypes (3. táblázat / table 3.). The frequencies of these ribotypes (16. ábra / fig. 16.) showed that certain ribotypes were quite frequent (that were called dominant clone nrITS ribotypes), others were less common (the subdominant ribotypes), while the majority occurred only accidentally. According to the instructions of LaJeunesse & Pinzón (2007), only the dominant and subdominant clone ribotypes were included in all further analyses, since these are most probably orthologues copies that represent the evolutionary relationship between the species, while the remaining are paralogues without phylogenetic signal.

The geographic distribution of the dominant and subdominant clone ribotypes has shown (17.a ábra / fig. 17.a) some interesting features. Certain clone ribotypes were confined to smaller geographic regions, while others were much more extendedly distributed and their lack in some regions were more conspicuous. The possible phylogenetic relationship between the ribotypes was assessed by TCS (17.b ábra / fig. 17.b), which has split the ribotypes into two main groups. One of them was the group of the largely distributed and most frequent CH21 and its allies (CH36, CH22, CH30, CH46), while the other was constituted by less frequent or rare ribotypes (CH09, CH02, CH01, CH06, CH33, CH48). No conspicuous relationship between the species and the ribotypes was found on the DCA diagram generated from the clone ribotypes frequencies.

The phylogenetic tree reconstruction of the dominant and subdominant clone ribotypes, the outgroup *O. apifera* sequences, and the ribotypes from the comparative Argolica and Umbilicata groups yielded similar trees in topology. The trees constructed with Maximum Parsimony method and Bayesian posterior probability method were identical (19.a ábra / fig. 19.a), while the Neighbour Joining tree has shown a bit shallower resolution (19.b ábra / fig. 19.b). However, all tree-building method has yielded tree-branches with medium (Bayesian posterior probabilities) or low (bootstrap) statistical supports, which may be due to the extremely low sequence variability between the ribotypes (2.7% variable sites in the whole matrix). Instead of the low statistical certainty, these trees, however, gives a bit deeper than present (8. ábra / fig. 8.) insight into the evolutionary relationship of the Fuciflora complex of the genus *Ophrys*.

The basal polytomy contains the ribotypes of the Argolica and Umbilicata groups, and the basal lineage of the Fuciflora complex also roots from this unresolved point. This is the clade of the "eastern scolopaxoid" bee-orchids (calde "fuciA") with the characteristic ribotypes CH21, H01. The following lineage contains two subdominant ribotypes, the closely related CH33 and CH48, which may erroneously present here due to "long-branch attraction", and it is not sure that they are even orthologous copies. The "tip" of the tree is constituted up by three clades, the first of which contains the species of "western scolopaxoid" bee-orchids (clade "fuciF") with ribotypes CH01 and H16. This is followed by two sister-clades at the tip of the tree, the clade "fuciB" (ribotypes CH08 and H48) and the clade "fuciD" (ribotypes CH02 and H14), all of them are distributed in the Apennine Peninsula.

Altogether, four main nrITS lineages were unravelled by our investigations in the analysed nrITS sequences of the studied *Ophrys* populations. All clades had clear geographical affinities (15. & 17.a ábra /

fig. 15. & 17.a): the clade "fuciA" is the characteristic clade of the Balkan Peninsula; the clade "fuciF" is distributed in the Iberian Peninsula and Northern Africa; while clades "fuciB" and "fuciD" are both characteristic for the Apennine Peninsula. Keeping the recent history of the European biota in mind (Hewitt 1999, 2004), one may well postulate that the four main clades were isolated and formed in the three great primary glacial refugia during last glaciations, when the thermophilous ancestors of the Fuciflora species-complex were retreated back here. The area of the species has probably expanded with postglacial warming, and the nowadays' huge suture zone is formed by the amalgamation of the previously distinct, ancient nrITS lineages (21. ábra / fig. 21.).

The question of how could two main lineages ("fuciB" and "fuciD") sympatrically isolate in the same refugium is still open. To answer this question, the hierarchical AMOVA method, that quantifies the genetic differentiation between and within predefined groups of samples, was applied on the clone ribotypes of the two clades. We partitioned the genetic differentiation i) between the species of Delforge (2005); ii) between the species groups (see 1. táblázat / table 1.) of Delforge (2005); iii) between geographic regions (13. ábra / fig. 13.); iv) between flowering-time based phenological groups. Though the analysis found significant genetic isolation between Sicily and the rest, no further structure was seen in the geographical analysis (4. táblázat / table 4.). Notwithstanding, conspicuous and significant genetic differentiation was found between the early flowering and late flowering "fucifloroid" bee-orchids (21. ábra / fig. 21.). This inspired the conclusion of pointing to the different flowering period as key isolation factor in the sympatrical isolation of the two Apennini clades.

Altogether, we identified 4 main nrITS clades (22. ábra / fig. 22.) within the *Ophrys fuciflora* species-complex (s.str.): the clade ("fuciA") of

the eastern "scolopaxoid" bee-orchids which is composed of the *O. oestrifera* and its allies, and other Eastern Mediterranean species-groups, the Bornmuelleri and the Heldreichii groups; the clade ("fuciF") of "western scolopaxoid" bee-orchids including the *O. scolopax* and its allies; the clade ("fuciD") of early-blooming "fucifloroid" bee-orchids with the *O. fuciflora*-like Southern Italian species; and the clade ("fuciB") of late-blooming "fucifloroid" bee-orchids encountering the *Tetralonia* bees pollinated *O. tetraloniae* and its allies.

Our results confirm the previous findings on the extensive gene-flow within the *Ophrys* species, and we found it to be not confined to the speciescomplex, but also sequenced ribotypes from samples of the Fuciflora complex that were identical with Argolica or Umbilicata sequences. This finding implies the weaker character of the presently emphasised (Paulus 2006) prezygotic barrier, a conclusion which has also been drown by other researchers (Soliva & Widmer 2003; Schiestl 2005; Devey *et al.* 2008). Moreover, it also drives our attention to an opinion, which claims that the majority in *Ophrys* systematics accepts minor variants at the species level, and distinguishes forms that are not isolated genetically.

This latter point of view is supported by this work which presents intensive gene-flow within the Fuciflora complex (s.str.), and it also brings our attention to the less significant nature of the isolating barrier. And if the distinguished forms are not completely isolated genetically, we should only apply the subspecific taxonomic ranks for them. Subsequently, if accepting that the majority of species in the book of Delforge (2005) should be treated below the species rank, and we accept the syngameon hypothesis of Schiestl (2005), in the mirror of the nrITS we can recognise four species that evolve as syngameon in the *Ophrys fuciflora* complex (s.str.). These are the eastern *Ophrys oestrifera*, the western *O. scolopax*, the early-blooming *O. fuciflora*

and the late-blooming *O. tetraloniae*. The question of which currently described "species" (microspecies) belongs exactly to which "syngameon species" and at which taxonomic rank, is still open, and requires the utilisation of more variable marker than nrITS.

7. Köszönetnyilvánítás

A nagyszámú szekvenciát felhasználó munkához számos személytől kaptam segítséget, a mintagyűjtéstől a DNS-kivonáson át a klónozásokig, és a statisztikai elemzésekig. Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Molnár V. Attilának, aki sokszor saját forrásainak felhasználásával tette lehetővé a munkavégzést. Szintén köszönöm Dr. Borbély Györgynek, hogy ösztöndíjam alatt, majd lejárta után lehetővé tette a munkavégzést a Növénytani Tanszéken. Különösen köszönöm Dr. Gulyás Gergely segítségét a DNS technika elsajátításában, és - amíg lehetősége volt rá – a mindennapi munkavégzésben. Az adatanalízisben segítkező, és számos Pénzes adó szakmai tanácsot Dr. Zsoltnak köszönöm türelmes segítségnyújtását. Dr. Bratek Zoltánnak, Illyés Zoltánnak, Dr. Rudnóy Szabolcsnak bevezetésemet köszönöm a DNS technikába, míg Egedi Sándornak, Dr. Kovács M. Gábornak és Major Ágnesnek a szekvenálással és kivonással kapcsolatos, míg Dr. Karaffa Erzsébetnek és Dr. Fekete Erzsébetnek a szekvenálással, klónozásokkal kapcsolatos gyakorlati jótanácsokat, segítséget köszönöm. Köszönöm a mintagyűjtésben való közreműködését Matthias Fiedler-nek, Olivier Gerbaud-nak, Ernst Gügelnek, Stephan és Kerstine Hertel-nek, Óvári Miklósnak, Magos Gábornak, Máté Andrásnak, Mészáros Andrásnak, Simon Pálnak, Sulyok Józsefnek, Schmotzer Andrásnak, Jana Táborská-nak, Vidéki Róbertnek, Jaroslav

Vlčko-nak, Wolfgang Wucherpfennig-nek. A munkát anyagilag az OTKA K69224 számú pályázata támogatta.

8. Irodalomjegyzék

- Aceto S, Caputo P, Cozzolino S, Gaudio L, Moretti A (1999) Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on its DNA variation: Morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 67-76.
- APG II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution.* 2nd ed. Sinauer Associates Publisher, Sunderland
- Ayasse M, Schiestl FP, Paulus HF, Ibarra F, Francke W (2003) Pollinator attraction in a sexually deceptive orchid by means of unconventional chemicals. *Proceedings of the Royal Society London. Series B, Biological Sciences* 270: 517-522.
- Ayasse M, Schiestl FP, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W (2000) Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid *Ophrys sphegodes*: How does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success? *Evolution* **54**(6): 1995-2006.
- Álvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417-434.
- Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE (2003) Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455.
 - 96

- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- ter Braak CJF, Smilauer P (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5.). Microcomputer Pwewr, Ithaca.
- Bateman RM, Hollingsworth PM, Preston J, Yi-Bo L, Pridgeon AM, Chase MW (2003) Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 1-40.
- Bateman RM, Pridgeon AM, Chase MW (1997) Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoidea, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences.
 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. *Lindleyana* 13(3): 113-141.
- Baumann B, Baumann H (2007) Zur Bestäubung von Ophrys holoserica s.l. Jahresberichte des Naturwissenschaftlichen Vereins Wuppertal e. V. 60: 153-175.
- Bayly MJ, Ladiges PY (2007) Divergent paralogues of ribosomal DNA in eucalypts (Myrtaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 346-356.
- Bensch S, Åkesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14: 2899-2914.
- Bernardos S, Amich F, Gallego F (2003) Karyological and taxonomic notes on *Ophrys* (Orchidoideae, Orchidaceae) from the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 395-406.
- Bernardos S, Crespí A, Del Rey F, Amich F (2005) The section Pseudophrys (*Ophrys*, Orchidaceae) in the Iberian Paninsula: a morphometric and
 - 97

molecular analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **148**: 359-375.

- Bernardos S, Santos MA, Tyteca D, Amich F (2006) Phylogenetic relationships of Mediterranean Neottieae and Orchideae (Orchidaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS sequences. *Acta Botanica Gallica* 153(2): 153-165.
- Chase MW, Kurzwiel H, Linder P, Cribb PJ (2001) II. Orchidoideae (Part 1). In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) Genera Orchidacearum Volume 2 Orchidoideae (Part 1). Oxford University Press, New York, p.: 6-9.
- Chung SM, Staub JE (2003) The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 757-767.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**:1657–1660.
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* **3**: 432-438.
- Cornish-Bowden A (1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. Nucleic Acids Research 13: 3021 - 3030.
- Correvon H, Pouyanne A (1916) Un curieux cas de mimétisme chez les Ophrysdées. Journal Societatis Naturalis d'Horticulture de France 17: 29-31, 41-42, 84.
- Cozzolino S, D'Emerico S, Widmer A (2004) Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proceedings of the Royal Society London. Series B, Biological Sciences* **271**: 259-262.
 - 98

- Cozzolino S, Widmer A (2005) Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* **20**(9): 487-494.
- Danesch E, Danesch O (1972) Orchideen Europas. Ophrys-Hybriden. Hallwag Verlag, Bern
- Darwin C (1862) On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects. John Murray, London
- Delforge P (1994) Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient. Delachaux et Niestlé, Paris
- Delforge P (2001) Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient, 2^{éme} edn. Delachaux et Niestlé, Paris
- Delforge P (2005) *Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du* Proche-Orient, 3^{éme} edn. Delachaux et Niestlé, Paris
- Delforge P (2006) Orchids of Europe, North Africa and the Middle East. 3rd edn. A & C Black, London
- D'Emerico S, Pignone D, Bartolo G, Pulvirenti S, Terrasi C, Stuto S, Scrugli A (2005) Karyomorphology, heterochromatin patterns and evolution in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 87-99.
- Devey DS, Bateman RM, Fay MF, Hawkins JA (2008) Friends or relatives? Phylogenetics and species delimitation in the controversial European orchid genus *Ophrys. Annals of Botany* **101**(3): 385-402.
- Devillers RM, Devillers-Terschuren J (1994) Essai d'analyse systématique du genere *Ophrys. Les Naturalistes belges* **75**: 273-400.
- Devos N, Raspé O, Oh SH, Tyteca D, Jacquemart AL (2006) The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: Insight from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 767-778.

- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amount of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Doyle JJ, Gaut BS (2000) Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Molecular Biology* **42**: 1-23.
- Ehrendorfer F (1980) Hybridisierung, Polyploidie und Evolution bei europäischer-mediterranen Orchideen. *Die Orchidee* (Sonderheft): 15-34.
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**: 477-485.
- Elder JF, Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology* **70**(3): 297-320.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- Gigord LDB, Macnair MR, Smithson A (2001) Negative frequencydependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 6253-6255.
- Godfery MJ (1928) Classification of the genus *Ophrys. Journal of Botany* **66**: 33-36.
- Gölz P, Reinhard HR (1985) Statistische Untersuchungen an Ophrys bornmuelleri M. Schulze und Ophrys kotschyi H. Felischmann & Soó. – Mitteilungsblatt Arbeitskreis Heimische Orchideen Baden-Württemberg 13(3): 446-491.
- Grünanger P, Caporali E, Marziani G, Menguzato E, Servttaz O (1998) Molecular (RAPD) analysis on Italian taxa of the *Ophrys bertolonii* aggregate (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **212**: 177-184.

- Gulyás G (2007) Az Ophrys fuciflora fajkomplex (Orchidaceae) molekuláris
 vizsgálata. Doktori (PhD) értekezés (mscr). Debreceni Egyetem Biológia
 Doktori Iskola, Debrecen
- Gulyás G, Sramkó G, Molnár VA, Rudnóy Sz, Illyés Z, Balázs T, Bratek Z (2005) Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47: 61-67.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hershkovitz MA, Zimmer EA (1996) Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucleic Acid Research* **24**(15): 2857-2867.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**, 537-549.
- Hewitt GM (2004) The structure of biodiversity insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1: 4.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**(4): 411-453.
- Isaac NJB, Mallet J, Mace GM (2004) Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 464-469.
- Jorgensen RA, Cluster PA (1988) Modes and tempos of in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of Missouri Botanical Garden* 75: 1238-1247.

- Kreutz CAJ (2004) Catalogue of European orchids. Kreutz Publisher, Landgraaf
- Kullenberg B (1961) Studies in Ophrys pollination. Zoologiska Bidrag fran Uppsala 34: 1-340.
- LaJeunesse TC, Pinzón JH (2007) Screening intragenomic rDNA for dominant variants can provide a consistent retrieval of evolutionary persistent ITS (rDNA) sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 417-422.
- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological genetics: design, analysis, and application.* Blackwell Publishing, Malden
- Mai JC, Coleman AW (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 258-271.
- Molnár VA (2000) Orchidaceae Kosborfélék családja. In: Simon T. (ed.) A magyarországi edényes flóra határozója. 4., átdolgozott kiadás. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**(4): 208-216.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* **39**: 121-152.
- Nelson E (1962) Gestaltwandel und Artbildung erörtert am Beispiel der Orcidaceen Europas und der Mittermeerländer insbesondere der Gattung Ophrys – mit einer Monographie und Ikonographie der Gattung Ophrys. Fischer Verlag, Chernex-Montreux
- Ochieng JW, Henry RJ, Baverstock BR, Steane DA, Shepherd M (2007) Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the
 - 102

eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 752-764.

- Paulus HF (2006) Deceived males Pollination biology of the Mediterranean orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Journal Europäischer Orchideen* 38(2): 303-353.
- Paulus HF, Gack C (1990) Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). *Israel Journal of Botany* **39**: 43-79.
- Pedersen HÆ, Faurholdt N (2002) Ophrys Versuchsweise Definitionen der Kategorien Art, Unterart und Varietät in der Gattung und einige daraus resultierende taxonomische Änderungen. Die Orchidee 53(3): 341-346.
- Pedersen HÆ, Faurholdt N (2007) *Ophrys, the bee orchids of Europe*. Kew Publishing, Kew
- Pillon Y, Chase MW (2007) Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conservation Biology* 21(1): 263-265.
- Podani J (2007) A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana. Második, bővített kiadás. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Pridgeon AM, Bateman RM, Cox AV, Hapman JM, Chase MW (1997) Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoidea, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. *Lindleyana* 12(2): 89-109.
- Razafimandimbison SG, Kellogg EA, Bremer B (2004) Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: A case study from Naucleeae (Rubiaceae). *Systematic Biology* **53**(2): 177-192.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**: 359-389.
 - 103

- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Roy BA, Widmer A (1999) Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon. *Trends in Plant Science* **4**(8): 1360-1385.
- Schiestl FP (2005) On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften* **92**: 255-264.
- Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt Ch, Hansson BS, Ibarra F, Francke W (1999) Orchid pollination by sexual swindle. *Nature* 399: 421-422.
- Schlüter PM, Kohl G, Stuessy TF, Paulus HF (2007a) A screen of low-copy nuclear genes reveals the *LFY* gene as phylogenetically informative in closely related species of orchids (*Ophrys*). *Taxon* **56**(2): 493-404.
- Schlüter PM, Ruas PM, Kohl G, Ruas CF, Stuessy TF, Paulus HF (2007b) Reproductive isolation in the Aegean *Ophrys omegaifera* complex (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **267**: 105-119.
- Soliva M, Kocyan A, Widmer A (2001) Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 78-88.
- Soliva M, Widmer A (2003) Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* 57: 2252-2261.
- Soó R (1970) Species and subspecies of the genus *Ophrys. Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungariae* **16**(3-4): 373-392.
- Sramkó G, Gulyás G, Bán Á, Pénzes Cs, Nagy Sz, Molnár VA (ined.) Conservation phylogenetics of endangered *Ophrys kotschyi* (Orchidaceae) based on nrITS sequences. *Conservation Genetics* (under revision)
 - 104

- Stebbins GL, Ferlan L (1955) Population variability, hybridization, and introgression in some species of *Ophrys*. *Evolution* **10**: 32-46.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596–1599.
- Véla E, Tirard A, Renucci M, Suehs CM, Provost E (2007) Floral chemical signatures in the genus *Ophrys* L. (Orchidaceae): a preliminary test of a new tool for taxonomy and evolution. *Plant Molecular Biology Reporter* 25: 83-97.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34: 275-305.
- Vollmer SV, Palumbi SR (2004) Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology* 13: 2763-2772.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San-Diego, pp. 315-322.
- Wood J (2001) Distribution. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) Genera Orchidacearum Volume 2 Orchidoideae (Part 1). Oxford University Press, New York, p.: 329.
- Wood J, Cribb PJ (2001) Taxonomic notes. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum Volume 2*
Orchidoideae (Part 1). Oxford University Press, New York, pp.: 332-333.

Wörheide G, Nichols SA, Goldberg J (2004) Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers in sponges (Phylum Porifera): implications for phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 816-830.

106

AZ nrITS SZEKVENCIA VÁLTOZATOSSÁG A MEDITERRÁN BANGÓ (*Ophrys* L.) Nemzetség poszméhbangó (*O. fuciflora*) fajkomplexében

> Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a biológia tudományágban

Írta: Sramkó Gábor okleveles biológus (ökológus)

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája (biodiverzitás programja) keretében

Témavezetők: Dr. Molnár V. Attila Prof. Dr. Varga Zoltán

A doktori szigorlati b	oizottság:	
elnök:	Prof. Dr. Borbély György	
tagok:	Dr. Somlyay Lajos	
	Dr. Nagy Miklós	
A doktori szigorlat id	lőpontja: Debrecen, 2008. 04	ł. 03
Az értekezés bírálói:		
	Dr. Papp Mária	
	Dr. Penksza Károly	
A bírálóbizottság:		
elnök:	Prof. Dr. Dévai György	
tagok:	Dr. Pecsenye Katalin	
	Dr. Vojtkó András	
	Dr. Vasas Gábor	
	Dr. Karaffa Levente	

Az értekezés védésének időpontja: 200....