



1949

Molekuláris genetikai módszerek a botanikai kutatásban

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Malkócs Tamás

Témavezető

Dr. Sramkó Gábor
kutatócsoport vezető

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2022

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács, **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Botanika doktori** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2022. április 20.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Malkócs Tamás** doktorjelölt **2017- 2020** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Botanika doktori** programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult.*

Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2022. április 20.

a témavezető aláírása

Molekuláris genetikai módszerek a botanikai kutatásban

Molecular genetic methods in botanical research

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

Írta: **Malkócs Tamás** okleveles Tenger- és Halászatökológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola** Botanika
Doktori Programja kerében

Témavezető: Dr. Sramkó Gábor

Az értekezés bírálói:

.....	
.....	

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

.....	
.....	
.....	

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	1
1. Bevezetés.....	3
1.1. Általános bevezetés.....	3
1.2. Célkritizések.....	22
2. Esettanulmányok.....	23
2.1. Mikroszatellit markerek fejlesztése a fokozottan védett, tetraploid mocsári kardvirágban (<i>Gladiolus palustris</i> Gaud.).....	23
2.1.1. Irodalmi előzmények.....	23
2.1.2. Módszerek és eredmények.....	24
2.1.3. Konklúziók.....	29
2.2. Új SSR markerek fejlesztése a fokozottan védett, endemikus magyarföldi husángban (<i>Ferula sadleriana</i> Ledeb.).....	30
2.2.1. Irodalmi előzmények.....	30
2.2.2. Módszerek és eredmények.....	31
2.2.3. Konklúziók.....	37
2.3. A veszélyeztetett, endemikus magyarföldi husáng (<i>Ferula sadleriana</i> Ledeb.) természetvédelmi célú populációgenetikai vizsgálata.....	37
2.3.1. Irodalmi előzmények.....	37
2.3.2. Anyag és módszer.....	41
2.3.3. Eredmények.....	48
2.3.4. Diszkusszió.....	60
2.4. A pontuszi sztyeppe eddig ismeretlen, kriptikus zsálya (<i>Salvia</i> L.) fájának azonosítása és jellemzése morfometriai és genomi módszerekkel.....	67
2.4.1. Irodalmi előzmények.....	67
2.4.2. Anyag és módszer.....	73
2.4.3. Eredmények.....	80
2.4.4. Diszkusszió.....	88
2.4.5. Konklúziók.....	91
3. Összefoglalás.....	96
4. Summary.....	101
5. Köszönetnyilvánítás.....	105
6. Irodalomjegyzék.....	106
7. Szerzői hozzájárulás az egyes esettanulmányokhoz.....	118
8. Publikációk listája.....	119
9. Függelék.....	123

Rövidítések

ABC	Approximate Bayesian Computation – Megközelítő Bayesiánus számítás
aDNS	Ancient DNS – Ősi DNS, régészeti leletekből nyert DNS
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism – Amplifikált fragmentek hosszúsági polimorfizmusa
BFD	Bayes Factor Species Delimitation – Bayes-faktor alapú faji lehatárolást
BIC	Bayesian Information Criterion – Bayesiánus információs kritérium
BS	Bootstrap
CAP	Cleaved Amplified Polymorphic DNA – Felszaporított DNS szekvenciák restrikciós endonukleázzal való emésztése
cpDNS	Kloroplaszt DNS
cpSSR	Kloroplaszt genomban található SSR
DAPC	Discriminant Analysis of Principal Components – Főkomponensek diszkriminancia-analízise
ESS	Effective Sample Size – Effektív mintanagyság
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium – Hardy-Weinberg egyensúly
IBD	Isolation by Distance – Távolság általi izoláció
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat – Köztes egyszerű szekvencia ismétlődés
IUCN	Internation Union for Conservation of Nature – Természetvédelmi Világszövetség
LD	Linkage Disequilibrium – Genetikai kapcsoltság

MCMC	Markov Chain–Monte Carlo – Markov Lánc–Monte Carlo algoritmus
ML	Maximum Likelihood – Legnagyobb valószínűség
MLE	Marginal Likelihood Estimate – Becsült marginális valószínűség
mtDNS	Mitokondriális DNS
nrITS	Nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer – Sejtmagi riboszomális belső átírt spacer
PCA	Principal Component Analysis – Főkomponens elemzés
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polimeráz láncreakció
RADseq	Restriction-site Associated Sequencing – Restrikciós helyhez kapcsolt DNS szekvenálás
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA – random PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism – Restrikciós fragmentek hosszúsági polimorfizmusa
RMAE	Relative Median of the Absolute Error – Abszolút hiba relatív mediánja
RRL	Reduced Representation Library – Csökkentett genomi reprezentációs könyvtár
SBS	Sequencing by Synthesis – Szintézis általi szekvenálás
SNP	Simple Nucleotide Polymorphism – Egynukleotid-polimorfizmus
SSR	Simple Sequence Repeat – Mikroszatellit szekvencia
STR	Short Tandem Repeat – Rövid tandem ismétlődő szekvenciák
PP	Posterior Probability – Utólagos valószínűség
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

1. Bevezetés

1.1. Általános bevezetés

Az emberiség a kezdetektől fogva érdeklődik a növények iránt. Ezt az érdeklődést legkorábban a növények élelemként vagy a gyógyászatban való alkalmazhatósága fűtötte. A botanika, mint az egyik legősibb tudományág gyökereit is itt kell keresni, a növényeket legkorábban rendszerezők ugyanis leggyakrabban felhasználásuk szerint csoportosították a növényeket. A modern botanika alapjait a felvilágosodás időszakában az európai egyetemek botanikus kertjeiben található gyűjtemények rendszerezésének vágya teremtette meg. Ezen erőfeszítéseket C. Linné 1753-as, a modern botanika, és taxonómia egyik alapművének tekinthető „Species Plantarum”-a, és a benne bevezetett kettős nevezéktan koronázta meg. Bár C. Darwin elsősorban az evolúció elméletét bemutató munkájáról ismert, számos botanikai felfedezést tett, vizsgálta például a tavaszi kankalin heterosztiliáját valamint az orchideák különleges beporzási mechanizmusát, és a Beagle híres útján megírta a Galapagos-szigetek első flóraművét (Kohn és mtsai., 2005). Ezen felfedezések alapozták meg részben az evolúciós elmélet kidolgozását.

Linné és Darwin kora óta a botanika és a rendszertan módszertani eszköztára folyamatos változáson ment keresztül. A kezdeti, élőlények megfigyelésén alapuló, kvalitatív módszereket fokozatosan egészítették ki a mérésekre építő, kvantitatív megközelítések. A 19. század végén, 20. század elején jelent meg a biometria tudományága, ami a darwini hagyományokra építve a biológiai variabilitás mintázatait vizsgálta (Briggs és Walters, 2016). A variabilitást nagy mintákon gyűjtött számadatokkal, és az ezeken végzett statisztikai elemzésekkel próbálták leírni (Pearson, 1894; Kendall, 1948). A

fenotípusos variabilitás két fő formája ismert. Az egyik a diszkrét számokkal jellemezhető variabilitás, mely főleg bizonyos részek számát összesíti, pl. termés-, vagy levélszám; ezt merisztikus variabilitásnak nevezzük (Briggs és Walters, 2016). A variabilitás másik típusa, a folyamatos variabilitás, amivel a növények és részeik mérete, tömege, valamint alakja jellemezhető, mivel ezek a jellegek egy bizonyos tartományon belül bármilyen értéket felvehetnek (Mather, 1949; Briggs és Walters, 2016).

A morfológia és a morfometria az élőlények és részeik alakjának, formájának a vizsgálatával foglalkozik. Az egyes részek alakjában megfigyelhető hasonlóságok vagy különbségek következhetnek funkcionális hasonlóságokból vagy különbségekből, vagy lehetnek leszármazástani okaik is. Míg a morfológia a növényei részeket sokszor egy ismert alakzathoz hasonlítja (pl. kör alakú, nyílhegy alakú levél), körülírja, addig a morfometria az alakot számszerűsíti, majd ezeket statisztikai módszerekkel hasonlítja össze (Zelditch és mtsai., 2004). Ezzel lehetővé teszi a komplexebb alakzatok kvantitatív összehasonlítását. Ahhoz azonban, hogy ezek az összehasonlítások hatékonyak legyenek, a méréseket a megválaszolni kívánt kérdésekre kell tervezni. Például ahhoz, hogy funkcionális, vagy leszármazástani szempontból összehasonlítsuk össze vagy különítsük el az általunk vizsgált fajokat, más-más karaktereket kell összehasonlítanunk (Zelditch és mtsai., 2004). A mikroszkópia fejlődésével a szabad szemmel nem látható struktúrák összehasonlítása is lehetővé vált az egyes növénycsoportok ezen mikroszkópikus jellegek alapján való csoportosítása (Robertson, 1905). A 20. század elején, a citológia és a genetika határán kialakuló citogenetika tudományága a mitotikus sejtek kromoszómakészletének (kariotípusának) vizsgálatával jutott a következtetésre, hogy a kariotípus egy fajon belül állandó, tehát taxonómiai információt hordoz

(Delaunay, 1922), és, hogy a kromoszómák hordozzák az öröklődés egységeit (géneket) (Darlington, 1939; Carlson, 2004).

A DNS örökítőanyagként való azonosításával (Avery és mtsai., 1944), szerkezetének feltárásával (Watson és Crick, 1953), illetve a fehérjék, mint a DNS-szekvencián alapuló géntermékek azonosításával (Beadle és Tatum, 1941; Yanofsky és mtsai., 1964) kezdetét vette a molekuláris genetika korszaka, ami forradalmasította a genetikai, azon belül pedig a populációgenetikai, filogenetikai kutatásokat. Bár az igény, hogy a genetikai változatosságot a DNS vagy a fehérjék szintén vizsgálják, már korábban létezett, ez csak az 1950-es évek közepétől meghonosodó elektroforetikus módszerek terjedésével vált lehetővé (Powell, 1994). Az első evolúciós genetikai vizsgálatokat azonos aktivitású, enzimek, „izozimek” elektroforézissel való szétválasztásával végezték (Harris, 1966; Hubby és Lewontin, 1966; Lewontin és Hubby, 1966). Míg az izozimek aktivitása megegyezik, azok más-más lókuszokon lehetnek kódolva, ezáltal az evolúciós eredetük sem feltétlenül azonos. Ahhoz, hogy az evolúciót lehessen vizsgálni, azonos eredetű, egy lókuszon, különböző allélek által kódolt enzimeket kellett vizsgálni, ezeket allozimeknek nevezzük (Prakash és mtsai., 1969; Allard és Kahler, 1971; Hamrick és Allard, 1972). Habár ezek a fehérje-elektroforézisen alapuló technikák hamar elterjedtek, és sokáig a molekuláris genetika csúcsát jelentették, az ismert volt, hogy nem képesek a genetikai változatosságot teljességében kimutatni, arra csak a fehérjét kódoló gén szekvenciájának ismeretében van lehetőség (Powell, 1994). Az 1970-es évek végén jelentek meg az első eredmények, melyek a DNS-ben jelen lévő változatosságot a populáció szintjén mutatták be. Ezekben a vizsgálatokban a mitokondriális, vagy nukleáris genomot restrikciós endonukleázokkal (enzimekkel, amelyek a dupla szálú DNS-t egy adott, és ismert szekvenciájú szakaszt felismerve hasítják) „darabolták” fel, és az így kapott DNS fragmentek

hosszát elektroforézis segítségével hasonlították össze (Avise, Giblin-Davidson, és mtsai., 1979; Avise, Lansman, és mtsai., 1979; Brown és mtsai., 1979; Brown és Wright, 1979). A módszert RFLP-nek nevezzük, amely hamar igen elterjedtté vált az állatok körében, főleg az állati mitokondriális genom variabilitásának köszönhetően (Arnold és Emms, 1998). A növények esetében viszont nem vált széles körben elterjedtté a mitokondriális DNS RFLP vizsgálata, köszönhetően a növényi mitokondriális genom kisebb variabilitásának, valamint szerkezeti sajátosságainak (Arnold és Emms, 1998). A növényi plasztisz és sejtmagi riboszomális DNS már sokkal alkalmasabbnak bizonyult az evolúciós genetikai kérdések RFLP módszerrel való megválaszolására (Learn és Schaal, 1987; Schaal és mtsai., 1987; Soltis és mtsai., 1989, 1991, 1992, 1997; Whittemore és Schaal, 1991; Kino', 1993).

Az első, a DNS elsődleges szerkezetén (szekvenciáján) alapuló populációgenetikai vizsgálatot 1983-ban végezték (Kreitman, 1983), melyben az egyik első DNS szekvenálásra szolgáló módszert alkalmazták (Maxam és Gilbert, 1977), és 11 *Drosophila* egyed, 2659 bázispár hosszúságú alkohol-dehidrogenáz génjének szekvenciáját hasonlították össze. Kreitman (1983) tanulmánya sokáig az egyedüli olyan munkát képviselte, mely a DNS szekvenálást a populációgenetikai mintázatok vizsgálatára használta. Utóbbi elterjedéséhez két technológiai újításra volt szükség, mégpedig a Sanger szekvenálás (Sanger és mtsai., 1977) folyamatának felgyorsulására (mely egyébként egyidős a később teljesen kiszoruló, körülményesebb Maxam-Gilbert módszerrel), valamint a PCR (Saiki és mtsai., 1985; Scharf és mtsai., 1986) kifejlesztésére (Powell, 1994). A PCR során a dupla szálú DNS hő általi denaturációját követően, az amplifikálni kívánt DNS 3' és 5' végével komplementer, rövid DNS szakaszok, ún. primer szekvenciák bekötődésével folytatódik. Ezt követően a primer szekvenciákból kiindulva DNS polimeráz

segítségével szintetizálják a templát DNS szakasz komplementerét. Ezt követi a DNS újbóli denaturációja, és egy újabb szál szintézise. Ezt a folyamatot több cikluson (15–40) keresztül végzik, mely során a felsokszorozni kívánt szakasz koncentrációja ciklusonként duplázódik (Saiki és mtsai., 1985; Scharf és mtsai., 1986). A Sanger szekvenálás az ún. lánctermináció módszerével működik, melyben a DNS templáthoz a DNS polimeráz és a deoxi-nukleotid trifoszfátok (dNTP) mellett négy külön reakcióban egy-egy jelölt dideoxi-nukleotid-trifoszfátot (ddNTP) adnak. Ezek a láncba véletlenszerű ponton beépülve ellehetetlenítik a további szintézist. Ezzel számos, az adott reakcióban jelen lévő ddNTP-vel végződő, különböző hosszúságú DNS szakaszt kapunk, melyeket elektroforézissel (korábban gél-, napjainkban kapilláris elektroforézissel) szétválasztva lehet vizualizálni. A négy különböző reakció elektroferogramját egymás mellé téve megkapjuk a megismerni kívánt DNS szakasz szekvenciáját (Sanger és mtsai., 1977). A DNS szekvenciák PCR-el és Sanger szekvenálással való vizsgálata napjainkban is az evolúciós genetika eszköztárának fontos eleme.

Minden evolúciós genetikai elemzés kritikus pontja a megfelelő molekuláris marker kiválasztása az adott kérdés vizsgálatához, mivel az adott markernek mindig az adott rendszertani szinten (pl. populáción, fajon, családon, stb.) belül kell megfelelő variabilitást mutatnia ahhoz, hogy elég információt szolgáltatson a csoporton belüli viszonyok kimutatására. A fentebb bemutatott módszerek sok esetben nem voltak alkalmasak mikroevolúciós kérdések, vagyis a populáción belüli allélfrekvencia-változások vizsgálatára. Ez részben a vizsgálható egyedek kis számának tudható be, köszönhetően a munkaigényességüknek, pl. RFLP; vagy magas költségüknek, pl. RFLP, PCR és szekvenálás, vagy pedig alacsony variabilitásuk miatt (pl. izozimek, RFLP, PCR és szekvenálás) (Arnold és Emms, 1998). Ezen kérdések megválaszolására a

PCR technika elterjedésével és az ehhez kapcsolódó módszerek kifejlesztésével nyílt lehetőség. A RAPD módszer rövid, tetszőleges primer szekvenciákat használ, melyekkel PCR segítségével véletlenszerű DNS szakaszokat amplifikál, melyek elektroforézissel szétválasztva vizualizálhatók (Arnold és mtsai., 1991; Arnold, 1993; Arnold és Emms, 1998). Egy másik, PCR-re épülő módszer az AFLP (Vos és mtsai., 1995). Ebben a genomot két restrikciós endonukleázzal emésztik, ezekhez adapter szekvenciákat ligálnak, majd a fragmenteket két egymást követő PCR-ben szelektíven amplifikálják, végül elektroforézissel vizualizálják (Paun és Schönschwetter, 2012). Mindkét módszer előnye, hogy nem szükséges hozzá a sokszorozni kívánt DNS szakaszok szekvenciájának ismerete, hátrányuk viszont a markerek domináns volta, valamint az egyes vizsgálatok sokak által megkérdőjelezett megismételhetősége (Arnold és Emms, 1998). Az egyik legrecensebb, és még napjainkban is széleskörűen használt PCR kapcsolt módszer a mikroszatellit markerek (más elnevezései: STR, Fowler és mtsai., 1988); SSR, Jacob és mtsai., 1991) amplifikálása. A mikroszatellitek rövid (2–6 bp), tandem ismétlődő szekvenciák, amelyek a genomban szétszórva, nagy számban megtalálhatóak, és határszekvenciájuk legalább fazon belül konzervált, melyeket ezáltal rájuk specifikus primer szekvenciákkal PCR módszerrel lehet amplifikálni, és az egyes allélok (melyek a tandem ismétlődések eltérő számából erednek) elektroforézissel elkülönítve lehet vizualizálni (Queller és mtsai., 1993). A mikroszatellitek előnyei közé tartozik a kodomináns jellegük, a vizsgálatok ismételhetősége, hogy egyszerre sok polimorf lókuszt azonosítható és, hogy a markerek kifejlesztését, valamint a primerek legyártását követően minimális költséggel jár a használatuk (Arnold és Emms, 1998). Hátrányuk ugyanakkor a markerfejlesztés magas költsége, és a null allélok jelenléte (a primerek kötőhelyén történő mutációk megakadályozzák az adott allél amplifikációját,

Dow és mtsai., 1995; Pemberton és mtsai., 1995). Mindezek figyelembevételével megállapíthatjuk, hogy napjainkban a mikroszatellit markerek használata leginkább nagyon magas egyedszám, vagy hosszú távú genetikai monitoring vizsgálatok esetén térül meg.

A 2000-es évek elején kezdtek megjelenni az első genomikai vizsgálatok, melyekben egyszerre számos, a genomban szétszórva található lókuszt szekvenálásával jutottak információhoz. A genomika úttörőjeként számon tartott Human Genome Project (Lander és mtsai., 2001; Venter és mtsai., 2001) arra vállalkozott, hogy feltárják és publikálják az ember teljes genomszekvenciáját (Collins és mtsai., 2004). Ebben az időszakban számos más genomikai vizsgálat is napvilágot látott, bár ezek még jellemzően (a közben nagy mértékben automatizált) PCR és Sanger szekvenálás módszerek kombinációjával dolgoztak, és több esetben viszonylag kevés lókuszt épülő vizsgálatokat is genomi vizsgálatként mutatták be (Black IV és mtsai., 2001; Allendorf, 2017). A genomikai módszertan ugrásszerű felgyorsulásához vezetett az ún. újgenerációs szekvenálási eljárások megjelenése és térhódítása. Ezek a módszerek akár több milliárd rövid, 35–300 bp szakasz párhuzamos szekvenálására képesek, rövid idő alatt (Levy és Boone, 2019). Bár több újgenerációs platform is kifejlesztésre került (pl. IonTorrent, 454 pirosekválás, stb.), az Illumina platform az elmúlt években szinte monopolizálta a high-throughput szekvenálás piacát (Levy és Boone, 2019). Az Illumina módszere az SBS, mely során a rövid DNS szakaszokat, melyeket adaptor szekvenciákkal láttak el, egy, az adaptor szekvenciák egy szakaszával komplementer oligonukleotidokkal borított üveglapra rögzítenek, melyeket klaszterekben sokszorosítanak DNS polimerázok segítségével. Ezután fluoreszcensen jelölt dNTP-kkel folytatják a szintézist, melyek a rögzített DNS szakaszok komplementer bázisával szemben kerülnek beépítésre, és a

fluorofórokat egy fényforrással gerjesztve vizualizálják egy adott klaszter (melyben azonos szekvenciák találhatók) bázissorrendjét (Bentley és mtsai., 2008).

Az újgenerációs szekvenálás megnyitotta a lehetőséget a teljes genom szekvenáláson kívül több, alternatív genomi módszer előtt. A genome skimming módszer során a teljes genomot szekvenálják, alacsony olvasat-mélységben (read depth). Ez az organelláris (növényekben mitokondriális és plasztisz) genomok, és ismétlődő nukleáris genomi régiók (pl. nukleáris riboszomális gének, mikroszatellitek, transzpozonok) felülreprezentáltságához vezet (Dodsworth, 2015), mely által elérhetővé válik a teljes organelláris genomok, illetve nukleáris riboszomális gének összeszerelése, melyek a növények körében általánosan használt filogenetikai markerek (McKain és mtsai., 2018). Egy átlagosnak mondható Illumina futás akár 50–60 egyed plasztisz genomjának összeszereléséhez elegendő adatot szolgáltathat (Teisher és mtsai., 2017).

Egy másik módszer csoport a RADseq, melyekben a szekvenálás előtt restriktációs endonukleázokkal fragmentálják a genomi DNS-t (Miller és mtsai., 2007; Baird és mtsai., 2008; Davey és mtsai., 2011; Andrews és mtsai., 2016). A különböző RADseq módszerek között jellemzően a felhasznált restriktációs enzimek száma és típusa a különbség (Andrews és mtsai., 2016). A megfelelő hosszúságúra leválogatott fragmenteket különböző adapter szekvenciákkal látják el (pl. egyedi azonosítók, Illumina adapterek), majd parallel módon, újgenerációs, főleg Illumina platformon szekvenálják (Andrews és mtsai., 2016). A kapott szekvencia olvasatok a restriktációs hasítóhelyeknél nagy sűrűségben találhatók minden vizsgált egyedben, ezáltal az olvasatokat egymáshoz illesztve nagy olvasatmélységű „halmokat” (stack) kapunk, az egyedek között is homológ genomi pozíciókban (Andrews és mtsai., 2016). A

RADseq módszerekkel költséghatékonyan lehet nagy mennyiségű adatra szert tenni, és a kapott adatok mind SNP alapú formátumokban, mind teljes szekvencia adatokként felhasználhatók (McKain és mtsai., 2018). A különböző RADseq módszereket flexibilitásuknak köszönhetően széles körben alkalmazzák a populációgenetika, filogeográfia és filogenetika területén is (Hohenlohe és mtsai., 2010; Eaton és Ree, 2013; Hipp és mtsai., 2014; Bateman és mtsai., 2018; Sramkó, Paun, és mtsai., 2019; Szatmári és mtsai., 2021).

Több módszer létezik a szekvenálni kívánt szekvenciák feldúsítására (target enrichment) is (Mamanova és mtsai., 2010), melyekkel a kívánt szekvenciákat nagyobb olvasatmélységben szekvenálhatjuk (pl. ultraconserved elements: Faircloth és mtsai., 2012; anchored phylogenomics: Lemmon és mtsai., 2012); exon capture: Mandel és mtsai., 2014; Hyb-Seq: Weitemier és mtsai., 2014). Közös ezekben a megközelítésekben, hogy rövid (60–120 bp), jellemzően mágneses gyöngyökhöz rögzített RNS szakaszokkal (próbákkal) hibridizáltatják a célzott DNS szakaszokat, és a nem hibridizált DNS-t eltávolítják. A különbség a módszerek között, hogy milyen DNS szakaszokat céloznak (McKain és mtsai., 2018). A módszerek előnyei, hogy a vizsgált csoportra, és kérdésre lehet optimalizálni a próbákat (pl. alacsony kópiaszámú gének, plasztisz exonok használatával), így változatos filogenetikai mélységekben lehet megfelelő felbontású markereket találni, valamint herbáriumi egyedek is használhatók a vizsgálatokban (McKain és mtsai., 2018).

Általánosságban elmondható, hogy az evolúciós genetikában megjelenő technológiai újítások jellemzően emberben és kísérleti állatokban kerültek kifejlesztésre, majd ezt követően kezdték el alkalmazni őket termesztett, és vadon élő növényekben, ami az első molekuláris genetikai módszerek esetében években mérhető csúszást jelentett. Ez a csúszás a legújabb technológiák esetében már jellemzően jóval rövidebb, bár még mindig tetten érhető.

Az elméleti módszertan fejlődése

Bár Darwin fő művében, a Fajok redetében bevezeti evolúciós elméletét, és a természetes szelekció fogalmát, az öröklődés mechanizmusa ismeretlen volt számára (Dietrich, 2006). Egészen Mendel eredményeinek 1900-ban való újra-felfedezéséig az öröklődés magyarázatára elfogadott elmélet az úgynevezett „keveredés” elmélet volt, mely szerint az utódok a szülők jellegeinek keverékét, mintegy átlagát öröklik (Kun, 2017). Ezáltal a jellegekben megfigyelhető variancia generációnként feleződne, és néhány generáció alatt eltűnne. Ezt Darwin is felismerte, mint az elméletében rejlő legnagyobb problémát, ugyanis variancia hiányában a természetes szelekció sem működhet (Ewens, 2011). Ezt az ellentmondást később a Mendeli öröklődés-elméletre építő Hardy-Weinberg szabály oldotta fel, mely szerint evolúciós hatások (szelekció, mutáció, stb.) nélkül az öröklődés egységeinek (géneknek) a varianciája nem változik generációról generációra, vagyis az allélek aránya állandó marad egy populáción belül (Hardy, 1908; Weinberg, 1908; Ewens, 2011). Darwin unokatestvére, F. Galton is osztotta a nézetet, miszerint a szelekció hatásait folytonos jellegek populációs átlagaira és varianciájára fejt ki (Galton, 1889). Galton munkájának hatására K. Pearson és W. F. R. Weldon egy statisztikai megközelítést alkalmazott a biológiai és evolúciós folyamatok megértéséhez, melyet biometrikának neveztek el (Dietrich, 2006). A biometrikusok statisztikai módszerekkel próbálták meg Darwin természetes szelekcióról szóló elméletét bizonyítani (Dietrich, 2006). Mendel munkájának egyik újrafelfedezője, H. de Vries, majd utána W. Bateson viszont Mendel eredményei alapján az evolúciós folyamatokat inkább ugrásszerű, szaltatórikus eseményekként képzeltek el (Dietrich, 2006). A biometrikusok és a mendeliánusok szembenállása jellemezte az evolúcióbiológia és genetika területét a 20. század elején. Vitájuk mind a

genetikai változatosság jellegéről (folytonos vagy diszkrét), és az evolúciós folyamatok jellegéről (fokozatos vagy szaltatórikus), mind a statisztika használatának helyességéről szólt (Dietrich, 2006). A mendeli és darwini elméletek ötvözését, melyet már G.H. Hardy és W. Weinberg elkezdett, S. Wright, R. A. Fisher, és J. B. S. Haldane fejezte be, ma már klasszikusnak számító munkáikban, az 1930-as évek elején (Chalub és Rodrigues, 2011). Fishernek köszönhetünk továbbá számos statisztikai tesztet (pl. Fisher-egzakt teszt, F-teszt, variancia analízis), és az ML módszerének elterjesztését, melyeket a mai napig alkalmazunk az evolúciós genetikában (Yates és Mather, 1963). Ebben az időszakban született meg az evolúciós szintézis, vagyis az evolúcióbiológia tudományterülete, valamint a korábban különböző tudományágakként számon tartott területek (pl. paleontológia, botanika, zoológia, rendszertan és genetika) eredményeinek közös értelmezése. Ebben a fenti kutatókon kívül T. Dobzhansky, J. Huxley, E. Mayr, G. G. Simpson és G. L. Stebbins munkái játszottak kulcsszerepet. Dobzhansky munkásságában főként a fajképződés genetikai alapjait kutatta (Dobzhansky, 1937). Huxley 1942-es könyvében Wright, Fisher és Haldane elméleteit vonatkoztatta evolúciós kérdésekre, és ő használta először az evolúciós, vagy modern szintézis kifejezést, melyet neo-darwinizmusként is ismerünk (Huxley, 1942). Mayr könyvében megalkotta a biológiai faj fogalmát, valamint leírta az allopatrikus fajképződés folyamatát (Mayr, 1942). Simpson a paleontológia megfigyeléseit egyeztetette össze az evolúciós szintézis elméletével (Simpson, 1944). Stebbins munkájának jelentősége pedig a növényeknek az evolúciós szintézisbe (melyet állatokon megfigyelt mintázatok alapján dolgoztak ki) való bevonásában rejlik, beleértve a növényeik genetikai különlegességeinek, például a hibridizáció vagy poliploidia jelenségének evolúciós keretek közé helyezését (Stebbins, 1950).

Az 1950-es és '60-as évek molekuláris forradalma robbanásszerűen kibővítette az evolúciós genetika eszköztárát, és az új módszerek segítségével lehetőség nyílt a korábbi elméletek tesztelésére, valamint újak kidolgozására. A molekuláris evolúció kutatásának történetében az egyik legnagyobb hatású eredménye az ún. molekuláris óra felfedezése volt, mely E. Zuckerkandl és L. Pauling nevéhez fűződik (Wilson és mtsai., 1977). Fehérjék aminosav-szekvenciáinak különböző leszármazási vonalak közötti összehasonlítása során Zuckerkandl és Pauling felfedezték, hogy a szekvenciák közti különbség arányos a leszármazási vonalak létrejötte között eltelt evolúciós idővel (Zuckerkandl és Pauling, 1965). Az elmélet jelentőségét és a rendszertanban való felhasználhatóságát hamar felismerte a közösség, azonban a magyarázatául szolgáló molekuláris mechanizmus ismeretlen volt. A molekuláris óra elméletére alapozva dolgozta ki M. Kimura a neutrális evolúció elméletét (Kimura, 1968). Ebben Kimura az aminosav-cserék állandó gyakoriságát alapul véve a mutációk szelekció szempontjából semleges voltára, valamint a természetes szelekció helyett a véletlenszerű genetikai sodródást tekintette nagyobb hatásúnak. Míg korábban az uralkodó nézet az volt, hogy az evolúciós változások a természetes szelekciónak tudhatók be, az 1980-as évek közepére a neutrális evolúció vált az általánosan elfogadott feltevéssé (Kreitman, 2000; Dietrich, 2006). A molekuláris órára, valamint a neutrális evolúcióra alapozva lehetővé vált a fajok elválási idejének becslése. A koaleszcens elmélete is a neutrális evolúcióra, a Wright-Fisher modellre, illetve G. Malécot „Identity by Descent” koncepciójára építve született meg ebben az időszakban (Nagylaki, 1989; Kingman, 2000). A koaleszcens elmélet számos felhasználása létezik az evolúciós genetikában, a legközelebbi közös ős idejének becslésétől a különböző populációgenetikai paraméterek, például effektív populációméret, migráció, stb. becslésére (Kingman, 1982). M. Nei statisztikai módszereket

fejlesztett ki, melyekkel a neutrális evolúció jelenségét tesztelte (Nei, 1983). Megalkotott több új, a populációgenetikában ma is használt mérőszámot (Nei genetikai távolság, D_A , G_{ST}) (Nei, 1972, 1973; Nei és mtai., 1983). Kollégáival elkezdték a filogenetikai törzsfák genetikai-távolság alapú generálását, majd megalkották a „neighbor joining” algoritmust, ami egy ma is használt, távolságalapú módszer a filogenetikában (Saitou és Nei, 1987).

A távolságalapú módszerekkel szemben, ahol az összehasonlított szekvenciák közötti genetikai távolság határozza meg a törzsfa topológiáját és ághosszait is, a karakter alapú módszerek egyidejűleg hasolítják össze a vizsgált szekvenciákat, egyenként véve a karaktereket, a szekvencia illesztést mintegy oszloponként vizsgálva (Yang és Rannala, 2012). A szekvencia illesztés során a különböző DNS, RNS vagy aminosav szekvenciákat olyan módon rendezik össze, hogy a megegyező, vagy hasonló karakterek egy oszlopba kerüljenek, és így azonosíthatóvá váljanak a funkcionális, vagy evolúciós okokból egymáshoz hasonló régiók (Mount, 2004). A rövid, egyszerű szekvenciák illesztése akár manuálisan is megoldható, viszont a hosszú és bonyolult szekvenciák illesztését különböző algoritmusok segítségével végzik, ilyen például a MUSCLE (Edgar, 2004), a ClustalW (Thompson és mtai., 1994), vagy a MAFFT (Kato és mtai., 2009). Karakter alapú filogenetikai módszer a már említett legnagyobb valószínűség módszere mellett a maximum parszimónia módszere és a Bayesiánus statisztikán alapuló filogenetikai módszerek (innenről röviden Bayesiánus statisztika). A maximum parszimónia elvét Edwards és Cavalli-Sforza alkalmazták először filogenetikai kérdések megválaszolására, a legnagyobb valószínűség módszerével végzett vizsgálatok kevesebb számítást igénylő megközelítéseként (Steel és Penny, 2000). A maximum parszimónia egy ún. minimum evolúciós” módszer, amely a parszimónia elvére épít, mely szerint egy adott problémára mindig a legegyszerűbb megoldás preferálandó,

az, amelyikhez a legkevesebb feltétel szükséges. Ez filogenetikai kontextusban azt jelenti, hogy a legekevesebb evolúciós eseménnyel (mutációval) járó törzsfák a legvalószínűbb (Edwards, 1996). A molekuláris filogenetikában legkésőbb bevezetett statisztikai módszer a Bayesiánus statisztikai megközelítés (Yang és Rannala, 2012). A Bayesiánus statisztika a legnagyobb valószínűség módszerrel együtt modell alapú filogenetikai megközelítések, ahol a modell egy szekvenciaevolúciós modellt takar. Míg a legnagyobb valószínűség módszerben a modell paraméterei ismeretlen állandók, addig a Bayesiánus módszerben a paraméterek véletlenszerű változók, melyek statisztikai eloszlásokkal írhatóak körül (Felsenstein, 1981; Yang és Rannala, 2012). Ezekhez a paraméterekhez egy előzetes eloszlás (prior distribution) van rendelve, amelyet az adott kérdéssel kapcsolatos biológiai ismereteink határoznak meg. A paraméterek előzetes eloszlását a rendelkezésre álló adatokkal kombinálva generálható az utólagos eloszlás (Rannala és Yang, 1996). Mivel a filogenetikai elemzésben az egyes fák utólagos valószínűségének kiszámítása nem megoldható, az utólagos eloszlásból MCMC algoritmusok segítségével mintákat veszünk, majd a következtetéseinket már ezekből a mintákból vonjuk le (Mau és Newton, 1997; Yang és Rannala, 1997; Larget és Simon, 1999; Li és mtsai., 2000). Ez az utólagos eloszlás már magában hordozza az eredményekben rejlő bizonytalanságot, ugyanis nem egy fát, hanem a lehetséges fák utólagos eloszlásából egy mintát kapunk (Yang és Rannala, 2012). Az összes többi filogenetikai módszernél nem kapunk információt az adott fa valószínűségéről, azt egy utólag elvégzett újramintázással, leggyakrabban az ún. bootstrap módszerrel (amely egy véletlenszerű mintavétel, visszahelyezéssel) becsülhetjük meg (Larget és Simon, 1999). A bootstrap, csakúgy, mint a ML és maximum parszimónia filogenetikai alkalmazásának kidolgozásában elvitathatatlanok J. Felsenstein érdemei (Felsenstein, 1973, 1981, 1982, 1985).

A Bayesiánus statisztika elterjedését a filogenetikai kutatásokban két szoftver, a MrBayes (Huelsenbeck és Ronquist, 2001) és a BEAST (Drummond és mtsai., 2006) megjelenése nagyban segítette, melyek a mai napig a leggyakrabban használt filogenetikai alkalmazások közé tartoznak. Bayesiánus alapokra építenek a napjainkban legnépszerűbb módszerek a fajok elkülönülése idejének becslésére (Thorne és mtsai., 1998; Kishino és mtsai., 2001), először szekvencia illesztések (Rannala és Yang, 2003, 2008; Yang és Rannala, 2006), majd később genomi adatok, SNP-ek alapján (Stange és mtsai., 2018). Hasonlóképpen, a fajok statisztikai alapú lehatárolására használt módszerek közül is a Bayesiánus statisztikára épülő módszerek a legnépszerűbbek (Sites és Marshall, 2003; Wiens, 2007; Yang és Rannala, 2010; Rannala, 2015).

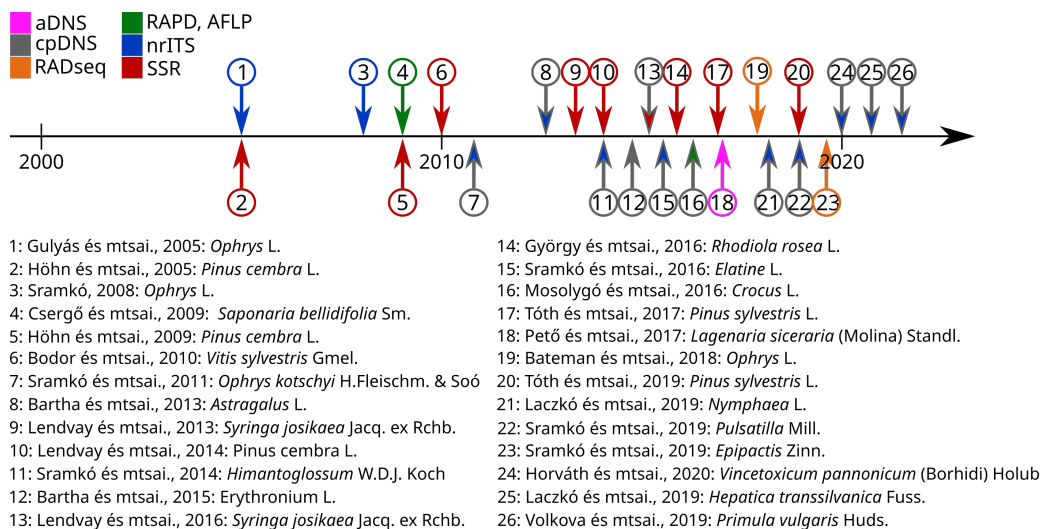
Genetikai módszerek a magyar botanikai kutatásban

A magyar botanika hosszú múltra tekint vissza, viszont a Nyugaton már jóval korábban meghonosodó genetikai kutatásokat egészen a 1990-es évek végéig nem végeztek botanikai témában Magyarországon. Ahogy a nemzetközi trendekben is megfigyelhető, Magyarországon is először erdészeti, illetve növénytermesztési célból alkalmaztak genetikai módszereket növényekben. Borovics és mtsai. (1997) magyarországi tölgy fajok és a bükk genetikai erőforrásait mérték fel RAPD markerek segítségével. Comps és mtsai. (1998) bükk állományokat mérték fel izozimekkel, és az általános genetikai állapotfelmérésen túl biogeográfiai következtetéseket is tettek. Ezen tanulmányokban elsősorban a fajok genetikai állapotfelmérése volt a cél, a minél hatékonyabb erdészeti kezelés érdekében. Pedryc és mtsai. (2006) sárgabarack fajtákat különítették el SSR markerek felhasználásával. Stefanovits-Bányai és mtsai. (2002) szőlő fajtákat különítették el két izozim marker segítségével. Szabó és mtsai. (2005) 47 jelenkori sárgadinnye fajtát hasonlítottak egymáshoz, és egy kihalt, középkori fajtához, és nrITS és SSR

markerek felhasználásával. Lágler és mtsai. (2005) 20 jelenkori köles fajtát, valamint egy 15. századi leletet hasonlítottak össze morfológiai és molekuláris módszerekkel (ISSR, SSR, CAP és mtDNS markerekkel). E tanulmányok célja is főként az adott haszonnövények nemesítése volt, és a genetikai módszereket a fajták elkülönítéséhez, illetve az ismeretlen fajtájú egyedek besorolásához használták. Egészen a 2000-es évek közepéig kellett várni arra, hogy evolúciós-, illetve populációgenetikai témájú botanikai kutatások jelenjenek meg. Gulyás és mtsai. (2005) és Sramkó (2008) a mérsékelt övi orchideák bangó (*Ophrys* L.) nemzetségének filogenetikai viszonyait tárták fel az nrITS szekvencia felhasználásával. Höhn és mtsai. (2005, 2009) a havasi cirbolyafenyő (*Pinus cembra* L.) Kárpátok-beli populációinak populációgenetikai struktúráját, illetve posztglaciális biogeográfiai történetét tárták fel cpSSR markerekkel. Csergő és mtsai. (2009) a *Saponaria bellidifolia* Sm. populációgenetikai vizsgálatát végezték el RAPD markerekkel, majd helyezték európai kontextusba AFLP markerek felhasználásával. Bodor és mtsai. (2010) mikroszatellit markerekkel vizsgálták a magyarországi ligeti szőlő (*Vitis sylvestris* Gmel.) populációkat, természetvédelmi céllal. Sramkó és mtsai. (2011) az *Ophrys kotschy* H. Fleischm. & Soó filogenetikai viszonyait vizsgálták nrITS és cpDNS markerekkel, és megállapították, hogy a faj polifiletikus, és a morfológiai hasonlóságot konvergens evolúció okozhatja. Bartha és mtsai. (2013) az *Astragalus* L. nemzetség filogenetikai kapcsolatait a nrITS-t és cpDNS régiók segítségével vizsgálták, és a megfigyelt mintázatokból a nemzetség hálózatos evolúciójára következtetett. Lendvay és mtsai. (2013; 2016) a harmadkori reliktum *Syringa josikae* aban Jacq. ex Rchb. fejlesztettek mikroszatellit markereket, majd ezek, és nukleáris riboszomás szekvenciák segítségével vizsgálták a faj biogeográfiai történetét. Lendvay és mtsai.

(2014) a *Pinus cembra* L. Kárpátok-beli populációit vizsgálták, a korábban használt cpSSR markereket nukleáris SSR-ekkel kiegészítve, és megállapították, hogy a Kárpátok populációi között alacsony a génáramlás mértéke. Sramkó és mtsai. (2014) a sallangvirágok (*Himantoglossum* W.D.J. Koch) filogenetikai kapcsolatait vizsgálták nukleáris és kloroplaszt DNS régiók felhasználásával. Bartha és mtsai. (2015) cpDNS markerekkel egy filogeográfiai vizsgálat keretében tanulmányozták a kakasmandikó (*Erythronium dens-canis* L.) evolúciós történetét. György és mtsai. (2016) az illatos rózsásvarjúháj (*Rhodiola rosea* L.) populációgenetikai vizsgálatát végezték mikroszatellit markerek segítségével. Sramkó és mtsai. (2016) az *Elatine* L. nemzetség filogenetikai kapcsolatait vizsgálták nrITS és cpDNS szekvenciák segítségével, és ezek alapján taxonómiai revízióra tettek javaslatot. Mosolygó és mtsai. (2016) a *Crocus* L. nemzetségen belüli hibridizációt és annak okait tárták fel cpDNS és AFLP markerek segítségével. Tóth és mtsai. (2017; 2019) SSR markereket használtak az erdei fenyő (*Pinus sylvestris* L.) populációgenetikai struktúrájának és demográfiai történetének vizsgálatához. Pető és mtsai. (2017) az első archeobotanikai bizonyítékokat mutatták be a *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. Magyarországi jelenlétéről, köztük egy aDNS vizsgálattal. Laczkó és mtsai. (2019) a hévízi tündérrózsáról (*Nymphaea lotus* L. var. *thermalis* (DC.) Tuzson) nrITS és cpDNS markerek segítségével állapították meg, hogy az minden bizonnyal újkori eredetű, nem pedig harmadidőszaki reliktum, mint azt korábban feltételezték. Sramkó és mtsai. (2019) nukleáris és kloroplaszt DNS markerekkel tárták fel a *Pulsatilla* Mill. nemzetség filogenetikai viszonyait. Horváth és mtsai. (2020) nrITS és cpDNS markereket használtak a magyar méreggyilok (*Vincetoxicum pannonicum* (Borhidi) Holub) filogenetikai pozíciójának meghatározásához, melyek alapján a faj allopoliploid hibrid

eredetét valószínűsítették. Laczkó és Sramkó (2020) nukleáris és kloroplaszt DNS markerek alapján bizonyították a *Hepatica transsilvanica* Fuss. allopoliploid eredetét. Volkova és mtsai. (2020) a szártalan kankalin (*Primula vulgaris* Huds.) filogeográfiai struktúráját tárták fel nrITS és cpDNS markerekkel, és eredményeik alapján a faj jégkorszaki refúgiumát a Kolhisz régióba helyezték. Egy nagyobb módszertani ugrást képviselt a 2010-es évek végén a genomi módszerek meghonosodása a hazai botanikában. Bateman és mtsai. (2018) a RADseq módszerrel vizsgálta az *Ophrys* nemzetség filogenetikai szerkezetét, és bár a főbb kládokat támogatottnak találták, eredményeik rávilágítottak a morfológiai karakterek homoplázikus voltára. A második hazai RADseq-alapú botanikai kutatásban Sramkó és mtsai. (2019) az *Epipactis* Zinn. nemzetséget vizsgálva arra jutottak, hogy a nemzetség jelenleg egy evolúciós radiáció folyamatán megy keresztül, melyet az önmegporzás (autogámia) és az idegen megporzás (allogámia) közötti váltások hajtanak. A fenti felsorolásból is láthatjuk, hogy amint egy genetikai módszer meghonosodik a hazai botanikusok körében, az egyre nagyobb frekvenciával jelenik meg a publikációkban is (1. ábra). Bár a publikációk száma folyamatosan nő, a hazai védett növények genetikai vizsgálata még napjainkban is gyerekcipőben jár, ugyanis a 765 védett növényből (Király, 2007) mindössze 37 faj lett bármilyen szempontból genetikailag vizsgálva, annak ellenére, hogy genetikai információk birtokában sokkal megalapozottabban lehet természetvédelmi intézkedéseket prioritizálni (Redding és Mooers, 2006).



1. ábra Genetikai módszereket alkalmazó publikációk a magyar botanikai kutatásban, idővonalon megjelenítve. A színek a különböző genetikai módszereket, a számok pedig az egyes publikációkat jelölik.

1.2 Célkitűzések

Dolgozatomban négy esettanulmányon keresztül mutatom be genetikai módszerek széles skálájának alkalmazási területeit a botanikai témájú kutatásokban. Az első két esettanulmányban a mikroszatellit (SSR) markerek fejlesztésének két különböző szekvenáló rendszerre épülő módját két, Magyarországon fokozottan védett növényfaj, a mocsári kardvirág (*Gladiolus plaustris* Gaud.) és a magyarföldi husáng (*Ferula sadleriana* Ledeb.) példáján keresztül mutatom be. A harmadik esettanulmányban a magyarföldi husáng példáján mutatom be a mikroszatellit módszer felhasználási lehetőségeit, valamint az nrITS szekvencia filogenetikai rekonstrukcióban való alkalmazását. Ezen tanulmányban meghatározzuk a *F. sadleriana* filogenetikai pozícióját a *Ferula* nemzetségen belül, populációgenetikai, illetve mikroevolúciós, demográfiai történetét kíséreljük meg feltárni a hagyományosan vizsgált genetikai diverzitás, genetikai távolság, genetikai differenciáció használata mellett az ABC módszerrel. A negyedik esettanulmányban egy genomi módszer, a RADseq hasznát mutatom be. Ezen tanulmányban egy nagy elterjedésű kelet-európai fajról, az osztrák zsályáról (*Salvia austriaca* Jacq.) állapítjuk meg, hogy valójában ezzel a névvel két, csupán a virág morfológiájában eltérő, de különálló fajt jelöltek eddig. Megállapításunkat a RADseq módszer által generált több ezer SNP-en alapuló filogenetikai törzsfa rekonstrukcióval, Bayes-faktor alapú faji szintű lehatárolással, valamint molekuláris datálással támasztjuk alá.

2. Esettanulmányok

2.1. Mikroszatellit markerek fejlesztése a fokozottan védett, tetraploid mocsári kardvirágban (*Gladiolus palustris* Gaud.)

2.1.1. Irodalmi előzmények

A *Gladiolus* L. nemzetség mintegy 260, az Óvilágban, főként Afrikában honos fajt foglal magába. Európában mindössze hét faj fordul elő, és a legnagyobb faji diverzitás a Földközi-tenger térségébe koncentrálódik (Valente és mtsai., 2011), azonban néhány faj északabbra, a mérsékelt övben is előfordul. Ilyen például a mocsári kardvirág (*Gladiolus palustris*), amely Közép-Európa endemikus faja, és Kelet-Franciaországtól Magyarorszáig, valamint Dél-Németországtól Észak-Olaszorszáig, valamint az Észak-Balkánon fordul elő (Szczepaniak és mtsai., 2016). Kromoszómaszáma $2n=60$, ami a *Gladiolus* nemzetségben a tetraploid szintnek felel meg (Hamilton, 1980). Mivel ez a faj egy erősen veszélyeztetett élőhelyen, a nedves rétek és a száraz gyepek közötti ökotonban fordul elő, teljes elterjedési területén visszaszorulóban van (Schnittler és Günther, 1999), és szerepel az Európai Unió Élőhelyvédelmi Irányelvének II. mellékletében (Az Európai Közösségek Tanácsa, 1992). Több nemzeti vörös listán is szerepel, az IUCN vörös listájára pedig Adathiányos fajként került fel (Bilz és mtsai., 2011). A *G. palustris* hatékony védelme érdekében olyan genetikai markerek kifejlesztésére van szükség, amelyek a populáció szintjén biztosítanak felbontást.

Jelen kutatásunkban 15 mikroszatellit markert jellemzünk, melyeket a mocsári kardvirágban azonosítottunk. Továbbá, 11 polimorf lókuszfajok közötti hasznosíthatóságát két európai, rokon faj, a *Gladiolus imbricatus* L. és a

Gladiolus tenuis M.Bieb. példáján keresztül mutatjuk be. Abból, hogy a *G. imbricatus* hibridizál a *G. palustrisszal*, közeli genetikai rokonságukra következtethetünk (Szczepaniak és mtsai., 2016), a *G. tenuis* pedig a *G. imbricatus* kelet-európai rokonaként van számon tartva (Gabrielian, 2001). A mocsári kardvirágot vizsgáló korábbi genetikai kutatásokban általánosan használt plasztisz markereket és AFLP analízist használtak (Szczepaniak és mtsai., 2016), ezért az általunk azonosított markerek kulcsfontosságú eszközt jelenthetnek a későbbiekben e nagy természetvédelmi jelentőségű faj populációgenetikai vizsgálatához.

2.1.2. Módszerek és eredmények

A *G. plaustris* leveleket szilikagélben megszárítottuk, és a genomi DNS-t módosított cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) protokoll (Doyle, J. J., Doyle, 1987) segítségével vontuk ki (Sramkó és mtsai., 2014). A mikroszatellitek izolálása során egy 454 piroszekvenáláson alapuló protokollt követtünk (Sinama és mtsai., 2011). Öt, földrajzilag egymástól távol eső populációból származó növény DNS-ét (1. függelék) egyenlő arányban elkevertük és a következő DNS próbákkal dúsítottuk mikroszatellitekre: (TG)₁₀, (TC)₁₀, (AAC)₈, (AAG)₈, (AGG)₈, (ACG)₁₀, (ACAT)₆, (ACTC)₆. A megtisztított és mikroszatellitekre dúsított könyvtárat a 454 GS-FLX Titanium protokoll alapján (Roche Applied Science) a Genoscreen Ltd. (Lille, Franciaország) szolgáltatása keretében szekvenáltattuk. A primertervezéshez szükséges szekvenciák kiválasztásához a QDD v.3.1.2 (Meglécz és mtsai., 2014) szoftvert használtuk, az alapértelmezett beállítások használatával. A szennyeződések kimutatásához a szekvenciákat a BLAST program segítségével hasonlítottuk össze az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid-adatbázisával. A szekvenciákat a GIRI (Genetic Information Research Institute) által fenntartott RepeatMasker könyvtárak segítségével szűrtük transzpozonokra

(<http://www.girinst.org>; elérés 2015. február). A QDD által kiadott szekvenciákból a következő kritériumok alapján választottunk ki primerpárokat: (i) a célrégióban csak a legalább hat ismétlődéssel rendelkező, tiszta mikroszatellitiek voltak megengedettek; ii) az (AT)_n ismétlődéseket kizártuk; iii) a primer illesztési pontszámának az amplifikált szekvenciához 6-nál alacsonyabbnak kellett lennie; iv) a primereknek legalább 10 bázis távolságra kellett elhelyezkedniük a mikroszatellit motívumtól; és v) a konszenzus szekvenciákat elvetettük. A 110 potenciális primerpárból 46 lókuszt választottunk ki további szűrésre a fragment hossza és a primerek T_m-értéke (olvadási hőmérséklet) alapján. Csak olyan lókuszok lettek kiválasztva, ahol a primerek T_a értéke (kapcsolódási hőmérséklete) 64°C volt.

A 46 primer specifikus PCR-amplifikációra vonatkozó első tesztelését a nyirádi populáció egyetlen egyedén végeztük (1. függelék), és a kapott PCR-termékeket hűtött, 2%-os agaróz gélen végzett elektroforézissel értékeltük. A PCR-keverék a következőket tartalmazta: 2× DreamTaq Green puffer, 0,2 mM dNTP (mindegyikből egyenként), 1 mg/ml Szarvasmarhaszérum-albumin, 0,5 µM minden egyes primerből és 0,05 U DreamTaq Green DNS-polimeráz 10 µl végső térfogatban (az összes PCR-reagens a Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA-tól származott). A PCR körülmények a következők voltak: denaturálás 95°C-on 2 percig, 40 ciklus 15 másodperc 95°C-on, 30 másodperc 62°C-on és 1 perc 72°C-on, majd egy utolsó elongációs lépés 72°C-on 10 percig. Minden PCR-t a fenti beállításokkal végeztünk. Huszonöt lókuszt produkált specifikus termékeket. Ezeket a raposkai populációból származó öt növényből álló mintán vizsgáltuk (1. függelék), a potenciálisan polimorf lókuszok keresése céljából, a fentiekkel azonos elektroforetikus feltételek mellett. Tizenöt lókuszt választottunk ki további elemzésre az öt minta közötti, szabad szemmel kiértékelt hosszkülönbségek alapján. A kiválasztott 15 lókuszt

forward primereit az 5' végükön fluoreszcens festékkel jelöltük (1. táblázat), és az SSR lókuszokat PCR-amplifikáltuk a célfajunk három magyarországi populációjában, amelyeket 25, 20 és 12 egyed képviselt (2. táblázat). A fluoreszcens jelölésű PCR-termékeket ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) készüléken futtattuk. A termékeket az előre jelzett fragmenthossz és a fluoreszcens jelölés típusa szerint multiplexáltuk, a sávok intenzitása alapján lókuszonként különböző mennyiségű PCR-terméket (1,5–4 μ l) hozzáadva (2. függelék). A multiplexált PCR-termékek egy mikroliterét 0,25 μ L GeneScan 500 LIZ méretstandardhoz (Applied Biosystems) és 14,75 μ L Hi-Di formamidhoz (Genetic Analysis Grade, Applied Biosystems) kevertük a Genetic Analyzerre való feltöltés előtt. A genotipizálást manuálisan végeztük a PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) szoftver segítségével. Célfajunk tetraploid jellege miatt a genotípusok kiértékelése és elemzése a GenoDive 2.0b27 verziójával (Meirmans és Van Tienderen, 2004) történt, mivel ez a szoftver képes figyelembe venni az allélok kópiaszámának többértelműségét a részleges heterozigóták esetében.

1. táblázat A mocsári kardvirágban (*Gladiolus palustris*) fejlesztett 15 mikroszatellit marker jellemzői.

Lókuszt	Primer szekvenciák (5'-3')	Ismétlődő motívum	Méret (bp)	Fluoreszcens festék	GenBank azonosító
GlPal01 ^a	F: TTCTGCAAAGCTAACAGGCG; R: CCACTGCCATTATCGGTCGA	CT	201	PET TM	MG266909
GlPal03 ^a	F: TTGTTACTGGTGC GGACTCC; R: CAGGTCCGATTGCTTGAGGA	CT	211	NED TM	MG266910
GlPal04 ^a	F: TTTGGGACGGGTATGCGTAG; R: TTCGCTTTCGTGGAAGTCCA	GA	137	6-FAM TM	MG266911
GlPal08	F: ATGCCTTTGTCTCTCACCT; R: TTTGTCCCTAATTGGAACACGTC	CT	137–141	VIC®	MG266912
GlPal11	F: CGGGAATAGCAACTACCCGG; R: GTTGCCCTTGCGGTTGATC	AG	136–138	PET TM	MG266913
GlPal13	F: ATTGCCAAGGAGGTACAGGC; R: GCAAACCCACTCTGCTTCCT	GAA	95–107	6-FAM TM	MG266914
GlPal14	F: CCAAGTAAGTGATGGCGGC; R: GGGTCTAGAGAAGGCTTGGG	GAG	189–207	6-FAM TM	MG266915
GlPal21	F: GTGGGTTCCAAGCTTGCATG; R: TCATTGGCCGCGACAGAG	GA	122–142	NED TM	MG266916
GlPal22	F: TGAAACCCTACACGTAACCCT; R: ATGTAGGGTGATGGTGGCTG	AG	293–305	6FAM TM	MG266917
GlPal24	F: ACATTCTATTGGACGGTCCA; R: AGTTCCCTAGTCATCTATGGCT	TC	291–297	VIC®	MG266918
GlPal37	F: ACGTGAGTGATCAATTAAAGGGC; R: CAACAGCACTGTGAGCACC	AAC	261–270	NED TM	MG266919
GlPal39	F: ATCCCTTTCCTAATTCCTTCCC; R: TGATGAAGAGGATTCCGACGAC	AG	238–240	6-FAM TM	MG266920
GlPal41 ^a	F: AAACCCTCACTTCGGAGATCA; R: TAAAGTCAGTCAGCTGTAACACTG	GA	287	PET TM	MG266921
GlPal42	F: TCGGAAGGTAACAGAGGGAAC; R: GTCGAAACAGAGGAGATCGGG	AAG	242–251	VIC®	MG266922
GlPal46	F: GGGTCATCGCCTGTCATGAA; R: TCGTATCGGCTTGTTGGCTG	GAA	207–219	VIC®	MG266923

Megjegyzés: az összes primer kapcsolódási hőmérséklete (T_a) 64°C.

^aa tesztelt mintákban monomorf lokuszok.

2. táblázat Genetikai diverzitás értékek három mocsári kardvirág (*Gladiolus palustris*) populációban, 11 polimorf mikroszatellit marker alapján a GenoDive v. 2.0b27 szoftverrel számítva.

Lókuszt	Raposka (n=25)			Nyirád (n=20)			Bátonyterenye (n=12)		
	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e
GI Pal08	3,000	2,048	0,522	2,000	2,000	0,513	2,000	2,000	0,522
GI Pal11	2,000	1,992	0,508	2,000	2,000	0,513	2,000	2,000	0,522
GI Pal13	2,000	1,986	0,512	2,000	1,978	0,512	1,000	1,000	0,000
GI Pal14	5,000	2,183	0,557	4,000	2,442	0,609	2,000	1,578	0,387
GI Pal21	4,000	3,041	0,682	4,000	3,221	0,702	2,000	2,000	0,522
GI Pal22	5,000	2,405	0,601	6,000	3,058	0,694	1,000	1,000	0,000
GI Pal24	3,000	1,162	0,144	4,000	1,223	0,190	1,000	1,000	0,000
GI Pal37	4,000	3,550	0,727	4,000	3,849	0,751	3,000	3,000	0,686
GI Pal39	2,000	1,683	0,418	2,000	1,090	0,087	1,000	1,000	0,000
GI Pal42	3,000	2,100	0,534	4,000	2,164	0,551	2,000	2,000	0,522
GI Pal46	5,000	2,026	0,521	4,000	2,048	0,526	2,000	1,912	0,502
Összesen	3,077	2,014	0,440	3,077	2,083	0,434	1,615	1,576	0,282

Megjegyzés: n = egyedszám; A = allélek száma; A_e = allélek effektív száma; H_e = várt heterozigotizáció.

^a Lelőhely és voucher információ az 1. függelékben található.

Bár az elsődleges vizsgálatok alapján arra számítottunk, hogy mind a 15 lókuszt polimorf lesz, csak 11 lókuszt bizonyult annak. Eredményeinkben közöljük a populáció méretét (n), az allélszámokat (A), az allélek effektív számát (A_e) és a várható heterozigotizáció értékét (H_e). A megfigyelt heterozigotizáció értékét nem közöljük, mivel ezek számítása nem a ploidiaszámmal korrigált allélfrekvenciákra alapulnak, és ezért torzítottak (Meirmans és Van Tienderen, 2004). Az allélok és az effektív allélok száma a három vizsgált populációban lókuszonként 1 és 6, illetve 1,000 és 3,849 között mozgott. Az átlagos H_e 0,385 (0,000–0,751) volt (2. táblázat). A fajok közötti amplifikációt a *G. palustris*-ban polimorfnak talált lókusztokon a *G. imbricatus* öt egyedén és a *G. tenuis* három egyedén teszteltük, amelyek az elterjedési területük távoli pontjairól származnak. A PCR-körülmények a fent leírtakkal azonosak voltak. A 11 polimorf lókusztból csak négyet sikerült amplifikálni

(3. táblázat). Ez a célfajunk és a *G. imbricatus* csoport fajai közötti viszonylag távoli filogenetikai kapcsolat következménye lehet.

3. táblázat Fajok közötti amplifikáció két rokon fajban, *Gladiolus imbricatus*-ban és *Gladiolus tenuis*-ban.

Lókusz	<i>Gladiolus imbricatus</i> (n=5)	<i>Gladiolus tenuis</i> (n=3)
GI Pal08	+	+
GI Pal11	–	–
GI Pal13	–	–
GI Pal14	+	+
GI Pal21	–	–
GI Pal22	+	+
GI Pal24	–	–
GI Pal37	+	+
GI Pal39	–	–
GI Pal42	–	–
GI Pal46	–	–

Megjegyzés: n = egyedszám; + = sikeres amplifikáció; – = sikertelen amplifikáció

2.1.3. Konklúziók

Tanulmányunkban azonosítottunk 11 polimorf mikroszatellit markert mocsári kardvirágban (*G. palustris*). A közölt mérőszámok alapján alkalmasak a faj populációgenetikai vizsgálatára, valamint előrelépést jelentenek a faj vizsgálatára használható markerek tekintetében, ugyanis a korábban használt, domináns AFLP markerek nem alkalmasak a teljes genetikai diverzitás feltérképezésére, valamint különböző vizsgálatok között is problémás az összehasonlításuk (Arnold és Emms, 1998). Míg a raposkai és nyirádi populációk esetében a legtöbb marker más, évelő fajokhoz hasonló genetikai diverzitást mutatott, addig a bátonyterenyi populáció sok marker esetében egy allélt tartalmazott, amiből arra következtethetünk, hogy az egy genetikailag végletesen beszűkült, összeomlott populáció. Az ezen markerekkel végzett vizsgálatok alkalmasak lehetnek a fokozottan védett faj természetvédelmi kezelésének genetikai megalapozására. Eredményeink valószínűsítik, hogy az általunk azonosított markerek más, közeli rokon fajokban is alkalmazhatók lehetnek.

2.2. Új SSR markerek fejlesztése a fokozottan védett, endemikus magyarföldi husángban (*Ferula sadleriana* Ledeb.)

2.2.1. Irodalmi előzmények

A *Ferula* L. az Apiaceae családba tartozó, mintegy 170 fajt tartalmazó nemzetség, amelynek földrajzi elterjedési területe Észak-Afrikától Közép-Ázsiáig terjed (Pimenov és Leonov, 1993). Több, a hagyományos gyógyászatban használt, és számos endemikus fajt tartalmaz, különösen a közép-ázsiai régióban (Kurzyna-Młynik és mtsai., 2008). A magyarföldi husáng (*Ferula sadleriana* Ledeb.) egy évelő lágyszárú, amelynek elterjedési területe a Kárpát-medencére korlátozódik (Lendvay és Kalapos, 2014). A faj sziklagyepek, sztyepplejtők és bokorerdők mozaikjában fordul elő (Lendvay és Kalapos, 2009). Mindössze nyolc populációja ismert, elterjedésének középpontjában pedig Észak-Magyarország és Dél-Szlovákia dombvidékei állnak, egy populáció pedig Erdélyben található (Tordai-hasadék). A populációk mérete 50-nél kevesebb és 5000 egyed között változik (Lendvay és Kalapos, 2009). A kis populációméret és a faj korlátozott elterjedése miatt a faj fokozottan védett mindhárom országban, ahol előfordul (Lendvay és Kalapos, 2014). Az IUCN Vörös Listáján a veszélyeztetett kategóriába sorolják (Király és mtsai., 2011), és szerepel az Európai Unió Élőhelyvédelmi Irányelvének II. és IV. mellékletében (Az Európai Közösségek Tanácsa, 1992).

Ezen endemikus faj genetikai információval is támogatott természetvédelmi kezelése érdekében 13 polimorf mikroszatellit markert azonosítottunk. A fajok közötti amplifikáció hatékonyságát az eurázsiai sztyeppe két faján, a *Ferula songaricán* Pall. ex Schult. és *Ferula tataricán* Fisch. ex Spreng. teszteltük, amelyek a nemzetségen belül

monofiletikus csoportot alkotnak célfajunkkal (ld. 3. esettanulmány). Úgy gondoljuk, hogy az általunk azonosított markerek hasznosak lehetnek a *Ferula* nemzetség fajain végzett populációgenetikai vizsgálatokban.

2.2.2. Módszerek és eredmények

A genomi DNS kivonását szilikagélben szárított levelekből végeztük, módosított CTAB protokollt követve (Sramkó és mtsai., 2014). Három egyed DNS-ének ekvimoláris keverékéből (3. függelék), a Nextera Library Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, Kalifornia, USA) segítségével, a gyártó protokollját követve DNS könyvtárat készítettünk. A szekvenálást az Illumina MiSeq berendezésen, a MiSeq Reagent Kit 2. verziójával végeztük, mely során 250 bp hosszúságú kétirányú (paired-end) olvasatokat kaptunk. Az olvasatokat a mikroszatellitek detektálásához és a primerek tervezéséhez a QDD v.3.1.2 (Meglécz és mtsai., 2014) programmal elemeztük, alapértelmezett beállítások használatával. A kiválasztott 9111 szekvencia közül a következő kritériumok alapján választottuk ki a primerpárokat a laboratóriumi teszteléshez: (i) a szekvencia csak tiszta mikroszatelliteket tartalmazhatott a célrégióban, legalább nyolc ismétlődéssel; (ii) nem tartalmazhatott (AT)_n ismétlődéseket; (iii) a primer illesztési pontszámának az amplifikált szekvenciához 6-nál alacsonyabbnak kellett lennie; (iv) a primereknek legalább 10 bázis távolságra kellett lennie a mikroszatellit motívumtól; (v) a konszenzus szekvenciák legfeljebb három olvasaton alapultak; (vi) a RepeatMasker (v1.317) (Smit és mtsai., 2013) programmal nem találtunk bennük transzpozonokat; (vii) nem kaptunk BLAST találatot a GenBankban található nem Viridiplantae szekvenciákra.

Ezen szűrési feltételekkel összesen 222 potenciális lókuszt azonosítottunk, amelyek közül az első 44-et választottuk ki a kezdeti

laboratóriumi tesztelésre. A 44 lókuszt specifikusan PCR-amplifikációját a Tordai-hasadékban található populációból származó egy egyed DNS-mintáját teszteltük (3. Függelék), hőmérséklet-grádiens PCR protokollt alkalmazva. A PCR sikerét hűtött, 2%-os agaróz gélen értékeltük. A PCR-keverék 1× DreamTaq Green puffert, 0,2 mM dNTP-t (mindegyikből egyenként), 1 mg/ml szarvasmarha-szérumalbumint, 0,5 µM-t minden egyes primerből, 0,05 U DreamTaq Green DNS-polimerázt és 2 ng templát DNS-t tartalmazott 10 µl végső térfogatban (az összes PCR-reagens a Thermo Scientific, Carlsbad, Kalifornia, USA-tól származott). A PCR körülményei a következők voltak: 94°C három percig, 40 ciklus 15 s 94°C-on, 30 s 56°C–64°C-on, majd 30 s 72°C-on, végső elongáció 72°C-on 14 percig. E lépés után 22 primerpár (4. táblázat) maradt, amelyek azonos, 64°C-os bekötési hőmérsékleten (T_a) specifikus termékeket adtak. Ezeket a lókusztokat tovább vizsgáltuk, populációs szinten polimorf lókusztokat keresve a Pilis-tetői populáció öt egyedén (3. függelék). Ugyanazt a PCR-keveréket és kiértékelési módszert használtuk, mint az előző, egy egyedén végzett lépésben. A PCR körülmények is ugyanazok voltak, kivéve a bekötési hőmérsékletet, ami egységesen $T_a=64^\circ\text{C}$ -ra lett beállítva. Az agaróz gél vizuális vizsgálata alapján tizenhárom lókuszt bizonyult polimorfnak populációs szinten. Ezeket a lókusztokat választottuk ki a további elemzéshez, és a „forward” primereket az 5' végükön fluoreszcensen jelöltük (4. táblázat). Mind a 13 kiválasztott lókuszt PCR-amplifikáltuk a fent leírt PCR körülmények alkalmazásával.

4. táblázat A magyarföldi husángban (*Ferula sadleriana*) fejlesztett 22 mikroszatellit lókuszt adatai. Az összes primer bekötési hőmérséklete $T_a=64^\circ\text{C}$.

Lókuszt	Primer szekvenciák (5' – 3')	Ismétlődő motívum	Méret (bp)	Fluoreszcen- s festék	GenBank hozzáférési szám
FSad01 ³	F: TGCGATGTTGAAGATAAACGGC; R: ATCGGCACCACTCACAGTAG	(AG) ₁₃	240	–	MN603946
FSad03 ³	F: ATCAACATCTATTATCAGTCATCCTTC; R: AAATGACCCTGATCGTTGAGG	(GA) ₁₇	140	–	MN603947
FSad04 ³	F: GTGAGCACTGGATACCGGAC; R: TCTGCTACCAACAGTCCTGG	(TG) ₉	94	–	MN603948
FSad06 ¹	F: CCCGATTACATTATTTGTAGTCG; R: CGTCCTCGTCACCAGATAAGC	(GA) ₉	111–121	VIC	MK393172
FSad07 ¹	F: AGGAGGTGTTGTGACCCAG; R: CCACTTCACAAATCTAAATTCCTACAC	(GT) ₁₀	216–226	VIC	MK393173
FSad09 ²	F: CTGTCGCCGGTGGTGATG; R: CCACTGATCACTACAGCGCC	(AG) ₉	193–249	6-FAM	MK393174
FSad10 ³	F: GGAAGGATAAGAAATATCAATCGGACG; R: TGCTTTATTGCGGAGAAAGTTCC	(TG) ₁₃	151	–	MN603949
FSad11 ²	F: TGGTTCTCATTCGAGCACATG; R: CTTCTCCACTGACCGTGAG	(AG) ₁₁	156–168	VIC	MK393175
FSad12 ¹	F: TGCCATGCATACTGTGTAACAC; R: GCTCTTGATTCTCATCTGAAACAC	(CT) ₉	288–294	6-FAM	MK393176
FSad13 ³	F: CATCTGAGCGAGGCCGAC; R: TATCTCCTCTTCTTCGCCACC	(GA) ₁₀	192	–	MN603950
FSad20 ³	F: GCAATGGCTTCAATCGGTTTC; R: ACCGCAATAGAAGCTCTAAGAGG	(TC) ₉	168	–	MN557388
FSad25 ¹	F: AACGATGTCGCACTTCGGAC; R: CAACGGGAACAAATCATCAGCC	(CT) ₁₅	171–211	NED	MK393177
FSad26 ³	F: ACCAGGTCCCACTCCCTTTC; R: AGAATTGTGAACATCAAAGACCC	(TC) ₉	241	–	MN557389
FSad28 ³	F: ATTTACCGGCGGTATGACCC; R: TGGTCGAAGCATGGTTGGAG	(CT) ₁₀	135	–	MN603951
FSad32 ³	F: AGACTATCCAGAGGACCGGC; R: TTGTTCTGCCAGAGATCCCG	(GAA) ₉	240	–	MN603952
FSad33 ²	F: TTTCTACCATCGCCATCTACCAC; R: AGAGTAAGTATCTCCAGATGTTCTTG	(CT) ₁₀	282–292	PET	MK393178
FSad36 ²	F: AGTTGCCAAGATTTGTGTCTAGC; R: TGTGCCTTTGTACTGTAGTGG	(CA) ₁₀	135–143	NED	MK393179
FSad37 ¹	F: GACATAAGTTGGTTGAGTTAGTTAGG; R: ACACTCTATTGATGGAGTCACC	(CT) ₁₁	115–159	6-FAM	MK393180
FSad39 ²	F: ACACATAACCAACGACTACGG; R: TGTACCGTCTTCTCCGACC	(TC) ₁₀	228–240	NED	MK393181
FSad40 ²	F: AGCGCAGGAATTGAATTGGC; R: TTCCCACCATAGACTGCTG	(AAG) ₁₀	129–147	6-FAM	MK393182
FSad42 ¹	F: TCAGTCATCATCCTTTCTTTCTC; R: GACATGCTATGACCATCTGAATTC	(TC) ₉	134–160	PET	MK393183
FSad43 ²	F: TGGCAAAGAGTCAGCAATGC; R: ACTAGGTGTACATGAAGACACGG	(TAGA) ₉	182–234	PET	MK393184

Megjegyzés: ¹ Multiplex 1; ² Multiplex 2; ³ előzetes vizsgálataink alapján monomorfnak bizonyult, ezért kizártuk a további vizsgálatokból.

Három populációból származó, populációnként 16, 20 és 18 egyeden (6. táblázat) teszteltük a lókuszok populációgenetikai alkalmazhatóságát. A fluoreszcensen jelölt PCR termékeket ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) eszközön elemeztük. Két multiplex keveréket készítettünk, melyekhez az egyes lókuszokkal végzett reakciótermékeket egyenlő arányban adtuk hozzá. Mindkét keverék hat lókuszt tartalmazott, a fragmentek hossza és a jelölő fluoreszcens festék alapján kombinálva (4. táblázat). A multiplexált PCR termékek egy mikroliterét az elemzés előtt 0,25 μ L GeneScan 500 LIZ méretstandardhoz (Applied Biosystems) és 14,75 μ L Hi-Di formamidhoz (Genetic Analysis Grade, Applied Biosystems) adtuk. A genotipizálást a PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) programmal, manuálisan végeztük. Eredményeinkben közöljük az allélek (A) és a privát allélek (A_p) számát, valamint a várt (H_e) és a megfigyelt heterozigotizációnkat (H_o). A genotípusok elemzését a GenAlEx v.6.5 szoftverrel végeztük (Peakall és Smouse, 2012), innen az allélok és a privát allélok számát, valamint a várt és megfigyelt heterozigotizáció értékeit ismertetjük. A Hardy-Weinberg-egyensúlytól (HWE) való eltéréseket a Hardy-Weinberg egzakt teszt és a p-értékek Markov lánc általi számításával, a lókuszok közötti kapcsoltság (LD) mértékét pedig az alap beállításokkal, és a p-értékek Markov lánc általi számításával számoltuk ki a GenePop v.4.2 (Raymond és Rousset, 1995; Rousset, 2008) szoftverben. A null alléleket a FreeNA (Chapuis és Estoup, 2007) programmal értékeltük, az EM algoritmus segítségével (Dempster és mtsai., 1977). Az MCMC paramétereket a HWE valószínűség-tesztelésénél az alapértelmezett beállításokon hagytuk. Az allélszám minden populációban 3–14 között mozgott, a privát allélok átlagos száma 1,4 (Tordai-hasadék), 0,1 (Pilis-tető) és 0,9 (Békkő) volt. A várt heterozigotizáció értékek 0,095 és 0,869 között mozogtak, a megfigyelt heterozigotizációk 0,05 és 0,938 között voltak, és a

HWE-től való eltérések mindhárom populációban jelen voltak, leginkább azonban az FSad37 és FSad33 lókuszok esetében (6. táblázat). Ez a mintázat valószínűleg a null-allélek jelenlétével magyarázható (6. táblázat), és az allélfrekvenciák korrekcióját teszi szükségessé (Chapuis és Estoup, 2007). A lókuszok kapcsoltágát figyeltük meg az FSad12 és FSad33 ($p=0,001$), FSad25 és FSad40 ($p=0,001$), FSad40 és FSad42 ($p=0,004$) lókuszpárok között minden populációban.

A fajok közötti amplifikációt a *F. sadleriana* két közeli rokona, a *F. songarica* három populációjában ($n=6$) és a *F. tatarica* három populációjában ($n=4$) teszteltük. Azonos PCR-körülmények között, 2%-os, hűtött agarózgélén értékelve, a 22 specifikus lókuszból 20 amplifikálódott és produkált specifikus PCR terméket a *F. songarica*, és 19 a *F. tatarica* esetében, a legtöbb esetben nyilvánvaló polimorfizmussal (5. táblázat).

5. táblázat Fajok közötti amplifikáció sikere közelrokon *Ferula* fajokban.

Lókusz	Allél méret (bp)		Lókusz	Allél méret (bp)	
	<i>Ferula songarica</i> ($n=6$)	<i>Ferula tatarica</i> ($n=4$)		<i>Ferula songarica</i> ($n=6$)	<i>Ferula tatarica</i> ($n=4$)
FSad01	256–290	228–284	FSad25	200–243	194–221
FSad03	130–132	138–140	FSad26	217–238	216–227
FSad04	113–116	117	FSad28	–	–
FSad06	139–154	137–151	FSad32	–	–
FSad07	212–254	212–233	FSad33	279–310	290–322
FSad09	201–230	202–255	FSad36	137–145	138–140
FSad10	180	179–186	FSad37	137–165	141–177
FSad11	169–186	173–189	FSad39	221–251	231–249
FSad12	300–319	286–337	FSad40	199–206	201–205
FSad13	206–211	203–207	FSad42	190–203	193–228
FSad20	172–179	–	FSad43	157	192–217

Megjegyzés: n = egyedszám; – = sikertelen amplifikáció.

6. táblázat A magyarföldi husáng (*Ferula sadleriana*) populációgenetikai mérőszámai a fajban tervezett 13 polimorf SSR marker alapján.^a

Lókuszt	Összesen (n=54)			Tordai-hasadék (n=16)					Pilis-tető (n=20)					Bétkő (n=18)				
	A	H _o	H _t	A	A _p	Null	H _o	H _e	A	A _p	Null	H _o	H _e	A	A _p	Null	H _o	H _e
FSad06	6	0,519	0,786	5	0	0,083	0,5	0,621	5	0	0,193	0,400 ¹	0,739	6	1	0,072	0,667	0,792
FSad37	10	0,283	0,808	7	4	0,352	0,133 ¹	0,742	5	0	0,277	0,250 ¹	0,738	5	1	0,176	0,444 ¹	0,736
FSad42	5	0,407	0,503	4	1	0	0,563	0,584	2	0	0	0,1	0,095	4	1	0,011	0,611	0,631
FSad25	14	0,704	0,84	8	3	0,057	0,688	0,822	4	0	0	0,65	0,558	11	4	0,019	0,778	0,84
FSad07	5	0,444	0,732	5	1	0	0,750 ¹	0,699	4	0	0,243	0,300 ¹	0,716	4	0	0,119	0,333	0,539
FSad12	4	0,426	0,547	3	1	0,087	0,375	0,508	2	0	0,166	0,25	0,499	3	1	0	0,667	0,586
FSad36	3	0,352	0,339	3	1	0	0,25	0,225	2	0	0	0,4	0,375	2	0	0	0,389	0,375
FSad40	7	0,556	0,748	6	1	0,002	0,625	0,699	4	0	0,066	0,4	0,546	6	1	0,02	0,667	0,653
FSad11	7	0,593	0,752	7	1	0,006	0,813	0,797	5	0	0	0,6	0,611	3	0	0,081	0,389	0,468
FSad43	8	0,5	0,777	6	2	0,27	0,286 ¹	0,763	5	0	0,08	0,55	0,7	5	1	0	0,611	0,583
FSad09	14	0,667	0,881	9	3	0,097	0,625 ¹	0,813	7	1	0,035	0,8	0,823	10	2	0,17	0,556 ¹	0,869
FSad39	6	0,704	0,737	6	0	0	0,938	0,779	4	0	0	0,700 ¹	0,648	6	0	0,111	0,500 ¹	0,698
FSad33	3	0,13	0,626	3	0	0,218	0,188 ¹	0,529	2	0	0,3	0,050 ¹	0,499	3	0	0,263	0,167 ¹	0,586

Megjegyzés: n = egyedszám; A = allélek száma; A_p = privát allélek száma; H_o = megfigyelt heterozigotitás; H_t = várt heterozigotitás az összes populációra nézve; H_e = várt heterozigotitás; ¹ = szignifikáns eltérés a Hardy-Weinberg egyensúlytól (p<0,05).

^a A vizsgált populációk geokoordinátái: Tordai-hasadék, Románia = 46,558685°N, 23,682311°E; Pilis-tető, Magyarország = 47,68088°N, 18,8798°E; Bétkő, Magyarország = 48,042622°N, 20,3756°E.

2.2.3. Konklúziók

A magyarföldi husángban (*F. sadleriana*) 22 SSR markert azonosítottunk, amelyek közül 13 bizonyult polimorfnek a vizsgált populációkban. Mivel ezek az első genetikai markerek, amelyek ebben a veszélyeztetett fajban lettek azonosítva, kulcsfontosságúak lehetnek a fajt célzó populációgenetikai és ezáltal természetvédelmi vizsgálatokhoz. A legtöbb marker a két rokon fajban specifikus termékeket szolgáltatott, ami szélesebb körű alkalmazhatóságukra enged következtetni a *Ferula* nemzetségen belül.

2.3. A veszélyeztetett, endemikus magyarföldi husáng (*Ferula sadleriana* Ledeb.) természetvédelmi célú populációgenetikai vizsgálata

2.3.1. Irodalmi előzmények

A veszélyeztetett populációk általános állapotának felmérésére kiválóan alkalmasak a genetikai módszerek. Az olyan mérőszámok, mint a genetikai diverzitás, a populációszerkezet, a génáramlás és a térbeli csoportok genetikai kapcsoltsága kritikus fontosságúak az endemikus taxonok tanulmányozásában, melyek kis populációkkal, széttöredezett áréával rendelkeznek, ezért nemcsak élőhelyük elvesztése, hanem az alacsony genetikai diverzitásból következő csökkent fitness is veszélyezteti őket. A genetikai diverzitást számos tényező befolyásolja, például életmenet jellemzők vagy a párzási rendszer sajátosságai. Például egy hosszú életű faj általában nagyobb genetikai diverzitást mutat, mint az egyéves fajok, de az előbbiek populációi között kisebb a genetikai differenciáció mértéke, mint az utóbbiak populációi között. Az endemikus és önbeporzó fajok általában kevésbé változatosak genetikailag, mint a széles körben elterjedt és kereszteződő fajok. Nemcsak azért létfontosságú az endemikus és veszélyeztetett fajok genetikai jellemzőinek vizsgálata, mert nem

elegendő pusztán a populációméret és az elterjedési adatok alapján dönteni a védelemről, hanem azért is, mert a genetikai adatok fényében jobban megismerhetjük az adott faj életmenet-jellemzőit valamint képet kaphatunk párházi rendszerének működéséről.

A Kárpát-medence több mint 70 endemikus növényfajnak ad otthont. Ezek között vannak olyan reliktum fajok, amelyek a Harmadidőszak (pl. *Syringa josikaea* Jacq. Ex Rechb. – (Molnár V., 2003), a negyedidőszaki eljegesedés előtt (pl. *Carpinus orientalis* Mill. – Willis és mtsai., 1995) és az utolsó jégkorszak vége (pl. *Trollius europaeus* L., *Dracocephalum ruyschiana* L., – Shuka és Tan, 2009; Szatmari, 2015) óta vannak jelen a Kárpát-medencében. A Kárpát-medencében számos olyan élőhely található, amelyek nagy endemikus fajgazdagságnak adnak otthont, mint például a szilikát- (*Achillea tuzsonii* Ujhelyi, *Minuartia frutescens* (Kit.) Tuzson) vagy a dolomit sziklagyepek (*Seseli leucospermum* Waldst. & Kit., *Linum dolomiticum* Borb., *Sesleria sadleriana* Janka, *Vincetoxicum pannonicum* (Borhidi) Holub – Sztár és Török, 2007).

A *Ferula* L. (Apiaceae) nemzetség (*sensu* Kurzyna-Młynik és mtsai., 2008, magába foglalva a *Dorema* D.Don és *Leutea* Pimenov nemzetségeket) mintegy 170 fajt foglal magába, amelyek között számos gazdaságilag fontos, gyógyászati vagy étkezési célokra használt, vagy endemikus faj található. A nemzetség legtöbb faja Közép- és Nyugat-Ázsiában található, de egy leszármazási ág a Földközi-tenger térségét is benépesítette (Pérez-Collazos és mtsai., 2009), és több faj Kelet-Európa sztyeppéin is jelen van (Kolomiychuk és Vynokurov, 2016; Mátyás és mtsai., 2017; Taysumov és mtsai., 2018). E kelet-európai csoport legnyugatibb faja a *Ferula sadleriana* Ledeb. a Kárpát-medence endemikus faja, melynek areája mindössze nyolc ismert populációra

korlátozódik, amelyek Magyarország (5 populáció), Szlovákia (2 populáció) és Románia (1 populáció) között oszlanak meg (7. táblázat). A faj sziklás, száraz gyepek, sztyepprétek és Pannon molyhos tölgyes karsztbokorerdők mozaikjában fordul elő (Lendvay és Kalapos, 2009). Feltételezések szerint a *F. sadleriana* egy interglaciális reliktum, bár nincs bizonyíték, amely alátámasztaná ezt a hipotézist, mivel a faj nem szerepel a nemzetségre összpontosító legújabb filogenetikai tanulmányokban (Kurzyna-Młynik és mtsai., 2008; Panahi és mtsai., 2015, 2018). A becsült populációméretetek 50-nél kevesebb egyedtől 5000 egyed körüli méretig terjednek (Lendvay és Kalapos, 2009), bár a populációméretben nagy az éves fluktuáció (Lendvay és Kalapos, 2014). A magyarországi husángot a legelés (főként muflonok által), a kirándulók általi taposás és mozaikos élőhelyén a lombkorona záródása fenyegeti.

7. táblázat Az ismert *Ferula sadleriana* populációk előfordulási adatai. Ns: mintázott egyedek száma; Nc: becsült egyedszám (Lendvay és Kalapos, 2009); *: nagymértékű populációméret különbség, zárójelben a (Nagy és mtsai., 2014) által közölt adat.

Populáció	Lelőhely	Földrajzi szélesség	Földrajzi hosszúság	Ns	Nc
Pisznice	Gerecse, Magyarország	47,69974	18,49097	14	400
Pilis-tető	Pilis, Magyarország	47,68088	18,8798	20	4700
Kis-Kevély	Pilis, Magyarország	47,63236	18,97113	7	50
Nagymaros	Börzsöny, Magyarország	47,7707	18,93854	9	50 (1200)*
Bélkő	Bükk, Magyarország	48,04277	20,37555	18	400
Konyári-fennsík	Szlovák karszt, Szlovákia	48,57469	20,386021	10	250
Pelsőci-fennsík	Szlovák karszt, Szlovákia	48,60154	20,4657	15	300
Tordai-hasadék	Torockói-hegység, Románia	46,558685	23,682311	16	2500

Tekintettel ezekre a veszélyekre, földrajzi elterjedésére, széttöredezett elterjedési területére, kis populációira és az alkalmas élőhelyek korlátozott számára, amelyek gyakran nem kapcsolódnak egymáshoz, a faj szigorúan

védett mindhárom országban, ahol jelen van. Az Európai Unió Élőhelyvédelmi Irányelvének II. és IV. mellékletében is szerepel (Az Európai Községek Tanácsa, 1992), és az IUCN Vörös listáján a „veszélyeztetett” kategóriába tartozik (Király és mtsai., 2011).

A faj védelme érdekében végrehajtott intézkedések közé tartozik a legelő vadak és kirándulók kizárása, valamint a visszatelepítéssel kapcsolt *ex situ* védelem (Lendvay és Kalapos, 2009). Ezek a visszatelepítések (amelyek az 1970-es és 1980-as években történtek) azonban csak részlegesen dokumentáltak, és sok esetben csak gyaníthatóak vagy anekdotikus bizonyítékokon alapulnak. A Pilis-tetői populációból *ex situ* megőrzés céljából az ELTE Botanikus Kertbe telepítettek egyedeket (Kalapos, 1998). Innen ugyanebbe a populációba (Lendvay és Kalapos, 2009), valamint a pisznicei populációba is telepítettek egyedeket, bár ezek vélhetően nem maradtak életben (Isépy I., személyes közlés; Lendvay és Kalapos, 2009). A bélkői populációból kerültek egyedek az MTA ÖBKI Botanikus Kertjébe Vácrátótra (Kereszty és Galántai, 1994; Lendvay és Kalapos, 2009). Az is feltételezhető, hogy a pisznicei populációból kerültek egyedek az MTA ÖBKI Botanikus Kertjébe (Sulyok J., személyes közlés). Ez a két áttelepítés nem zárja ki egymást, bár bizonytalan, hogy hogyan és milyen sorrendben történtek. Ezt követően az MTA ÖBKI Botanikus Kert állományából kerültek egyedek a bélkői populációba. Feltételezések szerint a Kis-Kevély populáció, amelyet 2006-ban fedeztek fel, ugyanebből az állományból történő betelepítés eredménye (Somlyay, 2007; Lendvay és Kalapos, 2009). Egy másik betelepítés a pisznicei populációba történt, feltehetően a Tordai-hasadék populációból, amikor az előbbiről azt hitték, hogy kihalt (Lendvay és Kalapos, 2009). Vannak anekdotikus beszámolók a nagymarosi populációba történő betelepítésekről is, bár ez sem lett dokumentálva (Somlyay L., személyes közlés).

Számos tanulmány foglalkozik a *Ferula* fajok genetikai állapotával (pl. Moghaddam és Farhadi, 2015; Dettori és mtsai., 2016; Rahali és mtsai., 2016; Khederzadeh és mtsai., 2017; Tajbakht és mtsai., 2018), azonban ezek a legritkább esetben koncentrálnak természetvédelmi-genetikai szempontokra (Pérez-Collazos és Catalán, 2008; Pérez-Collazos és mtsai., 2009; Li és mtsai., 2020). Tudomásunk szerint mindössze két olyan tanulmány van, amely mikroszatellit markereket ír le a *Ferula* nemzetségben, az egyik a *F. sadleriana* (Malkócs és mtsai., 2020), a másik a *Ferula sinkiangensis* K.M.Shen (Li és mtsai., 2020) esetében, két olyan fajnál, amelyek az eurázsiai sztyeppén élnek, de ennek a hatalmas élőhelynek a nyugati, illetve keleti peremén fordulnak elő (She és Watson, 2005; Király, 2007).

Ebben a tanulmányban i) rekonstruáljuk a *Ferula* nemzetség filogenetikai törzsfáját az nrITS szekvencia segítségével, hogy meghatározzuk a *F. sadleriana* elhelyezkedését a nemzetségben belül, ii) elemezzük a *F. sadleriana* populációk genetikai diverzitását, populációszerkezetét és evolúciós történetét 13 mikroszatellit marker segítségével, és iii) genetikailag megalapozott ajánlásokat adunk a faj megőrzésére.

2.3.2. Anyag és módszer

Mintavétel, DNS kivonás, nrITS és SSR adatok előállítása

A *F. sadleriana* valamennyi ismert lelőhelyéről 7–20 egyedből gyűjtöttünk szövetmintákat (a mintavételezés a legutóbbi, átfogó terepi vizsgálat alapján ismert populációmérettel arányosan történt (Lendvay és Kalapos, 2009)), valamint a *Ferula songarica* Pall. Ex Schult. két egyedéből, valamint a *Ferula tatarica* Fisch. ex Spreng. és a *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuff. egy-egy egyedéből (4. Függelék), amelyeket szobahőmérsékleten, szilikagélben tároltunk. A DNS kivonása módosított

CTAB protokollal történt (Sramkó és mtsai., 2014). Az SSR adatok előállításához 109 *F. sadleriana* egyed genomi DNS-kivonatát hígítottuk azonos koncentrációra (10 ng/μl). Tizenhárom mikroszatellit lókuszt használtunk, a (Malkócs és mtsai., 2020) által leírtakkal megegyezően, beleértve a PCR körülményeket, a PCR-termékek multiplexálását és az elektroforetikus körülményeket is. A genotipizálást manuálisan végeztük a PeakScanner 1.0 verziójának (Applied Biosystems) segítségével. nrITS szekvenciákat az ITS1A (Gulyás és mtsai., 2005) és ITS4 (White és mtsai., 1990) primerek segítségével, a *F. sadleriana* 8 előfordulási helyéről egy-egy egyedéből, a *F. songarica* két egyedéből, valamint a *F. tatarica* és a *F. heuffelii* egy-egy egyedéből származó genomi DNS felhasználásával állítottuk elő. A PCR körülmények az alábbiak voltak: 94°C három percig, 35 ciklus 30 s 94°C-on, 30 s 51°C-on, 40 s 72°C-on, majd végső elongáció 72°C-on 7 percig. A PCR-termékek szekvenálása a Macrogen Europe B.V. (Amszterdam, Hollandia) szolgáltatásán keresztül történt. A nrITS szekvencia-olvasatokat manuálisan ellenőriztük, és szükség esetén korrigáltuk a FinchTV 1.4-es verziójával, majd feltöltöttük a GenBank online adatbázisba (4. Függelék). Az nrITS adatsort kiegészítettük a GenBank adatbázisában hozzáférhető más *Ferula* fajok egyedeinek szekvenciáival (4. Függelék). Az nrITS szekvenciákat a Seaview 5.0.4-es verziójában a MUSCLE algoritmus (Edgar, 2004) segítségével, az alapértelmezett beállítások használatával illesztettük. Az nrITS régióon belül az ITS1, ITS2 és 5,8S rRNS szekvenciákat a korábban publikált adatsorok alapján azonosítottuk (4. Függelék).

Filogenetikai elemzés

A *F. sadleriana* a *Ferula* nemzetségen belül elfoglalt filogenetikai pozícióját a fent leírt nrITS adatsor felhasználásával tártuk fel. Az IQ-TREE szoftver 1.6.12-es verzióját (Nguyen és mtsai., 2015) használtuk a ModelFinder

(Kalyaanamoorthy és mtsai., 2017) -MFP-MERGE opcióval a legjobb partícionálási séma megkereséséhez, és 810 ultragyors bootstrap iterációval a ML alapú konszenzus törzsfa létrehozásához (Chernomor és mtsai., 2016; Hoang és mtsai., 2018).

Populációgenetikai elemzések

A populációgenetikai elemzésekhez csak az SSR adatsort használtuk fel. Annak ellenőrzésére, hogy a választott mintaszámok elegendőek-e az egyes populációk reprezentálásához, az ADZE v.1.0 szoftvert használtuk az allélgazdagság meghatározására. Annak ellenőrzésére, hogy a használt markerek képesek-e megfelelően jellemezni a populációkon belüli genetikai diverzitást, genotípus-halmozódási görbéket (genotype accumulation curve) készítettünk az R környezetben elérhető *poppr* csomag segítségével (Kamvar és mtsai., 2013).

Az R v.3.6.3 környezetben (R Core Team, 2019) található *adegenet* és *poppr* csomagokat (Jombart, 2008; Kamvar és mtsai., 2013) használtuk a populációnkénti allélszám, a lókuszonkénti átlagos allélszám, a populáción belüli privát allélok száma és a megfigyelt heterozigotizáció kiszámításához. A lókuszokat a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérések szempontjából is vizsgáltuk az R v.3.6.3 *pegas* csomagjának (Paradis, 2010) χ^2 tesztjével, és mivel mind a 8 populációban az FSad33 lókuszt, és 4 populációban az FSad37 és FSad39 lókuszok esetében szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk, a FreeNA szoftvert használtuk a null allélok kimutatására, és ennek megfelelően korrigáltuk az allélfrekvenciákat (Chapuis és Estoup, 2007). A várt heterozigotizációt és az egyedszámmra korrigált várt heterozigotizációt ezekből a módosított allélfrekvenciákból számoltuk ki a következő képletek segítségével:

$$He = 1 - \frac{\sum_{l=1}^m \sum_{i=1}^k p_i^2}{m}; \text{ ahol } p_i \text{ az } i\text{-edik allél gyakorisága, } k \text{ az allélek száma és } m \text{ a}$$

lókuszok száma (Slatkin és mtsai., 1991), és $uHe = \left(\frac{2N}{2N-1} \right) \cdot He$; ahol N a mintázott egyedek száma (Nei és Roychoudhury, 1974). A beltenyésztettségi együtthatót (F) a megfigyelt és a várható heterozigotizásokból számoltuk ki Wright képletével: $F = 1 - \frac{Ho}{He}$ (Wright, 1922). Az Fst értékeket a FreeNA programban, az ENA módszerrel számoltuk ki (Chapuis és Estoup, 2007). A korrigált allélgyakoriságokat a populációk közötti Cavalli-Sforza- és Edwards-húrtávolságok kiszámításához használtuk, majd a Past 3.0 szoftverben 100 bootstrap mintával UPGMA törzsfát építettünk. A földrajzi távolságokat az R 3.6.3 verziójában található *geosphere* csomag segítségével számítottuk ki. A földrajzi távolság és a genetikai differenciáció korrelációját a FreeNa programból kinyert páronkénti Fst mátrix és a földrajzi távolságmátrix összehasonlításával teszteltük, az R környezet *ade4* csomagjában található Mantel-teszttel (Chessel és mtsai., 2004).

A populációk szerkezetét a ParallelStructure v.2.3.4 szoftverrel (Pritchard és mtsai., 2000; Besnier és Glover, 2013) vizsgáltuk a CIPRES weboldalon (Miller és mtsai., 2012), egy redukált adatsort használva, amely nem tartalmazza az FSad33 és az FSad37 lókuszokat, mivel azok szignifikánsan eltértek a HWE-től. Tekintve az egyes populációk egymáshoz való közelségét és a közelmúltban történt természetvédelmi célú telepítéseket, a STRUCTURE elemzésekben az admixture modellt használtuk. Az elemzéseket 100 000 MCMC iteráción keresztül futtattuk 20 000 burn-in mellett. Minden egyes K értékre ($K=1-10$) öt ismétlést futtattunk. A STRUCTURE HARVESTER (Earl

és VonHoldt, 2012) segítségével a ΔK (Evanno és mtsai., 2005) és az $\ln Pr(X|K)$ értékek alapján választottuk ki a megfelelő K értéket.

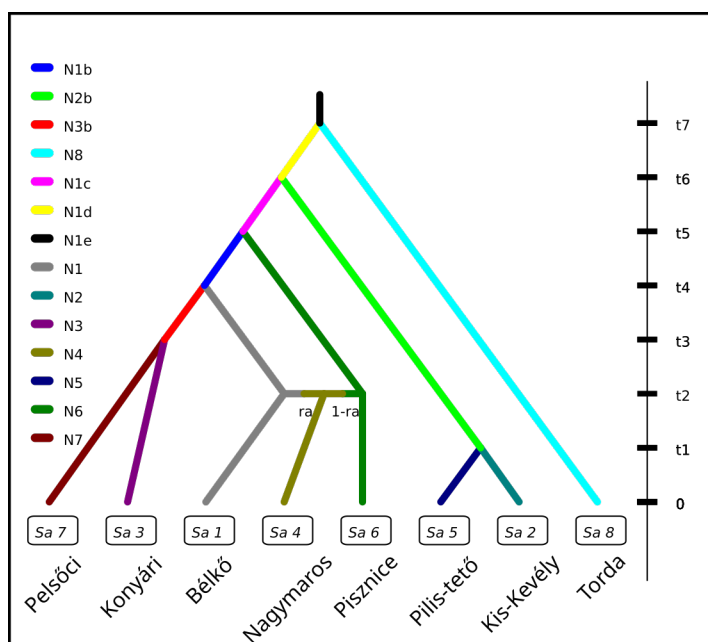
Demográfiai elemzések

A *F. sadleriana* demográfiai történetének elemzéséhez a DIYABC v.2.1.0 programban (Cornuet és mtsai., 2008) alkalmazott ABC keretrendszert használtuk a 11 lókuszt tartalmazó, redukált SSR adatsoron. Annak érdekében, hogy elkerüljük nagyszámú alternatív forgatókönyv bevonását ugyanabba az elemzésbe, külön elemzéseket futtattunk a (i) populációk közötti leszármazási kapcsolat, (ii) a gyaníthatóan kevert eredetű nagymarosi populáció forrásának feltárása érdekében, valamint, hogy (iii) megbecsüljük a populációk közötti elválások idejét a végső, legvalószínűbb topológia segítségével. Az első elemzés során 9 lehetséges forgatókönyvet (5. Függelék) teszteltünk a populációk közötti filogenetikai kapcsolatokra vonatkozóan, az effektív populációméretekre és az eltérési időkre vonatkozó egyenletes eloszlású prior beállítások alkalmazásával (6. Függelék). Minden lókuszt egy csoportba soroltunk, és a mikroszatellitekre vonatkozó alapértelmezett prior paramétereket használtuk, kivéve a mutációs rátát, amelyet 1×10^{-5} és 1×10^{-3} közötti egyenletes prior eloszlásra állítottunk be, mely egy megengedőbb beállítás, ugyanis mikroszatellit markerek esetében még a 1×10^{-4} és 1×10^{-3} közötti beállítást szokták használni (Cornuet és mtsai., 2010; Cabrera és Palsbøll, 2017). A következő összefoglaló statisztikákat választottuk ki: átlagos allélszám, átlagos genetikai diverzitás (Nei, 1987), F_{st} (Weir és Cockerham, 1984), osztályozási index (Pascual és mtsai., 2007) és $\delta\mu_2$ távolság (Goldstein és mtsai., 1995). Minden egyes forgatókönyvhöz 5×10^5 adatsort szimuláltunk a paraméterek prior eloszlásai alapján. A különböző forgatókönyvek poszterior valószínűségeinek kiszámításához a közvetlen és a logisztikus megközelítést használtuk, és a legnagyobb poszterior valószínűséggel rendelkező

forгатóкőnyvet választottuk ki. A forгатóкőnyvválasztással kapcsolatos konfidencia értékeléséhez a direkt megközelítésnél 500 szimulált adatsorra, a logisztikus megközelítéssel pedig az összes adatsor 1%-ára vonatkozóan számoltuk ki a poszterior prediktív hibaarányokat (posterior predictive error rate). A modellellenőrzést 1000, a poszterior eloszlásból szimulált adatkészleten végeztük el, a következő, a tanuló adatsorban nem szereplő összefoglaló statisztikák segítségével: átlagos méretvariancia, valamint kétmintás statisztikák, mint átlagos allélszám, átlagos géndiverzitás és közös alléltávolság (Chakraborty és Jin, 1993).

Mivel a STRUCTURE elemzés és az első ABC elemzés azt sugallta, hogy a nagymarosi populáció kevert eredetű (lásd **2.3.3. Eredmények**), a második elemzésben 6 alternatív forгатóкőnyvet teszteltünk e populáció eredetére vonatkozóan (7. Függelék). Az effektív populációméret és az elválások idejének prior eloszlásai a 8. Függelékben találhatók. Minden más prior beállítás megegyezett az első elemzésben használtakkal. A felhasznált összefoglaló statisztikák a következők voltak: átlagos allélszám, átlagos genetikai diverzitás, osztályozási index és közös alléltávolság. A fenti prior paraméterek alapján minden forгатóкőnyvhöz egymillió szimulált adatsort generáltunk. Az I. és II. típusú hibák valószínűségét az első elemzéshez hasonló módon számították ki. A modellellenőrzést az első elemzéssel azonos beállításokkal végeztük el, azzal a különbséggel, hogy az itt használt összefoglaló statisztikák az átlagos méretvariancia, valamint a kétmintás statisztikák, mint az átlagos allélszám, az átlagos genetikai diverzitás és az F_{st} voltak.

A harmadik elemzésben az előző elemzések által valószínűsített topológiát használtuk az elválási idők és az ősi populációk effektív méretének becsléséhez, ezért csak egy forгатóкőnyvet modelleztünk (2. ábra).



2. ábra A harmadik ABC elemzéshez használt forgatókönyv. Minden effektív populációméretet egy szín jelöl. Az y tengelyen található jelölések megfelelnek egy-egy koaleszcens eseménynek. A jelölések közötti távolság nem arányos az események között eltelt idővel. Az egyes színek a különböző effektív populációméreteket jelölik.

Az effektív populációméretet és az elválási idők prior eloszlásai a 9. Függelékben találhatók. Minden más prior beállítás megegyezett az előző két elemzésben használtakkal. A felhasznált összefoglaló statisztikák a következők voltak: átlagos allélszám, átlagos genetikai diverzitás, átlagos Garza-Williamson M (Garza és Williamson, 2001; Excoffier és mtai., 2005), osztályozási index és közös alléltávolság. Egymillió adatsort szimuláltunk ezekkel az *a priori* paraméterekkel egyetlen forgatókönyvhöz. A modellellenőrzés megegyezett az előző két elemzéssel, azzal a különbséggel, hogy az itt használt összefoglaló statisztikák az átlagos méretvariancia és a kétmintás átlagos allélszám, az átlagos genetikai diverzitás és az F_{st} voltak. Ebben az elemzésben megbecsültük a paraméterek poszterior eloszlását, és a paraméterbecslés robusztusságának értékeléséhez 500 szimulált adatsor alapján kiszámítottuk az RMAE értékeket (Cornuet és mtai., 2010).

2.3.3. Eredmények

Filogenetikai elemzés

Az ITS mátrix 243 szekvenciát tartalmazott, amelyekből összesen 178 volt egyedi szekvencia. A mátrix 624 bázispár hosszú volt, melyből 153 parszimónia-informatív, 130 szingleton és 340 állandó nukleotidot azonosítottunk. A mátrix az ITS1 régió 5' végét, az 5,8S riboszomális RNS gént és az ITS2 régió 3' végét tartalmazták.

Az IQ-TREE két partíciót azonosított, az első az ITS1 és ITS2 régiókat, a második pedig az 5,8S riboszomális RNS gént tartalmazta. A ModelFinder az első partícióhoz a SYM+G4 modellt, a második partícióhoz pedig a K2P+R2 modellt választotta ki a BIC értékek alapján. A generált ML konszenzusfa tizenkét korábbi tanulmány (4. Függelék) eredményeit integrálja, és azokat nyolc *F. sadleriana*, két *F. songarica*, egy *F. tatarica* és egy *F. heuffelii* szekvenciával egészíti ki, amelyeket ebben a tanulmányban *de novo* generáltunk.



3. ábra ML módszerrel generált törzsfa, amely a *Ferula* nemzetség „A” kládját vagy *Peucedanoides* fajsorát tartalmazza (szürke kiemelés a 10. Függelékben). A 0 hosszúságú ágakat összecsuhtuk és szürke háromszögekkel jelöltük. Az 50-nél kisebb bootstrap értékkel rendelkező elágazásokat töröltük. A bootstrap értékek az ágak alatt találhatóak. Az ebben a tanulmányban generált új szekvenciák piros színnel vannak jelölve.

A törzsfa nagyrészt egyezik a korábbi tanulmányokéval, és általában alacsony bootstrap értékek, nagy politómiák jellemzik, és egyes ribotípusok

előfordulnak különböző fajokban is (10. Függelék). A *F. sadlerianában* három ribotípus fordul elő, amelyek közül kettőt négy egyed, egyet pedig egyetlen egyed képvisel. A *F. sadlerianát*, *F. tataricát*, *F. songaricát* és *Ferula nudát* Spreng. tartalmazó klád nagy támogatottságú (BS=93%), és a (Kurzyna-Młynik és mtsai., 2008) szerinti „A” kládon belül helyezkedik el, amely a Panahi és mtsai., (2018) szerinti *Peucedanoides* (Boiss.) Korovin fajsornak felel meg (3. ábra). Az „A” klád elkülönülése jól támogatott (BS=96%) a *Ferula kareliniit* Bunge és *Ferula sibiricát* Willd. (10. Függelék) tartalmazó „B” kládtól (Kurzyna-Młynik és mtsai., 2008; Panahi és mtsai., 2018).

Populációgenetikai elemzések

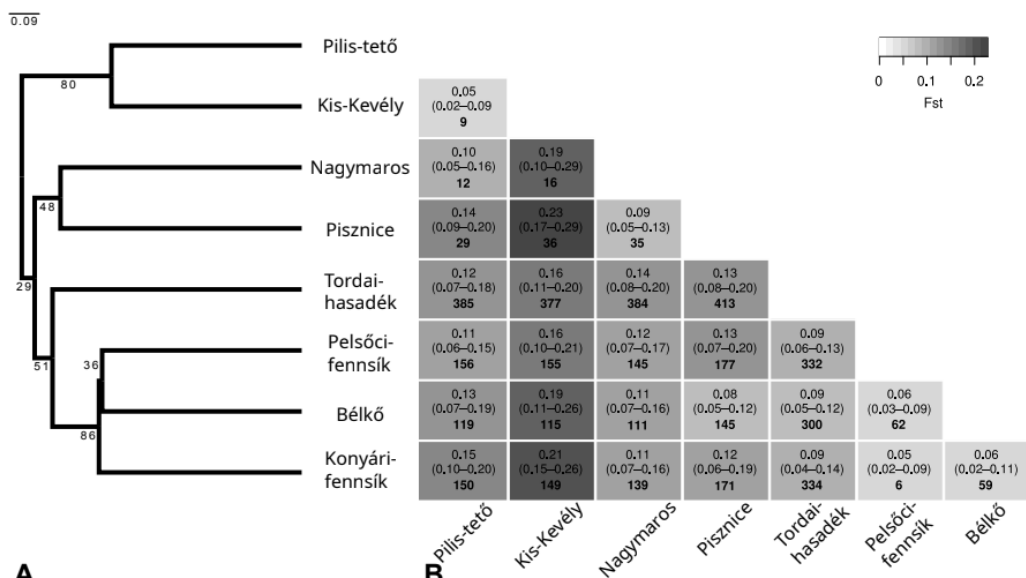
Az allélgazdagság a populációk felében tetőzött a mintavételezett egyedszámban, a leginkább alulmintázott populációk a Bélkő és a Tordai-hasadék voltak (11. Függelék). A multilókusz genotípusok medián száma maximum öt lókusznál tetőzött, amikor az összes mintázott populációt külön-külön vettük figyelembe, és hat lókusznál, amikor az összes populációt összevontuk (12. Függelék). Null-allélok minden lókuszban jelen voltak, bár populációnként eltérő arányban. Az egyes populációkban a null-allélok gyakorisága 0-tól (az FSad06 és FSad39 lókuszokban) az FSad37 lókuszban megfigyelt 0,405-ig terjedt. Az átlagos null-allél frekvencia az FSad06 lókuszban volt a legalacsonyabb (0,06) és az FSad33 lókuszban a legmagasabb (0,28) (13. Függelék). Az allélok teljes száma a Kis-Kevély populációban megfigyelt 34-től a Tordai-hasadék populációban megfigyelt 72-ig terjedt. Privát allélok a Nagymaros és a Pilis-tető kivételével minden populációban jelen voltak, és a Pisznice és a Tordai-hasadék populációkban érték el a maximumot (8). A megfigyelt heterozigotizációs értékek a nagymarosi populációban mért 0,363-tól a Konyári-fennsík populációban mért 0,577-ig

terjedtek. A várt heterozigotizáció a Kis-Kevély populációban volt a legalacsonyabb (0,555) és a Tordai-hasadék populációban a legmagasabb (0,690). Ugyanez a két populáció mutatta az egyedszámba korrigált várható heterozigotizáció szélsőséges értékeit is, amelyek 0,597 és 0,712 között mozogtak. A beltenyésztettségi együttható (F) a Konyári-fennsík populációban volt a legalacsonyabb (0,099) és a nagymarosi populációban a legmagasabb (0,390) (8. táblázat).

8. táblázat A *Ferula sadleriana* nyolc ismert populációjának populációgenetikai paraméterei. N: a mintázott egyedek száma; Na: az allélok száma; Np: a privát allélok száma; Ho: megfigyelt heterozigotizáció; He: várt heterozigotizáció; uHe: egyedszámba korrigált várt heterozigotizáció; F: beltenyésztettségi együttható.

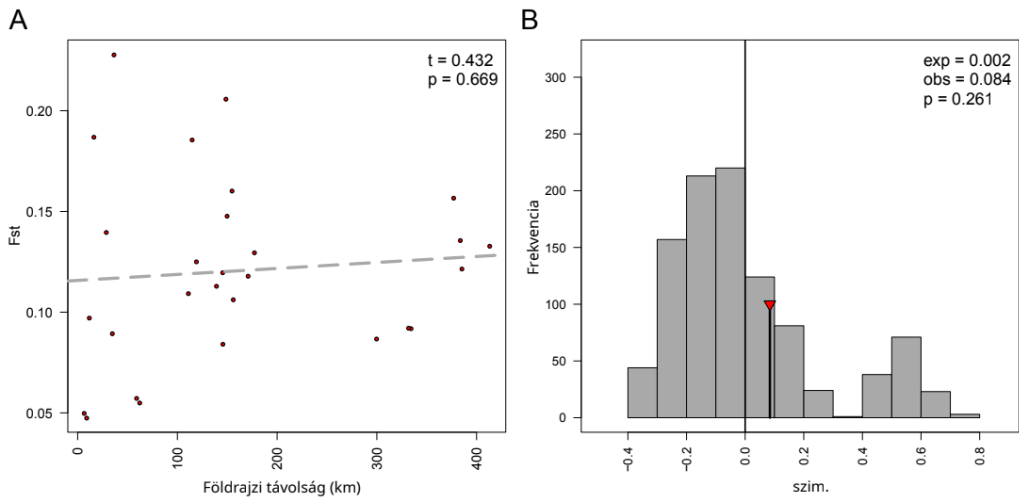
Populáció	N	Na	Np	Ho	He	uHe	F
Bélgő	18	68	4	0,521	0,677	0,697	0,230
Kis-Kevély	7	34	1	0,429	0,555	0,597	0,227
Konyári-fennsík	10	56	4	0,577	0,640	0,674	0,099
Nagymaros	9	45	0	0,363	0,595	0,630	0,390
Pilis-tető	20	51	0	0,419	0,625	0,641	0,329
Pisznice	14	53	8	0,473	0,662	0,687	0,286
Pelsőci-fennsík	15	60	3	0,572	0,672	0,695	0,148
Tordai-hasadék	16	72	8	0,518	0,690	0,712	0,249

A páronkénti *Fst* a földrajzilag egymáshoz közel található populációk között volt a legalacsonyabb, a távolabbi populációk között pedig magasabb, azonban a Kis-Kevély populáció általában magas *Fst* értékeket mutatott az összes többi populációval, kivéve a Pilis-tetővel, amely a legalacsonyabb *Fst* értékek között volt (4. ábra). Az UPGMA fa összességében nem volt jól támogatott, kivéve a Pilis-tető és a Kis-Kevély populációpár ágát, valamint a Bélgő, Konyári-fennsík és Pelsőci-fennsík alkotta kládot (4. ábra).



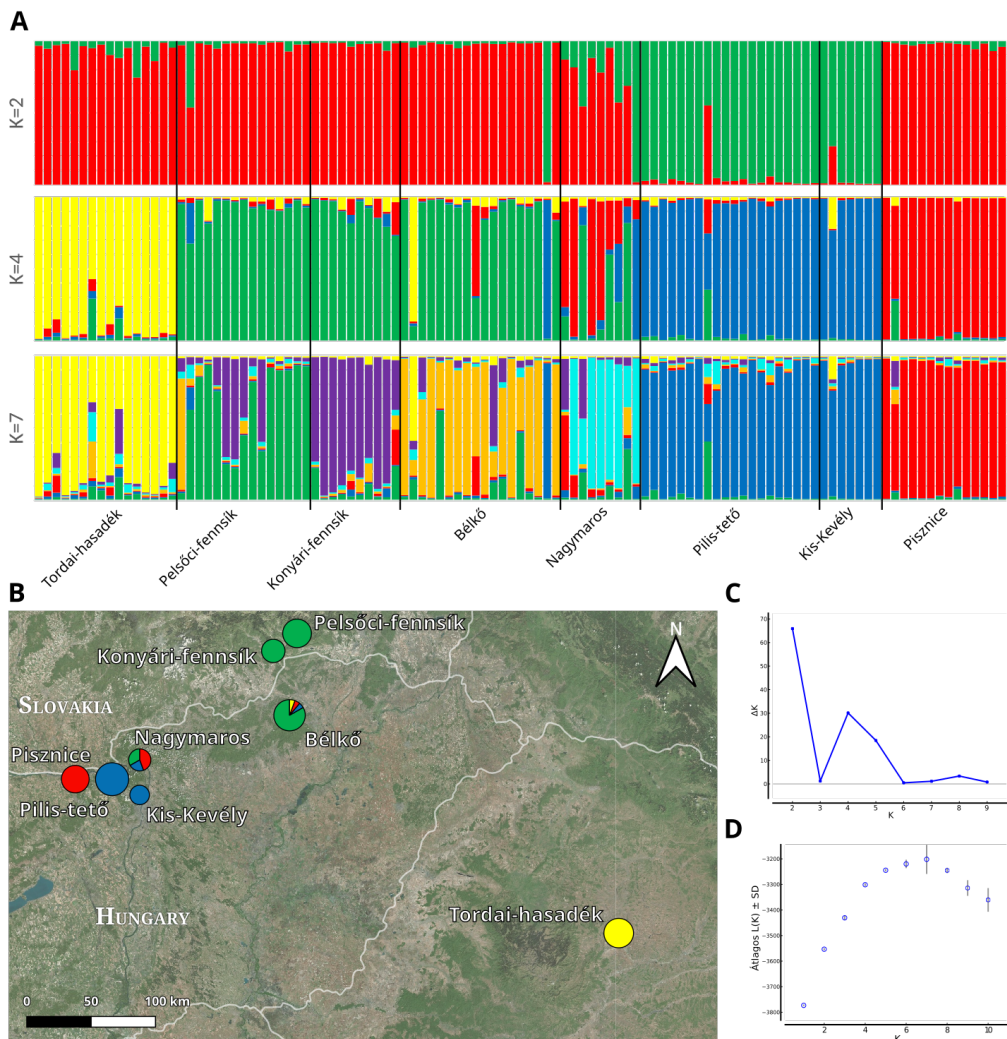
4. ábra A: a null allélokra korrigált allélfrekvenciákból számolt, populációk közötti Cavalli-Sforza- és Edwards-húrtávolságokból generált UPGMA módszerrel készült törzsfá bootstrap értékekkel. B: a null allélokra korrigált allélfrekvenciákból számolt, populációk közötti páronkénti *Fst* értékek hő térképe. A sötétebb szürke szín magasabb *Fst* értéknek felel meg. Az egyes négyzetek felső sora az *Fst* érték, a második sor zárójelben tartalmazza az *Fst* 95%-os konfidenciaintervallumát, a harmadik sor pedig a földrajzi távolságot jelöli kilométerben.

Nem volt szignifikáns korreláció a populációpárok közötti földrajzi távolságok és a páronkénti *Fst* értékek között (5. ábra). A STRUCTURE elemzésben a ΔK a $K=2$ és a $K=4$, míg az $\ln Pr(X|K)$ a $K=7$ esetében volt a legmagasabb, ezért ezt a három csoportosítást szemlélítettük (6. ábra). $K=2$ -nél a Pilis-tető és a Kis-Kevély populáció válik el a többitől, kivéve a Bélkő populáció egy egyedét, amely az előbbi kettővel egy csoportba kerül. A nagymarosi populáció a Pilis-tető–Kis-Kevély (a továbbiakban "Pilisi klád") csoportra jellemző mintázatokat mutat. $K=4$ esetén a Pilisi klád együtt marad, míg a Tordai-hasadék és a Pisznice populációk egy-egy külön klasztert alkotnak.



5. ábra Az IBD tesztjei a populációpárok közötti F_{st} értékek alapján, a null allélokra korrigált allélfrekvenciákat felhasználva. A genetikai differenciáció a földrajzi távolság függvényében (A), a szürke szaggatott vonal a pontokra illesztett lineáris regressziót ábrázolja, a jobb felső sarokban a t és p értékekkel. Mantel-teszt (B), amely a genetikai és földrajzi távolság között megfigyelt korrelációt (piros háromszög) és a térbeli struktúra hiányát feltételező 999 Monte Carlo szimuláció hisztogramját ábrázolja.

A Bélkő, Konyári-fennsík és Pelsőci-fennsík populációk egy klasztert alkotnak, kivéve a Bélkő populáció egy másik egyedét, amely a Tordai-hasadékkal kerül egy csoportba. A nagymarosi populáció valamennyi klaszterből mutat jegyeket, a domináns a Pisznicei klaszter. $K=7$ esetén minden populáció külön-külön klasztereződik, kivéve a Pilisi kládba tartozó populációkat. A Bélkő és a Nagymaros populációk jelentős mennyiségű keveredést mutatnak más klaszterekből. A Pelsőci-fennsík populáció a Konyári-fennsík populációból származó keveredést mutat.

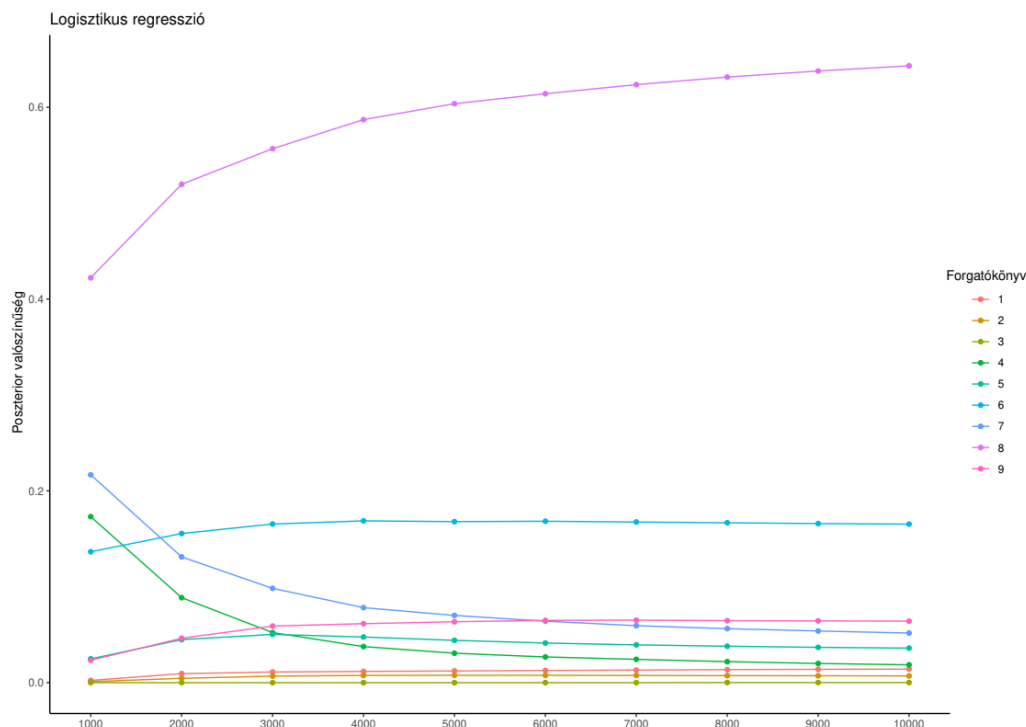


6. ábra (A) A STRUCTURE elemzés eredményeit bemutató hisztogramok K=2, 4 és 7 esetén. (B) a STRUCTURE (K=4) eredmények térképen ábrázolva, a kördiagramok mérete a mintaszámmal arányos. Minden egyedet ahhoz a csoporthoz rendeltünk, amelyhez a legnagyobb valószínűséggel sorolódott. A deltaK értékek a klaszterek számához (K) viszonyítva (C) és az adatok átlagos becsült log-normál (Ln) valószínűsége a K klaszterek szimulált számához viszonyítva (D). A szürke sávok az öt ismétlés közötti szórást jelzik.

Demográfiai elemzések

A *F. sadleriana* demográfiai történetének vizsgálatára a DIYABC v.2.1.0 programban alkalmazott ABC keretrendszert használtuk. Az első ABC elemzés során 9 forgatókönyvet (5. Függelék) teszteltünk a vizsgált populációk közötti filogenetikai kapcsolatokra vonatkozóan. A forgatókönyvek kiválasztása a korábbi elemzések, például a STRUCTURE elemzés és az UPGMA törzsfá eredményei alapján történt. Minden forgatókönyvben a Pilis-tető–Kis-Kevély populációk testvérek voltak (Pilisi klád) és a Bélkő, Konyári-fennsík, Pelsőci-fennsík populációk által alkotott csoport egy kládot (a továbbiakban "Északi klád") alkotott, mivel a többi elemzés eredményeiben nem volt ellentmondás ezen kapcsolatok tekintetében. A forgatókönyvek eltértek e két kládnak a többi populációhoz viszonyított elhelyezkedésében, valamint a fennmaradó 3 populáció közötti kapcsolatokban. A Tordai-hasadék populáció minden forgatókönyvben elsőként vált el, kivéve a 4., 5. és 6. forgatókönyvben, ahol a Pilisi klád foglalta el a bazális pozíciót. Az 1. forgatókönyvben a második elválás választotta el az Északi kládot a Pilisi kládtól és a Nagymaros–Pisznice pártól, amelyek ezt követően váltak el. A második forgatókönyvben az Északi klád vált el másodikként, utána a Pisznice, a Nagymaros és a Pilisi klád, ebben a sorrendben. A harmadik forgatókönyv a másodiktól abban különbözik, hogy a pisznicei és nagymarosi populációk fordított sorrendben váltak el. A 4., 5. és 6. forgatókönyv a Tordai-hasadék, a Pisznice és a Nagymaros populációk egymáshoz viszonyított pozíciójában különbözött, míg az Északi klád mindhárom esetben csúcsi helyzetben volt. A 7. forgatókönyvben a Nagymaros–Pisznice pár egy külön kládot alkot, amely az Északi kládból válik ki, miután az elvált a Pilisi kládtól. A 8. és 9. forgatókönyv a nagymarosi populáció vegyes eredetét vizsgálta, mindkettőben a Bélkő és Pisznice populációk közötti keveredésből származik. A paraméterek prior eloszlását

megfelelően választottuk ki, mivel a megfigyelt adathalmaz jól illeszkedett a szimulált adathalmazok pontfelhőjébe a főkomponens-elemzésben, ahol az első két főkomponens a variancia 53%-át magyarázta (14. Függelék). A 8. forgatókönyvet a legmagasabb, 0,64-es PP alapján választottuk ki (7. ábra).

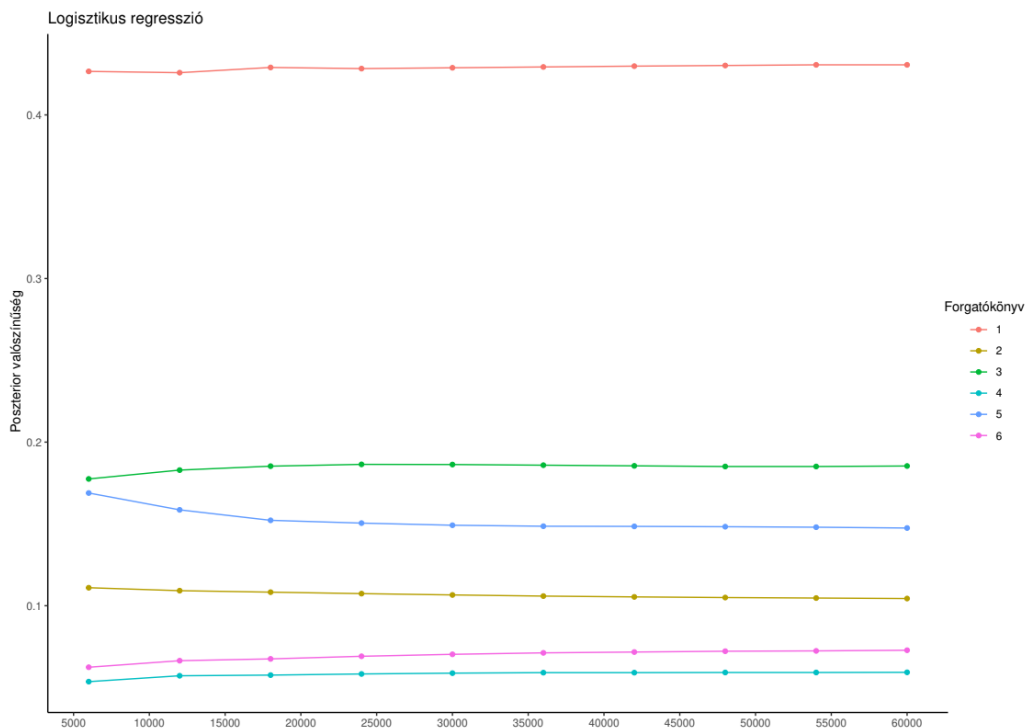


7. ábra Logisztikus regressziós diagram az első ABC elemzésben szimulált forgatókönyvekre (5. Függelék). Az x tengely a valószínűségek kiszámításához használt szimulációk számát mutatja, az y tengely pedig az egyes forgatókönyvek poszterior valószínűségét.

Az összes többi forgatókönyv sokkal kevésbé valószínű, a második legvalószínűbb a 6. forgatókönyv volt 0,17-es PP-vel. A poszterior prediktív hibaarányok mérsékelten magasak voltak, 0,457 a közvetlen, és 0,388 a logisztikus megközelítés esetében. A modellellenőrzés azt mutatta, hogy a megfigyelt adatpont a szimulált adathalmazok poszterior eloszlásának

pontfelhőjébe esett a PCA-ban, amelyben az első két főkomponens a variancia 79,3%-át magyarázta (15. Függelék).

A második ABC elemzésben a feltételezhetően kevert származású nagymarosi populáció eredetét 6 különböző evolúciós forgatókönyv alapján vizsgáltuk (7. Függelék). Minden forgatókönyvben a Tordai-hasadék populáció képviselte a bazális leszármazási vonalat, a Pilisi klád a második elválást, a Pisznice populáció a harmadik elválást, az Északi klád pedig az utolsót. Az 1. forgatókönyv megegyezett az első elemzés 8. forgatókönyvével, amiben a nagymarosi populáció a Pisznicei és a Bélkői populáció keveredésének eredménye. A 2. forgatókönyv szerint a nagymarosi populáció a Pisznicei populáció és egy hipotetikus ősi populáció keveredéséből alakult ki, amely az Északi klád testvérkládja volt (a továbbiakban: "ősi északi populáció"). A 3. forgatókönyv szerint a nagymarosi populáció a Pisznice és a Bélkő populációk keveredéséből származó populáció és a Pilisi klád közötti keveredésből alakult ki. A 4. forgatókönyv szerint a nagymarosi populáció a Pilisi klád és a pisznicei populáció és az ősi északi populáció közötti keveredésből származó populáció kereszteződésével alakult ki. Az 5. forgatókönyv szerint a nagymarosi populáció a pisznicei populáció és a két szlovákiai populáció ősi testvérpopulációja (a továbbiakban "ősi szlovákiai populáció") közötti keveredés révén alakult ki. A 6. forgatókönyv szerint a nagymarosi populáció a Pilisi klád és egy hipotetikus kevert populáció keveredésével alakult ki, amely a pisznicei és az ősi szlovák populáció keveredésével jött létre. Ebben a második elemzésben az előzetes beállítások helyesnek bizonyultak, a PCA alapján ítélve, amelyben az első két tengely a variancia 69,8%-át magyarázta (16. Függelék). Az 1. forgatókönyvet a legmagasabb, 0,43-as PP alapján választottuk ki (8. ábra). Az összes többi forgatókönyv PP-je lényegesen alacsonyabb volt, a második legmagasabb a 3. forgatókönyv 0,19-es értéke.



8. ábra Logisztikus regressziós diagram a második ABC elemzésben szimulált forgatókönyvekre (7. Függelék). Az x tengely a valószínűségek kiszámításához használt szimulációk számát mutatja, az y tengely pedig az egyes forgatókönyvek poszterior valószínűségét.

A poszterior prediktív hibaarányok ebben az elemzésben is mérsékelten magasak voltak, 0,412 a közvetlen, és 0,347 a logisztikus megközelítéssel. A modellellenőrzés azt mutatta, hogy a megfigyelt adatpont a szimulált adathalmazok poszterior eloszlásának pontfelhőjébe illeszkedett a PCA-ban, amelyben az első két főkomponens a variancia 67,2%-át magyarázta (17. Függelék). A harmadik ABC elemzésben az előző elemzésekből származó legmagasabb PP-vel rendelkező topológiát tovább részleteztük, azáltal, hogy az ősi populációknak (azaz a fa belső ágainak) külön effektív populációméretet adtunk (2. ábra). A cél itt az elválási idők és az ősi effektív populációméretek becslése volt. A priorok kiválasztása itt is megfelelőnek bizonyult, amit a PCA is bizonyít, amelyben az első két főkomponens a teljes variancia 64,7%-át

magyarázta (18. Függelék). A modellellenőrzés azt is megmutatta, hogy a megfigyelt adatok a szimulált adathalmazok felhőjébe illeszkednek a PCA-ban, amelyben az első két főkomponens a teljes variancia 64,9%-át magyarázta (19. Függelék). A paraméterek poszterior eloszlását becsültük. Az effektív populációméretetek esetében, amikor a populációkat egymással összehasonlítottuk, a becslések meglehetősen összhangban voltak a korábbi, terepen számolt populációméretetekkel (Lendvay és Kalapos, 2014). A két legkisebb populáció, a Kis-Kevély és a Nagymaros esetében volt a legalacsonyabb, 618, illetve 813 a medián effektív populációméret. A legnagyobb medián effektív populációmérettel, 4480-nal a Tordai-hasadék populáció rendelkezett, míg az összes többi populáció esetében ez az érték 3000 és 3500 között volt (9. táblázat). A belső ágak medián effektív populációméretei az időben visszafelé haladva fokozatosan növekedtek, 4020-tól (a Pilis-tető és a Kis-Kevély populációk közös őse) 15600-ig (az összes ismert populáció közös őse). A konfidenciaintervallumok szélesek voltak, különösen az ősi effektív populációméretetek esetében. A becsült elválási idők 194 generációtól (t_2 , azaz a nagymarosi populációt létrehozó keveredési eseménytől) 1500 generációig (t_6 , azaz a többi populációnak a Pilisi kládtól és a Tordai-hasadék populációtól való szétválásának ideje) terjedtek (9. táblázat). A konfidenciaintervallumok mérsékelten szélesek voltak, az elválási események között nagy átfedésekkel. Minden paraméter esetében az RMAE értékek mérsékeltek voltak, 0,172 és 0,453 között mozogtak. Általában alacsonyabbak voltak az effektív populációméretetekre és magasabbak az elválási időkre (9. táblázat).

9. táblázat A demográfiai paraméterek poszterior eloszlásainak becslései a harmadik ABC elemzés eredményei alapján (2. ábra). N: effektív populációméret; t: elválás ideje, generációkban; ra: keveredési ráta; CI: konfidenciaintervallum; RMAE: abszolút hiba relatív mediánja.

Paraméter	Medián	95% CI	RMAE
Bélkő (N1)	3450	1290–4900	0,198
Kis-Kevély (N2)	618	152–976	0,261
Konyári-fennsík (N3)	3280	996–4870	0,236
Nagymaros (N4)	813	326–992	0,202
Pilis-tető (N5)	3370	2090–8650	0,423
Pisznice (N6)	3310	1460–4810	0,198
Pelsőci-fennsík (N7)	3490	1140–4900	0,189
Tordai-hasadék (N8)	4480	2930–4970	0,177
N2b	4020	2130–9200	0,324
N3b	7970	3040–9900	0,172
N1b	11500	1170–19600	0,429
N1c	12200	1430–19600	0,403
N1d	11900	1000–19700	0,453
N1e	15600	2400–19900	0,308
t1	202	26–1200	0,400
t2	194	27–927	0,418
t3	418	45–1640	0,354
t4	908	215–3900	0,321
t5	1210	258–4370	0,310
t6	1500	378–6670	0,332
t7	761	112–4790	0,370
ra	0,46	0,057–0,93	0,232

2.3.4. Diszkusszió

Tanulmányunkban a fokozottan védett, endemikus faj, a magyarföldi husáng (*F. sadleriana*) összes ismert populációjának genetikai diverzitását és szerkezetét vizsgáltuk, egy rövid kitekintéssel a faj *Ferula* nemzetségben való filogenetikai helyzetéről. Új információkkal szolgálunk a faj populációinak genetikai állapotáról, és tanulmányunk azon kevés populációgenetikai tanulmány közé tartozik, amelyek Kárpát-medencei növényekre (Bodor és mtsai., 2010; Tóth és mtsai., 2017, 2019; Malkócs és mtsai., 2019), vagy a *Ferula* nemzetségre (Pérez-Collazos és Catalán, 2008; Pérez-Collazos és mtsai., 2009; Li és mtsai., 2020) fókuszálnak.

Filogenetikai eredményeink arra utalnak, hogy a *F. sadleriana* legközelebbi rokonai a *F. tatarica* és a *F. songarica*, két olyan faj, amelyek az eurázsiai sztyeppe övben fordulnak elő, a *F. tatarica* pedig nyugatra egészen Ukrajnáig terjedt el. További közelrokon taxonok a közép-ázsiai *F. nuda* és a *Ferula canescens* (Ledeb.) Ledeb. Ebből arra következtethetünk, hogy a *F. sadleriana* a legnyugatibb faj ezen leszármazási vonalon belül, legközelebbi rokona, a *F. tatarica* csak a Keleti-Kárpátokon kívül van jelen. Bár az elemzés ereje viszonylag alacsony, mivel csak az nrITS szekvencián alapul, nagy bizonyossággal a legközelebbi rokonai mellé helyezi a *F. sadlerianát*, így filogenetikai keretet ad tanulmányunknak. Ugyancsak a nrITS szekvencia alacsony filogenetikai felbontóképességének tudható be, hogy a *F. sadlerianát* és a *F. songaricát* mindössze egy SNP különíti el, a *F. tatarica* két vizsgált egyede közül egyik a *F. sadleriana*, a másik pedig a *F. songarica* által képviselt ribotípust hordozza. Ez lehetséges, hogy a leszármazási vonalak nem teljes leválogatódásának tudható be. Emellett a nrITS szekvencián alapuló törzsfá a nemzetségben használt genetikai markerek közül a *Ferula* hagyományos taxonómiai kezeléséhez legközelebb álló topológiát mutatja (Panahi és mtsai., 2015).

Az SSR adatsorunk a *F. sadleriana* populációk genetikai variabilitásának vizsgálatára való alkalmasságára összpontosító feltáró elemzések eredményei azt mutatják, hogy bár egyes populációk némileg alulmintázottak, az általunk használt lókuszok száma megfelelő.

Bár a null allélok jelenléte gyakori mind a lókuszok, mind a populációk között, a FreeNA-ban alkalmazott ENA korrekciós módszerrel úgy véljük, hogy a null allélok hatását tudtuk kezelni, és nem befolyásolják azokat az elemzéseket, ahol ezt a módosított adatsort használtuk.

Valamennyi populáció viszonylag magas genetikai diverzitást mutatott, a várható heterozigotizációk más hosszú életű, endemikus fajokhoz hasonlóak a mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálatok alapján (pl. Freville és mtsai., 2001; Radosavljević és mtsai., 2012; Mouhaddab és mtsai., 2017; Vardareli és mtsai., 2019). A *Ferula* nemzetségen belüli összehasonlítás során a legtöbb tanulmány sokkal kisebb genetikai diverzitást mutat (Marchi és mtsai., 2003; Pérez-Collazos és Catalán, 2008; Dettori és mtsai., 2016; Tajbakht és mtsai., 2018), még azok is, amelyek olyan széles körben elterjedt taxonokat vizsgálnak, mint a *Ferula communis* L. és a *Ferula assa-foetida* L. Annak ellenére, hogy endemikus faj, és jóval kisebb populációmérettel és elterjedéssel rendelkezik, mint a *F. sadleriana*, a *F. sinkiangensis* rendelkezik a legmagasabb várható heterozigotizációs értékkel a nemzetségen belül (Li és mtsai., 2020), ennek ellenére még mindig jóval alacsonyabb, mint a mi vizsgálatunkban a *F. sadleriana* esetében találtak. Ezt annak tulajdonítjuk, hogy az összes többi tanulmány (Li és mtsai., (2020) kivételével) különböző típusú genetikai markereket használt, ami torzításra hajlamossá teszi az ilyen összehasonlításokat, mivel a mikroszatellitok általában sokkal magasabb várható heterozigotizációt eredményeznek, mint a domináns markerek, például az AFLP-k (Freville és mtsai., 2001; Maguire és mtsai., 2002; Gaudeul és mtsai., 2004). A *F. sadleriana* esetében megfigyelt nagy genetikai diverzitás a faj hosszú élettartamának tulajdonítható, és egy erősen exogám szaporodási rendszerre utal, amely kiegyenlíti a kis populációméret hatását, ugyanis a hosszú élettartam a generációk keveredésével jár, így csökkenti a ritka allélok elvesztésének valószínűségét (Lippé és mtsai., 2006; Weiser és mtsai., 2013). A hosszú élettartamú (Riley és mtsai., 2010) és exogám fajok (Karron, 1991) magasabb genetikai diverzitása jól ismert jelenség, és az exogámia széles körben elterjedt az Apiaceae családban, és a *Ferula* nemzetségben is

beszámoltak róla (Pérez-Collazos és Catalán, 2008; Yaqoob és Nawchoo, 2016). Meglepő eredmény, hogy a genetikai diverzitás nem arányos a populáció méretével. A Pilis-tetői populáció például, bár a legutóbbi összeírás alapján ez a legnagyobb populáció, kevesebb genetikai diverzitást rejt, mint a jóval kisebb populációk, például a két szlovákiai. Másrészt, a második legnagyobb populáció, a Torda-hasadék összességében magas genetikai diverzitást mutatott, míg a két legkisebb populáció, a Kis-Kevély és a Nagymaros általában alacsony genetikai diverzitást mutatott, ami arra utal, hogy a Pilis-tetői populáció alacsony genetikai diverzitása inkább kivétel. Az *Fst* alapú elemzések azt mutatják, hogy az egymáshoz földrajzilag közel eső populációk genetikailag kevésbé differenciáltak, bár ez nem vezethető vissza kizárólag az IBD-re. Erre az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a populációk olyan hosszú időn keresztül vannak izolálva egymástól, hogy genetikailag eléggé eltávolodtak ahhoz, hogy az IBD egyértelmű mintázatát elfedjék. A Kis-Kevély populáció *Fst* értékei egyértelmű példái az alapító hatásnak, vagyis annak, hogy ezt a populációt a Pilis-tetői populációból származó egyedek alapították viszonylag recensén (vagy természetes úton, vagy természetvédelmi szakemberek általi betelepítés eredményeként), és az alapító egyedek kis száma vezetett az összes többi populációtól való jelentős eltávolodáshoz.

A STRUCTURE elemzés eredményei nemcsak a populáció szerkezetét, hanem a viszonylag recens természetvédelmi erőfeszítések genetikai örökségét is megmutatják. Ez az elemzés megerősíti a természetvédelmi erőfeszítésekkel kapcsolatos anekdotikus bizonyítékok egy részét, ugyanakkor olyan genetikai bizonyítékokat is feltár, amelyek erősen ellentmondanak ezeknek. A populációk földrajzilag meglehetősen strukturáltak, ahogy haladunk egyre feljebb a K értékekben, a földrajzi klaszterek egymás után szétválnak, míg $K=7$ -nél már csak a Pilis-tető és a Kis-Kevély kerül egy csoportba, valószínűleg a Kis-

Kevély populáció közelmúltbeli, a Pilis-tetőről való megtelepedése miatt. Ez ellentétben áll a (Somlyay, 2007) által részletezett anekdotikus bizonyítékkal, amely szerint a Kis-Kevély populáció az MTA ÖBKI Botanikus Kert *ex situ* természetvédelmi programjából származik, melyben az egyedek a Bélkő populációból származnak. Úgy tűnik, hogy a nagymarosi populáció szenvedte meg leginkább a rosszul tervezett betelepítéseket, mivel a Tordai-hasadék populáció csoportjának kivételével minden klaszterből mutat genetikai jegyeket. Földrajzi elhelyezkedése alapján azt gondolnánk, hogy ez a populáció szorosabb kapcsolatot mutat az Északi kládhoz, mivel a Duna valószínűleg erős barrierként viselkedik e faj esetében. Ezekből az eredményekből azt feltételezzük, hogy a nagymarosi populáció eredeti genetikai összetétele hasonló volt az Északi kládéhoz, de ezt elfedte a pisznicei populációból származó viszonylag nagymértékű betelepítés. A Bélkő populáció mutatja be a legjobban a korai természetvédelmi kezelések kaotikus jellegét, mivel három olyan egyedet tartalmaz, amelyek valószínűsíthetően három különböző populációból (Tordai-hasadék, Pisznice és Pilis-tető) származó nagymértékű keveredést mutatnak. Ez a populáció önmagában is megerősíti a telepítésekről szóló anekdotikus jelentések nagy részét. A Tordai-hasadékból származó egyed valószínűleg a pisznicei populációból származik, ahová a Tordai-hasadékból történt betelepítés, bár tanulmányunkban nem találtunk konkrét bizonyítékot ennek igazolására. Erre az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a Tordai-hasadékból a Pisznicébe történő betelepítés után a Pisznicéről a Bélkőre is történt betelepítés, amely a Tordai-hasadékból is hordozott genetikai anyagot. Ezt követően a Tordai-hasadékból származó egyedek nem hagytak jelentős genetikai nyomot a Pisznicai populációban. A két szlovákiai populáció közelsége magyarázza a nagymértékű keveredésüket. Bár valószínűleg nincs

folyamatos génáramlás a két populáció között, a véletlenszerű események fenntarthatják a keveredés alacsony szintjét.

Demográfiai elemzések

A DIYABC segítségével végzett demográfiai elemzések eredményei több fontos aspektusa van. Az ősi populációk méretének fokozatos növekedése az időben visszafelé haladva arra utal, hogy a *F. sadleriana* a múltban elterjedtebb volt, és hogy a jelenlegi populációk refugiális helyzetben vannak, amelyek egy nagy, ősi populáció széttöredezéséből keletkeztek. Az effektív populációméretetek nagyrészt összhangban vannak a terepen számoltakkal, bár a kisebb populációk esetében jóval magasabbak, mint a terepi adatok, míg a Pilis-tetői populáció esetében valamivel alacsonyabbak. Ez tükrözi a populációkon belüli genetikai diverzitás szintjének mintázatát, vagyis azt, hogy a kis populációk kis méretük ellenére jelentős genetikai változatosságot rejtenek magukban. Érdekes módon a nagymarosi populációra vonatkozóan két, meglehetősen ellentmondásos terepi adat áll rendelkezésre ugyanabból az időszakból. Míg Lendvay és Kalapos, (2009) kevesebb mint 50 egyedről számol be, addig (Nagy és mtsai., 2014) több mint 1000 egyedről, ami a faj harmadik legnépesebb populációjává teszi, és ami magyarázatot adhat az általunk talált viszonylag magas genetikai diverzitásra. Ha generációs időnek két évet veszünk, akkor mind a Kis-Kevély, mind a Nagymaros populáció alapításának alsó konfidencia szintje az 1970-es és 1980-as évek környékére esik, ami megyegyezik a rosszul dokumentált természetvédelmi kezelések idejével. A Kis-Kevély populációval ellentétben, amelyet nemrégiben fedeztek fel (Somlyay, 2007), a nagymarosi populációról a 19. század óta vannak jelentések (Reuss, 1853). A nagymarosi populációról úgy gondolták, hogy az 1980-as években kipusztult (Nagy és mtsai., 2014), ez vezethetett a más populációkból történő újratelepítéséhez. A betelepítéseket követően a túlélő

populáció keveredett a betelepített növényekkel. Mindazonáltal a generációs idők hosszában rejlő bizonytalanság és az elválási idők becslésének nagy konfidenciaintervallumai miatt nem zárhatjuk ki e populációk természetes eredetét. A szlovákiai populációk szétválása becslések szerint nem túl régen történt, de mivel nincs emberi beavatkozásra utaló bizonyíték, a közelségük és a természetes génáramlás nagyobb valószínűsége miatt arra következtetünk, hogy a természetes eredet a valószínűbb. A többi 4 populáció keletkezési ideje legalább néhány ezer évvel ezelőttre tehető, és az élőhelyeik a történelmi klímaváltozások miatti természetes folyamatoknak tulajdonítható. Becsléseink szerint az összes vizsgált *F. sadleriana* populáció legközelebbi közös őse legfeljebb 6670 generációval ezelőtt élt. Ha figyelembe vesszük a generációs idők kedvezőtlenebb körülmények miatti növekedését, akkor ezt az utolsó jégkorszak idejére vagy az azt követő időszakra tehetjük. Sajnos ez az elemzés nem alkalmas arra, hogy a faj eredetének idejére megbízható becslést tehessünk.

Természetvédelmi vonatkozások

Megállapítottuk, hogy a *F. sadleriana* kis populációmérete ellenére nagy genetikai diverzitással rendelkezik. A populációk közötti genetikai differenciálódás általában mérsékelt, de a földrajzilag közel fekvő populációk között alacsony. Eredményeink rávilágítanak a fajon végzett, nem dokumentált *ex situ* természetvédelmi kezelésekre is. Összességében ezek az erőfeszítések nem voltak kellő alapossággal megtervezve, és a genetikailag és földrajzilag is egymástól távoli populációk keveredéséhez vezettek. A Kis-Kevély populáció alapítása lényegesen jobb döntés volt (ha egyáltalán ezeknek az erőfeszítéseknek az eredménye), bár ez is genetikai sodródást eredményezett, valószínűleg a kis alapító populáció mérete miatt. Mindezek fényében a populációk és élőhelyeik helyben történő megőrzését szorgalmazzuk, legeltetés

kizárásával és a kirándulók számára információs táblák kihelyezésével, vagy a túraútvonalak ezen élőhelyektől való eltérítésével. Mivel a legtöbb populáció magas genetikai diverzitású, különösen a genetikailag differenciálódott populációk mesterséges keverését nem javasoljuk. Fontos az összes, vagy a legtöbb populáció védelme, mivel ezek genetikailag elkülönülő egységeket képviselnek. Fontos továbbá a populációk rendszeres megfigyelése, mivel a *F. sadleriana* populációnagysága évente nagymértékű ingadozást mutat, és kedvezőtlen körülmények esetén képes nyugalmi állapotban is túlélni (Lendvay és Kalapos, 2014), ami a populáció méretének alulbecsléséhez, majd elhamarkodott természetvédelmi kezelési gyakorlatokhoz vezethet.

2.4. A pontuszi sztyeppe eddig ismeretlen, kriptikus zsálya (*Salvia* L.) fajának azonosítása és jellemzése morfológiai és genomi módszerekkel

2.4.1. Irodalmi előzmények

A zsályák (*Salvia* L.) nemzetsége az ajakosok (Lamiaceae) családjának legfajgazdagabb, és a virágos növények egyik legnagyobb nemzetsége, mintegy 980 fajjal (Will és Claßen-Bockhoff, 2017), amely napjainkban is folyamatosan gazdagodik új fajok leírásával (Celep és mtsai., 2015; García és Zamudio, 2015; Martínez-Gordillo és mtsai., 2016; Martínez-Ambriz és mtsai., 2019; Wei és mtsai., 2019). A nemzetség szinte az egész világon elterjedt, négy kontinensen találhatóak zsályákban rendkívül fajgazdag területek. Ezen felül a nemzetség rendkívüli változatosságot mutat a fajok élőhelyi preferenciája, ökológiai igénye, és beporzásbiológiája tekintetében (Harley és mtsai., 2004).

A nemzetség egyik fő azonosító bélyege a porzók emelőszerkezet-szerű mozgása (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003). Ezen mechanizmus működését a *Salvia* virágban található két aszimmetrikus porzó teszi lehetővé, ahol mindkét

porzó csatlója megnyúlt, elválasztva egymástól a két portokot. A felső (abaxiális) csatló két termékeny portokfelet tartalmaz, míg az alsó (adaxiális) csatló gyakran steril, és a nektárhoz való hozzáférést korlátozó, kiszélesedett képletet alkot (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003). A rugalmas porzók porzószálnak csúcsa körül a csatlók reverzibilisen képesek megbillenni (Troll, 1929). Amikor a beporzást végző rovar (leggyakrabban méh), vagy madár (leggyakrabban kolibri) az alsó csatlót befelé tolja, hogy elérje a nektárt, az emelőszerkezet mechanizmusnak köszönhetően a felső csatló lefelé mozdul el, és a portokot a beporzóhoz érinti, ezáltal elhelyezve a pollent a beporzó egy, a virág morfológiája által jól behatárolt testrészére (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003, 2004).

A zsályák virágát széleskörűen kutatják ezen egyedülálló emelőszerkezet mechanizmus virág–beporzó kölcsönhatásokban betöltött szerepe miatt (Müller, 1873; Zalewska, 1928; Werth, 1956; Hruby, 1962; Baikova, 1999, 2002, 2004; Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003, 2004; Reith és mtsai., 2007; Wester és Claßen-Bockhoff, 2007). Az emelőszerkezet mechanizmus biztosítja a mechanikai (prezigotikus) izolációt az egyébként interfertilis *Salvia* fajoknál, így megakadályozva a hibridizációt – ez azért rendkívül fontos, mert korai hibrid generációk (pl. F_2 és F_3 generációk) életképessége és termékenysége általában alacsonyabb, mint a szülő fajoké, az adaptív génkombinációk felbomlása miatt (Dobzhansky, 1937). A porzók emelőszerkezet-szerű mozgása kulcsfontosságú szerepet töltött be e rendkívül fajgazdag nemzetség evolúciós radiációi során, és a fajképződés egyik fő mozgatórugójaként azonosították, ugyanis a nemzetségben megfigyelhető nagyobb radiációs események a billenő-mechanizmus jelenlétével korrelálnak (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003, 2004). A zsályákéhoz hasonló, rugalmas porzó emelőszerkezet mechanizmusok csak ritkán alakultak ki a hajtásos növények körében. Hasonlóan működő, azonos

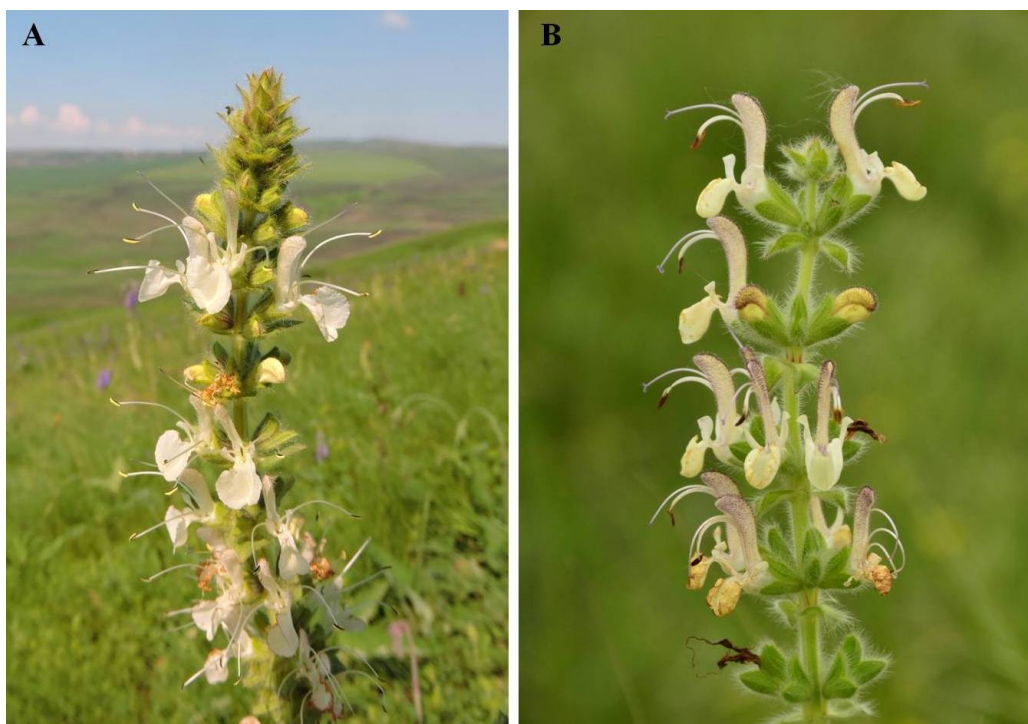
funkciójú mechanizmus megfigyelhető több *Calceolaria* L. (Calceolariaceae) fajban is, mely nemzetségben kétszer, egymástól függetlenül fejlődtek ki (Trapp, 1956a; Sersic, 2004), valamint az Orobanchaceae családba tartozó *Pseudosopubia obtusifolia* Engl. (Trapp, 1956b) és a Zingiberaceae családba tartozó *Roscoeia purpurea* SM. fajokban is (Troll, 1929).

Az elmúlt két évtized során több tanulmány is bizonyította e nagy nemzetség parafiletikusságát (Walker és mtsai., 2004; Walker és Sytsma, 2007; Will és Claßen-Bockhoff, 2014, 2017), és kimutatták, hogy az emelőszerkezet mechanizmus három (Walker és Sytsma, 2007; Drew és Sytsma, 2012), vagy öt alkalommal (Will és Claßen-Bockhoff, 2017) egymástól függetlenül alakult ki, ami, bár az egész nemzetségre nézve azonos eredetű, az egyes monofiletikus csoportok között minden esetben konvergencia eredménye, mind morfológiai, mind funkcionális szempontból. E tanulmányok következményeként a *Salvia* nemzetség pontos körülírását illetően folyamatos vita zajlik, és két fő rendszertani kezelést javasoltak, mindkettő korábbi, átfogó molekuláris és morfológiai elemzéseket tartalmazó, nagyszámú taxont felölelő tanulmányokon alapul: az első javaslat a *Salvia* nemzetség megtartása további 15 faj beolvasztásával, amelyek jelenleg a *Dorystaechas* Boiss. & Heldr, *Meriandra* Benth., *Perovskia* Kar., *Rosmarinus* L. és *Zhumeria* Rech.f. & Wendelbo nemzetségekre tartoznak (Drew és mtsai., 2017), míg a másik javaslat e nagy nemzetség hat kisebb nemzetségre való felosztását javasolja (Will és Claßen-Bockhoff, 2017). Egy recens tanulmányban azt vizsgálták, hogy e nagy nemzetség diverzifikációját hogyan befolyásolták az elterjedési terület-, biom-, illetve beporzóváltási események, és bizonyítékokat találtak arra, hogy a *Salvia*-ra jellemző különleges beporzási mechanizmuson kívül más folyamatok is befolyásolják a radiációs eseményeket (Kriebel és mtsai., 2019).

A *Salvia* nemzetség körében végzett filogenetikai vizsgálatok klasszikus filogenetikai módszerekre támaszkodtak (azaz plasztisz- és sejtmagi genomból származó markerek Sanger-szekvenálására), amelyek képesek voltak a nagyobb leszármazási vonalak filogenetikai elkülönítésére, de általában nem tudtak megfelelő felbontást elérni a közelrokon fajok közötti viszonyok tisztázásához (Walker és Sytsma, 2007; Takano és Okada, 2011; Jenks és mtsai., 2013; Li és mtsai., 2013; Walker és mtsai., 2015; Will és Claßen-Bockhoff, 2017; Hu és mtsai., 2018). A genomi megközelítések az utóbbi esetben általában képesek ezen viszonyok feltárására (Rannala és Yang, 2008; Lemmon és Lemmon, 2013; McCormack és mtsai., 2013), ahogy azt már kimutatták a *Salvia* nemzetségben (Kriebel és mtsai., 2019). Az RRL módszerek a költségek, és a befektetett munka szempontjából is hatékony megközelítések a nem modellszervezetek nagy felbontású genomi adatainak előállítására (Davey és mtsai., 2011), amelyek jellemzően több ezer SNP-et szolgáltatnak filogenomikai vizsgálatokhoz (Leaché és Oaks, 2017). Az RRL megközelítések közül az egyik leghatékonyabb módszer a RADseq, amelyet eredetileg az RRL megközelítések egy változataként tartottak számon (Miller és mtsai., 2007; Baird és mtsai., 2008), de az elnevezést nemrégiben tágabb értelemben kezdték el alkalmazni, melyben minden olyan RRL módszert magában foglal, amely restrikciós enzimeket használ a genomban található lókuszok újgenerációs szekvenáláshoz való kiválasztására (Andrews és mtsai., 2016). A RADseq eredeti változata (más néven sdRAD, lásd Rivera-Colón és mtsai., 2021) egy hatékony és megbízható módszer Puritz és mtsai., 2014; Rochette és mtsai., 2019), amelyet sikeresen alkalmaztak a közelmúltban elvált taxonok közötti evolúciós kapcsolatok tisztázására (Etter és mtsai., 2012; Reitzel és mtsai., 2013; Hipp és mtsai., 2014; Tripp és mtsai., 2017; Bateman és mtsai., 2018; Paetzold és mtsai., 2019; Sramkó és mtsai., 2019; Karbstein és mtsai., 2020).

Az adatelemzési módszerekben elért újítások több szempontból előmozdították a RADseq adatok elemzését, többek között a faji szintű lehatárolás (Leaché és mtsai., 2014; Pante és mtsai., 2015) és a fajok elválási idejének SNP-adatokból történő becslésének kifejlesztésével (Stange és mtsai., 2018).

A Dobrudzsában (a „Scythia Minor” vagy „Kis-Székíta” néven ismert történelmi régió, amely a mai Délkelet-Romániát és Északkelet-Bulgáriát foglalja magába) végzett terepmunkánk során, amelyet a pontuszi sztyepp zóna részeként kiterjedt füves élőhelyek jellemeznek (lásd Kajtoch és mtsai., 2016: 1. ábra), találtunk egy *Salvia* taxont, amely habitusában hasonlít az osztrák zsályához (*S. austriaca* Jacq.), de alapjaiban eltérő emelőszerkezet mechanizmussal rendelkezik (9. ábra). Ez a szokatlan alak a beporzó rovar hátára helyezi a virágport, a porzók függőleges elmozdulásával (a továbbiakban „függőleges porzóállású *Salvia* alak, vagy *Salvia* FVPD – Form With Vertical Pollen Deposition”), míg a *S. austriaca* s.s. a rovar potrohának oldalára helyezi a pollent, megközelítőleg vízszintes billenő mozgást végezve (azaz vízszintes porzóállás).



9. ábra *Salvia austriaca* (A) és az általunk terepen megfigyelt függőleges porzóállású *Salvia* alak (*Salvia* FVPD) (B).

Az osztrák zsályához hasonló, vízszintes porzóállás figyelhető meg feltételezett közeli rokona, a *Salvia staminea* Montbret & Aucher ex Benth. [= *Salvia armeniaca* (Bordz.) Grossh.] esetében is, amelynek elterjedési területe Kelet-Törökország, Irán és a Transzkaukázus száraz hegyi sztyeppéire terjed ki (Pobedimova, 1954; Hedge, 1982; Galstyan, 2021). A fenti források szerint mindössze ez a két faj képviseli az *Austriacae* Pobed. fajsort (*Plethiosphace* Benth. fajcsoport, *Sclarea* (Moench) Benth. alnemzetség). Ezzel szemben (Bentham, 1848), majd Menithkiy, (1987) más jellegek alapján a *S. austriacát* a *Plethiosphace* , a *S. stamineát* pedig az *Aethiopis* Benth. fajcsoportba sorolta. Tekintettel a porzók emelőszerkezet mechanizmusának kiemelt jelentőségére a *Salvia* nemzetségben megfigyelhető fajképződési folyamatokban (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003, 2004; Will és Claßen-Bockhoff, 2017), a *Salvia* FVPD taxonómiai hovatartozását a következő

kérdések vizsgálatával teszteltük: (i) mik a *Salvia* FVPD elterjedésének földrajzi határai; (ii) mennyire állandó a *S. austriaca* és a *Salvia* FVPD közötti, virágmorfológiában megfigyelhető különbség a; és (iii) mi a genetikai viszony a *S. austriaca* és a *Salvia* FVPD taxonok között az sdRAD módszerből származó genomi adatokon végzett Bayes-faktor alapú faji szintű lehatároló elemzés eredményének fényében. Megvitatjuk továbbá a *Salvia* FVPD és a Nyárády, (1942) által Délkelet-Romániából leírt *Salvia austriaca* Jacq. var. *perlanata* Nyár. közötti kapcsolatot.

2.4.2. Anyag és módszer

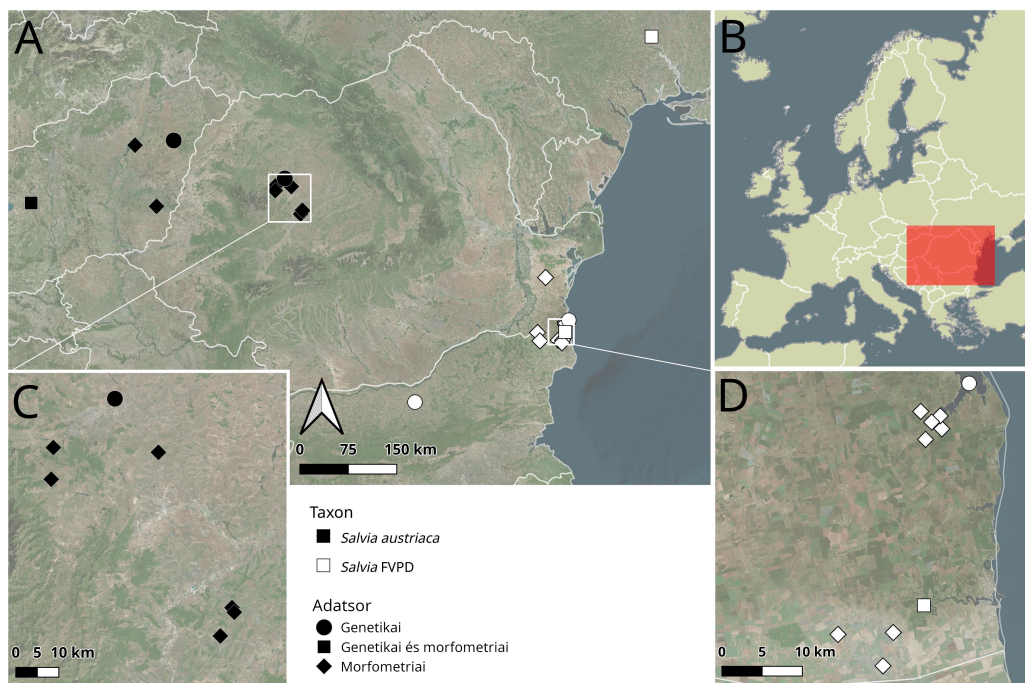
Az elterjedési adatok gyűjtése

A virágok törékeny makrostruktúráit gyakran lehetetlen herbáriumi példányokon vizsgálni, mivel a préselés gyakran eltünteti, vagy megváltoztatja ezek térbeli elhelyezkedését (Chen és mtsai., 2018). Tekintettel a *Salvia* virágok törékenységére, az előfordulási adatok gyűjtését olyan nyilvános adatbázisokra korlátoztuk, amelyek az előfordulási adatok mellett a növényekről készült fotókat is tartalmazzák. Ennek érdekében globális (www.inaturalist.org; elérés: 2021. november) és lokális (www.botanikaiforum.com; www.naturgucker.de; www.plantarium.ru; elérés: 2021. november) képtárakat vizsgáltunk át. *S. austriaca* néven regisztrált példányokról kerestünk közeli képeket, és ellenőriztük az emelőszerkezet mechanizmus típusát, azaz, hogy a porzók függőleges vagy vízszintes irányban nyúlnak ki a virágból. Egy adott fotót csak akkor vettünk figyelembe, ha az rendelkezett georeferált elterjedési adatokkal, illetve ha a porzó felső csatlójának pozíciója egyértelműen azonosítható volt. A nagy pontossággal lokalizálható megfigyeléseket összegyűjtöttük, georeferáltuk, és a QGIS v.3.4 programban (www.qgis.org) térképet készítettünk belőlük. Az egyes megfigyelések földrajzi koordinátáit lásd a 20.

Függelékben. A sztyeppövezet kiterjedését a térképünkön (Lavrenko és mtsai., 1991) alapján jelöltük.

Mintavétel a morfometriai vizsgálatokhoz

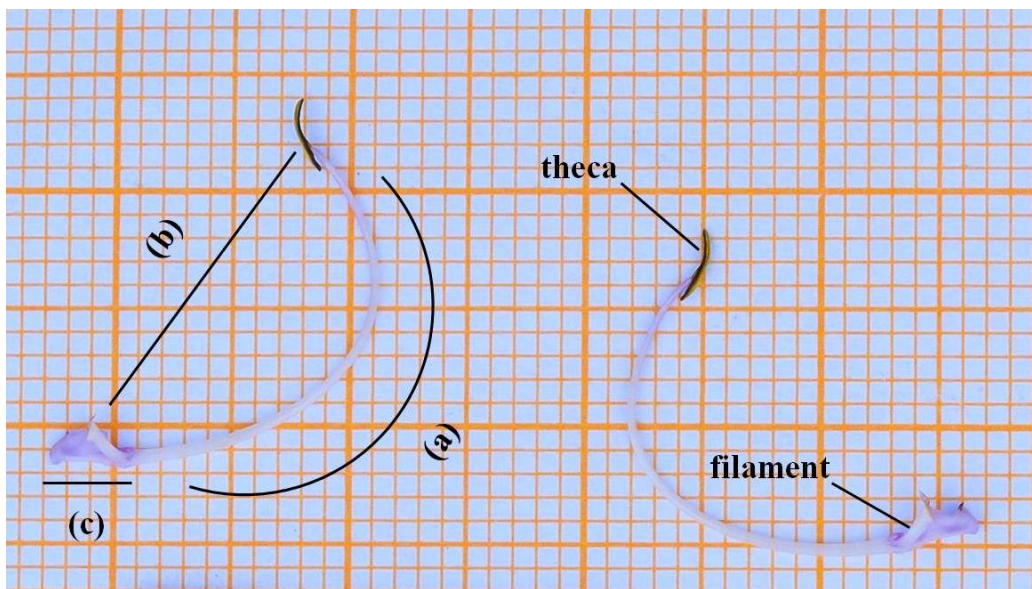
A morfológiai méréseket összesen 64 élő *Salvia* példányon végeztük: 35 *Salvia* FVPD példányról (nyolc romániai és egy ukrainai populációból) és 29 *S. austriaca* példányról (hat romániai és három magyarországi populációból) (10. ábra). Az egyes vizsgált populációk egymástól több mint 1 km távolságra helyezkedtek el, és valamilyen földrajzi akadály, például kiterjedt erdő, folyó vagy tó választotta el őket egymástól.



10. ábra A: A mintázott *Salvia* populációk területi eloszlása. A vizsgált területet piros színnel van kiemelve Európa térképén (B), valamint az erdélyi (C) és a dobрудzsai (D) lelőhelyek kinagyítva.

Minden példányon négy vegetatív tulajdonságot mértünk: a szár magasságát, a szárlevél-párok számát, és a tölevelek levéllemezének és

levélnyelének hosszát. Ezen felül minden példányról egy és hat közötti virágot gyűjtöttünk, amelyeket a helyszínen milliméterpapíron fotóztuk. Ezt követően a virágokból kivágtuk a porzókat, és ezeket is milliméterpapírra helyezve lefotóztuk. A digitalizált anyagon az ImageJ (Rueden és mtsai., 2017) szoftver segítségével hat kvantitív jelleget mértünk (a tulajdonságokat (Thimm, 2008) alapján választottuk ki): az abaxiális csatló hossza, a csatló töve és a portokok közötti távolság, az adaxiális csatló hossza (11. ábra), a virág hossza, a virág magassága, és a csésze hossza.



11. ábra Mért kvantitatív virágjellegek: az abaxiális csatló hossza (a), a porzósál csúcsa és a portok közötti távolság (b), az adaxiális csatló hossza (c). Theca: portok; filament: porzósál. Fotó: Gabriel Gigea; utómunka: Mátis Attila.

A morfometriai adatok statisztikai elemzése

A *S. austriaca* és a *Salvia* FVPD között a vegetatív jellegeket lineáris modellek segítségével hasonlítottuk össze, kivéve a szárlevelek számát, ahol általánosított lineáris modellt használtunk. A virág jellegeket lineáris kevert modellek segítségével hasonlítottuk össze. Minden jelleghez külön modellt

építettünk, melyekben a jelleget függő változóként, a taxont magyarázó változóként, a mintázott egyedek pedig véletlen hatásként szerepeltették. A lineáris kevert modelleket az *lme4* csomag lmer függvényével futtattuk (Bates és mtsai., 2015). A modellépítést a modell validálása követte a reziduálisok normál eloszlásának és homogenitásának vizsgálatával. A *S. austriaca* és a *Salvia* FVPD közötti, több jellegben megfigyelhető morfológiai különbség szemléltetésére hat virág jellegen főkomponens-elemzést (PCA) végeztünk, csak azokon az egyedeken, amelyeknél ezekben a jellegekben nem volt hiányzó adat, majd az egyedeket az első két főkomponens-tengelyen ábrázoltuk a *factoextra* (Kassambara és Mundt, 2019) és a *FactoMineR* (Le és mtsai., 2008) csomagok segítségével. A PCA diagramokat a *ggplot2* (Wickham, 2016) csomag segítségével készítettük. Minden statisztikai elemzést az R v.3.6.0 környezetben végeztünk (R Core Team, 2019).

DNS kivonás, szekvenálás és variáció analízis (SNP calling)

A genetikai elemzésekhez a *Salvia* FVPD négy, és a *S. austriaca* három populációjából gyűjtöttünk mintákat (10. ábra, 21. Függelék). A bókoló zsálya (*Salvia nutans* L.) két populációját, valamint a ligeti (*Salvia nemorosa* L.) és a mezei zsálya (*Salvia pratensis* L.) egy-egy populációját (10. ábra, 21. Függelék) kulcsoportként használtuk fel, azért, hogy a segítségükkel a céltaxonjaink közötti, és ezen széles körben elfogadott, faji szinten elkülönített taxonok közötti filogenetikai távolságot összehasonlítsuk. Minden populáció egy, vagy két egyedének leveléből vettünk mintát terepen, melyeket szilikagélben szárítottuk és tároltuk. A szilikagélben szárított mintákból a genomi DNS-t az E.Z.N.A. Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-tek, Inc., GA, USA) segítségével vontuk ki. A genomi DNS kivonatokat minőségét 1%-os agaróz

gélén ellenőriztük, és mennyiségét Qubit 3.0 fluorométerrel (ThermoFisher Scientific, Inc., MA, USA) mértük meg.

A RADseq könyvtár készítésénél Paun és mtsai., (2016) és Bateman és mtsai., (2018) által leírt protokollt követtük. A *Salvia* fajok viszonylag kis genomméretére való tekintettel (Leitch és mtsai., 2019) a kezdeti restrikciós emésztési lépésben egyedenként 210 ng DNS-t használtunk a relatíve gyakran hasító PstI enzimmal (New England Biolabs, USA). A P1 adapterekkel ligált DNS fragmenteket Bioruptor Pico (Diagenode, Belgium) berendezéssel szonikáltuk öt cikluson keresztül, 30 s „be”, 30 s „ki” állapotban, nagy teljesítményre beállítva. A kész könyvtárat az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd. (Magyarország) segítségével szekvenáltattuk Illumina NextSeq platformon, 150 bp-os egyirányú (single end) olvasatokat adó „mid-output” kit segítségével.

Az olvasatokat a STACKS v.2.2 szoftver „process_radtags” folyamatrendszer segítségével demultiplexáltuk és szűrtük (Catchen és mtsai., 2011). A demultiplexálás és szűrés után egyedenként átlagosan 1,05 millió (szórás=0,29) olvasat maradt. Az olvasatokat ezután a *Salvia splendens* Ker Gawl. (Dong és mtsai., 2018) genomjára illesztettük a BWA v.0.7.12 (Li és Durbin, 2009) program segítségével, alapértelmezett beállítások mellett. Az illesztett olvasatokat a „ref_map.pl” szkript segítségével dolgoztuk fel, és a STACKS v.2.2 program „populations” moduljával lókuszonként egy véletlenszerűen kiválasztott SNP-et exportáltunk. Végül a VCFtools v.0.1.13 (Danecek és mtsai., 2011) segítségével csak azokat az SNP-eket tartottuk meg, amelyek az egyedek legalább 80%-ában megtalálhatók voltak, így összesen 2911 független SNP-et kaptunk.

Filogenomikai elemzés, faji szintű lehatárolás és az elválási idők becslése

A mintáink közötti filogenetikai és rendszertani kapcsolatokat három megközelítéssel vizsgáltuk: (1) ML filogenetikai törzsfát rekonstruáltunk a RaxML v.8.2.12 szoftverrel (Stamatakis, 2006); (2) többváltozós elemzéssel vizsgáltuk a minták között megfigyelhető genetikai struktúrát az *adeget* R-csomagban alkalmazott DAPC révén ; (3) Bayes-faktor alapú faji lehatárolást (BFD) végeztünk (Leaché és mtsai., 2014) a BEAST v.2.5.0 programban (Bouckaert és mtsai., 2014) található SNAPP v.1.4.2 (Bryant és mtsai., 2012) csomag segítségével; és szintén a SNAPP-ben, koaleszcencia alapú, datált törzsfát rekonstruáltunk. Mivel az ML módszerrel a genomban elszórtan található SNP-eket csak az „ascertainment bias correction” beállítás mellett lehet használni, az R-ben található *phrynomics* csomag (<https://github.com/bbanbury/phrynomics.git>; letöltve: 2020. január 11.) segítségével eltávolítottuk az invariáns SNP-eket az adatsorból (1884 SNP-et tartottunk meg). A RaxML elemzést ezen az adathalmazon futtattuk le a GTR+CAT molekuláris evolúciós modell és a -V opció alkalmazásával (Stamatakis, 2006). A kapott filogenetikai törzsfá támogatottságát nem parametrikus bootstrap módszerrel vizsgáltuk, a RaxML automatikus beállításának használatával (azaz a BS lépéseket konvergálásig folytattuk).

A K-közép klaszterelemzést és a DAPC-t a genetikai struktúrára feltárására használtuk, annak érdekében, hogy *a priori* csoportokat határozzunk meg a későbbi elemzésekhez. A K-közép klaszterelemzéshez az összes főkomponens-tengelyt használtuk, és a legalacsonyabb BIC pontszámot elérő négy csoportosítást (K=4–7) választottuk ki. A DAPC elemzésbe a pontszámokból következtetve csak az első négy főkomponenst vontuk be, hogy

elkerüljük a túlilleszkedést, majd az első két diszkriminancia függvényt tartottuk meg.

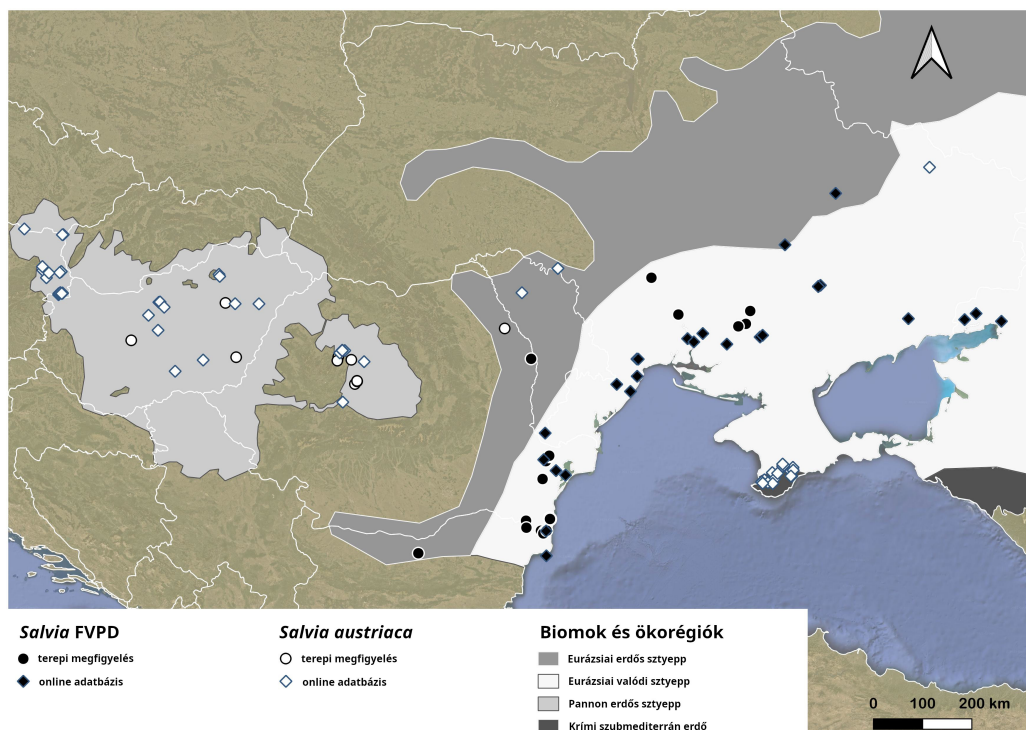
Ezután a „*S. austriaca* csoporton” (azaz a *S. austriaca* s.s.-n és a *Salvia* FVPD-n) belüli faji szintű elkülönítés modelljeit hasonlítottuk össze a BFD módszerrel. A nullmodellünkben a „*S. austriaca* csoporton” belül a két morfológiai csoportba tartozó összes egyedet ugyanannak a fajnak tekintettük, míg az alternatív modellben a két morfológiai csoportot külön fajnak vettük. Összesen négy „path sampling” elemzést futtattunk le, két-két független ismétlést mind a null-, mind az alternatív modellel, $\alpha=0,3$ alkalmazásával, 200 000 MCMC ismétlésen keresztül, 20%-os burn-in, 10 000 pre-burn-in, és futásonként 100 lépéssel. Az alternatív modellekhez kiszámítottuk a Bayes-faktort ($2\ln BF$) a becült marginális valószínűség értékekből ($\ln MLE$), és leírása alapján összehasonlítottuk őket a nullmodellekkel.

A datált törzsfa rekonstrukcióhoz a SNAPP-et a Stange és mtsai. (2018) által leírt beállításokat alkalmazva futtattuk le. Két 1 000 000 iterációból álló futtatást végeztünk, minden 500. után mintát véve. A SNAPP bemeneti fájljainak létrehozásához M. Matschiner „snapp_prep.rb” Ruby szkriptjét használtuk (https://github.com/mmatschiner/snapp_prep, letöltve: 2020. január 5.). A másodlagos datáláshoz a törzsfa gyökerére normál eloszlású priort helyeztünk, melynek átlaga a Kriebel és mtsai. (2019) által becült, a *S. austriaca*, *S. nutans* és *S. pratensis* legközelebbi közös ősének ideje alapján 3,88 millió (offset=0,2, szórás=1) évvel ezelőttre esik. Az összes SNAPP elemzés konvergenciáját a Tracer v.1.6 szoftverben (Rambaut és Drummond, 2013) az ESS értékek és nyomvonal-diagramok (trace plot) alapján értékeltük.

2.4.3. Eredmények

A *Salvia austriaca* csoport taxonjainak elterjedése

A *S. austriaca* csoport (*S. austriaca* és *Salvia* FVPD) taxonjairól gyűjtött előfordulási adataink a két alak határozott, ökológiai és földrajzi, szinte teljesen vikariáns elterjedését mutatják (12. ábra). A fotós adatbázisokban változó arányú volt az azonosítható fotók aránya ((www.inaturalist.org: 71/88; www.botanikaiforum.com: 4/31; www.naturgucker.de: 9/26; www.plantarium.ru: 16/42), bár ez annak is köszönhető, hogy sokszor populációnként több fotó is szerepel, melyek közül nem mind volt azonosítható, de az megállapítható volt, hogy melyik taxon alkotja az adott populációt. Fontos továbbá megjegyezni, hogy az itt ismertetett elterjedési mintázattól távolabbi (pl. a Don-tól keletre található) adatról nincs tudomásunk. A fotós adatbázisokra épülő felmérés alapján a vízszintes porzóállású taxon (vagyis a *Salvia austriaca* s.s.) a Kárpát-medencében, a Pontuszi sztyeppen, a Krím délkeleti részén és a Balkán erdős sztyepp zónájában fordul elő, míg a *Salvia* FVPD elterjedése a Lavrenko és mtsai., (1991) által leírt Pontuszi sztyepp rövidfüvű (valódi sztyepp) zónájára korlátozódik, bár ezeket az elterjedéseket részletes terepi vizsgálatok még pontosíthatják. A *Salvia* FVPD legnyugatibb előfordulásai Észak-Bulgáriában találhatóak (Bozhurluka település közeléből), míg a legkeletibb előfordulásai az oroszországi Rosztov mellett.



12. ábra A *Salvia FVPD* és *Salvia austriaca* elterjedése. A sztyeppövezet lehatárolása Lavrenko és mtsai. (1991) szerint történt. A krími szubmediterrán erdei ökorégió lehatárolása Olson és mtsai., (2001) szerint történt. Az egyes megfigyelések földrajzi koordinátái megtalálhatóak a 20. Függelékben.

A *Salvia austriaca* és a *Salvia FVPD* morfológiai eltérései

A minták feldolgozása során néhány egyednél csökevényes, megrövidült abaxiális csatlókat figyeltünk meg, ami arra utal, hogy a *Salvia FVPD*-ben egy dimorf ivaros rendszer (gynodioecizmus) alakulhat ki, amelyben egy egyed kétivarú vagy kizárólag nőivarú virágok lehetnek. Ez a jelenség ismert a *S. austriaca* és a *S. pratensis* fajokban is (Kaul, 1988; Zhang és Claßen-Bockhoff, 2019). A kvantitív virágjellegek mérését csak kétivarú virágokon végeztük. A lineáris kevert modellek eredményei alapján a hat vizsgált virágjelleg közül öt különbözött szignifikánsan a két taxon között: a csésze hossza ($\chi^2=34,70$, $p<0,0001$), a virág magassága ($\chi^2=6,18$, $p=0,0129$), a virág hossza ($\chi^2=107,64$, $p<0,0001$), az abaxiális csatló hossza ($\chi^2=269,67$, $p<0,0001$)

és az adaxiális csatló hossza ($\chi^2=10,25$, $p=0,0014$) nagyobb értékeket vett fel a *Salvia* FVPD esetében, mint a *S. austriaca* s.s. esetében (10. táblázat). Ezzel szemben a vegetatív jellegek közül csak a szárlevelek száma volt marginálisan szignifikánsan nagyobb a *Salvia* FVPD esetében. A többi vegetatív jellegben nem volt szignifikáns különbség a két taxon között (ezen adatokat nem részletezzük).

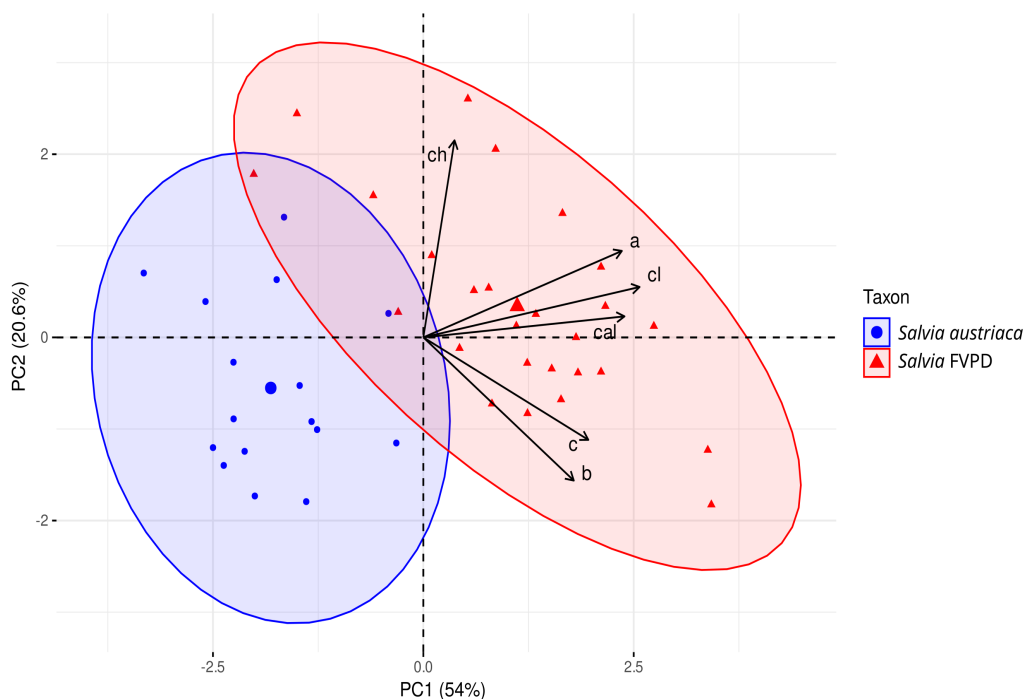
10. táblázat Virág- és vegetatív jellegek morfometriai adatai a *Salvia austriaca* (N=29) és a *Salvia* FVPD (N=35) esetében (ch – virág magassága, cl – virág hossza, cal – csésze hossza, a – abaxiális csatló hossza, b – a porzósál csúcsa és a portok közötti távolság, c – az adaxiális csatló hossza, sth – a szár magassága, stlp – szárlevél-párok száma, lpet – a tölevél nyelének hossza, lobl – a tölevél lemezének hossza). * – a mérések közötti szignifikáns különbségeket jelzi ($p<0,05$).

Változó	<i>Salvia austriaca</i>	<i>Salvia</i> FVPD
Virágjelleg	értékek mm-ben	értékek mm-ben
ch	(6,24) 10,69±0,55 (17)	(8,36) 12,38±0,54 (21,33)
cl*	(14,27) 17,7±0,26 (20,4)	(19) 22,75±0,4 (26,34)
a*	(12,79) 14,44±0,22 (17,23)	(16,04) 20,71±0,31 (24)
b	(11,25) 14,06±0,35 (18,57)	(9,69) 13,69±0,39 (18,27)
c*	(2,15) 2,72±0,07 (3,54)	(2,23) 3,06±0,09 (4,04)
cal*	(7,4) 8,22±0,15 (9,86)	(8,05) 9,54±0,15 (10,82)
Vegetatív jelleg	értékek cm-ben, kivéve stlp	értékek cm-ben, kivéve stlp
sth	(24) 56,23±2,27 (79)	(8) 61,2±3,65 (104)
stlp	(1) 1,53±0,14 (3)	(1) 1,69±0,09 (3)
lpet	(1,8) 3,67±0,32 (7,5)	(1) 4,46±0,44 (12)
lobl	(5,2) 11,61±0,53 (14,5)	(8,5) 13,83±0,77 (25)

A számértékek az alábbiakat jelentik: (minimum) átlag ± standard hiba (maximum)

A PCA-ban a virágjellegek teljes varianciájának összesen 74,6%-át magyarázta az első két főkomponens-tengely (PC1 – 54,0%, PC2 – 20,6%). A

két taxon azonban csak az első főkomponens-tengely mentén különült el egymástól (13. ábra).

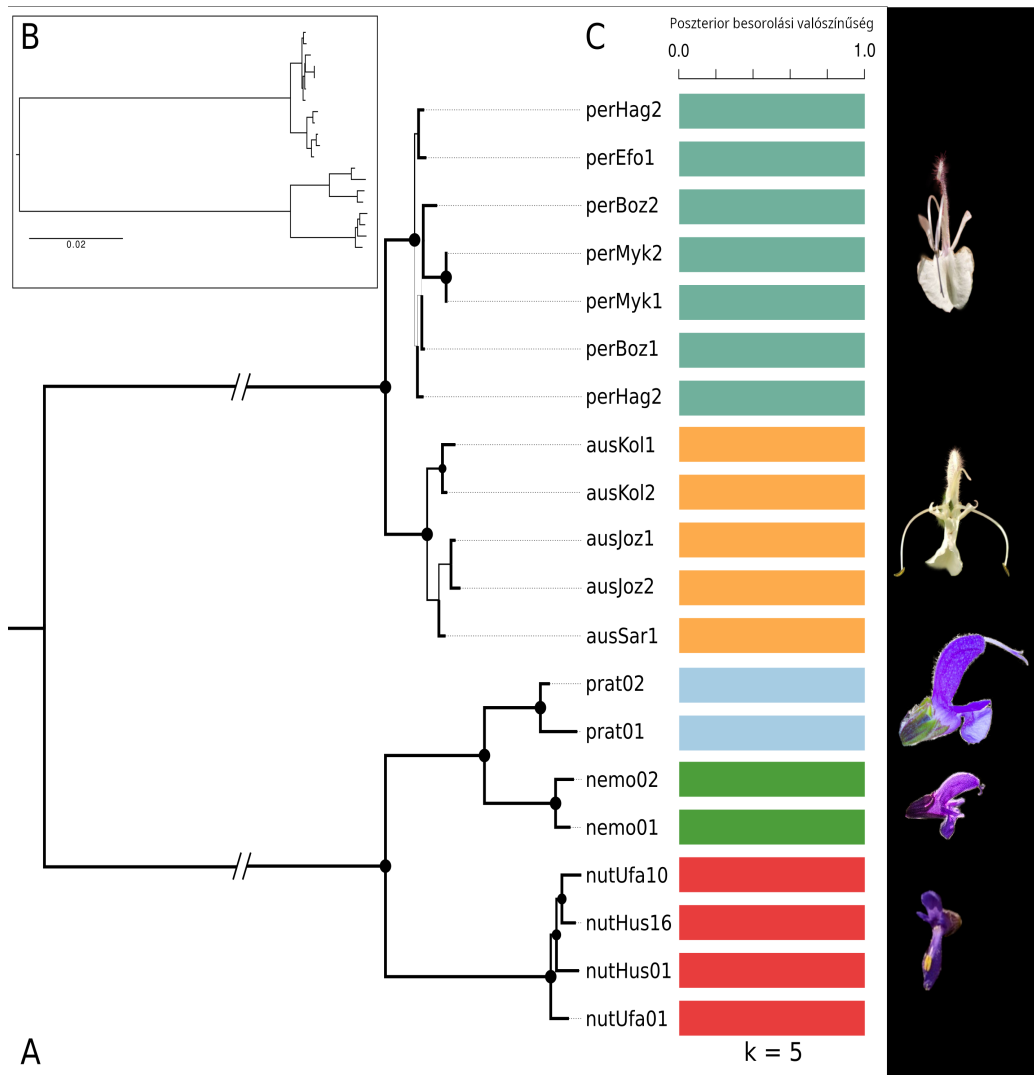


13. ábra *Salvia* minták főkomponens elemzése hat kvantitatív virágjelleg alapján, PCA biploton megjelenítve. A nyilak az egyes jellegek súlyát és irányát jelölik. A nagy kör és háromszög a pontfelhők centroidját jelöli, az ellipszisek pedig a 95%-os konfidencia-szintet. (PC1 – első főkomponens, PC2 – második főkomponens, piros háromszög – *Salvia austriaca* (N=16), kék kör – *Salvia FVPD* (N=26), ch – virág magassága, cl – virág hossza, cal – csésze hossza, a – abaxiális csatló hossza, b – a porzószaál csúcsa és a portok közötti távolság, c – az adaxiális csatló hossza).

Filogenomika, faji szintű lehatárolás és az elválási idők becslése

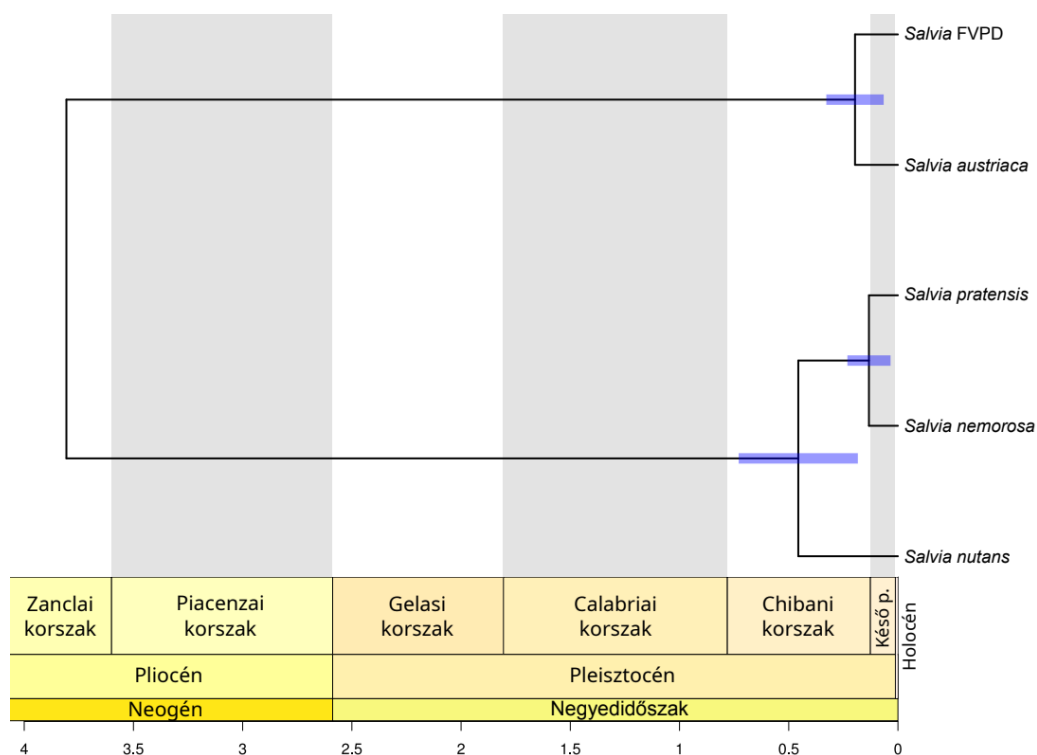
A független, genomi SNP-eken alapuló ML filogenetikai elemzéssel egy jó felbontást adó törzsfát kaptunk (14.A,B ábra), melyet általánosan magas BS értékek jellemeznek. Az azonos *a priori* taxonba sorolt minták erősen támogatott (BS=100), monofiletikus csoportokat alkottak, de ezen kládokon belüli elválások néhány esetben csak mérsékelt támogatottsággal bírtak (azaz

BS<70). A törzsfán a „*S. austriaca* csoport” a leghosszabb ág mentén, erős támogatottság mellett különül el a többi mintától (az *a priori* külesoporttól) (14.A ábra). Ez utóbbi kládon belül a *S. nutans* testvércsoportja a *S. pratensis* és a *S. nemorosa* által alkotott kládnak.



14. ábra A vizsgált taxonok közötti filogenetikai kapcsolatok. **A:** ML filogram. A fekete pontok és a vastag ágak a támogatottságot jelzik ($BS \geq 70$), a vékony szagatott ágak az ez alatti BS értékeket jelölik. A legelső elágazás két ágát lerövidítettük az ábra méretének csökkentése érdekében. **B:** Az ML filogram eredeti ághosszokkal. **C:** Négy főkoordináta első két diszkriminancia analízise alapján számított poszterior besorolási valószínűségek, k -átlagok klaszterezésből származó *a priori* csoportosítás alkalmazásával $K=5$ -nél. Az egyedek sorrendje a filogenetikai fa csúcsainak sorrendjét követi. Az egyed azonosítójának eleje a taxonra utal: per – *Salvia* FVPD; aus – *S. austriaca* s.s.; prat – *S. pratensis*; nemo – *S. nemorosa*; nut – *S. nutans*. Fotók: Löki V., Mátis A., Sramkó G., P. Volkova.

A koaleszcencia-elemzésen alapuló fajfa rekonstrukció (15. ábra) az ML törzsfával teljesen egyező topológiát eredményezett, ahol a „*S. austriaca* csoport” és a *S. nutans*, *S. pratensis* és *S. nemorosa* által alkotott kládok testvércsoportok. A következő elválást a *S. nutans* képviseli az utóbbi kládon belül, amely a gyökérhez viszonyítva sokkal recensebb, a középső pliocén során vált el a másik két fajt tartalmazó kládtól. Az időrendben ezt követő elválást a „*S. austriaca* csoport” két taxonjának elválása képviseli, amelyet a *S. nemorosa* és a *S. pratensis* közötti elágazás követ. A törzsfán minden elágazás teljes mértékben támogatott (PP=1,0). A molekuláris datálás alapján a *S. austriaca* s.s. és a *Salvia* FVPD 197 ezer éve (95%-os konfidenciaintervallum (CI): 302000–87000 év) váltak el (15. ábra).



15. ábra A vizsgált *Salvia* taxonok datált fajfája a SNAPP által generált legjobb faji szintű lehatárolási modell alapján. A kék sávok 95%-os konfidenciaintervallumokat jelölnek. Az x tengelyen az elválások ideje millió években van feltüntetve.

A DAPC elemzés során a legalacsonyabb BIC pontszámokat az 5–7 csoportot tartalmazó modellek érték el (22. Függelék). Öt csoportra való felosztás (K=5) esetén minden egyed maximális támogatottsággal a fájának megfelelő csoportba került besorolásra, úgy, hogy a *S. austriaca* s.s. és a *Salvia* FVPD is külön csoportot alkottak (14.C ábra). Érdekes módon az egyedeket ötnél több csoportba soroló modellek a *S. nemorosa* és a *S. pratensis* egyedeket sorolták több kisebb csoportba, míg a „*S. austriaca* csoport” egyedei által alkotott csoportokat nem osztották fel (23. Függelék). Hasonlóképpen, K=4 felosztás esetén a *S. nemorosa* és a *S. pratensis* kerül összevonásra, míg a *S. austriaca* s.s. és a *Salvia* FVPD továbbra is külön csoportot alkot (23. Függelék).

A BFD elemzésben az alternatív modell volt támogatott, amely a *S. austriaca* s.s. és a *Salvia* FVPD-t különálló egységeknak tekintette. A nullmodell, amely a „*S. austriaca* csoporton” belüli összes egyedet egy fajba sorolja (*S. austriaca* s.l.), mindkét ismételtsben rosszabbul teljesített, a két ismételts között 348,67 átlagú BF értékekkel az alternatív modell javára (11. táblázat). Ez (Kass és Raftery, 1995) alapján döntő erejű különbség. A modellek közötti átlagos ESS 336,34 volt (szórás=200,74), ami azt jelenti, hogy az MCMC ismétlések száma elegendő volt a konvergencia eléréséhez.

11. táblázat Marginális valószínűségi értékek (lnMLE) és Bayes-faktorok (2lnBF) a két alternatív faji szintű lehatárolási hipotézishez: a *Salvia austriaca* és a *Salvia* FVPD egyedek egy fajba (*S. austriaca* s.l.) való csoportosítása vagy két fajra való felosztásuk. Mindkét hipotézishez két független elemzést futtattuk le (1. és 2. ismételts).

Ism.	Hipotézis	lnMLE	2lnBF
1	1 faj: <i>nemorosa</i> , <i>pratensis</i> , <i>nutans</i> , <i>austriaca</i> s. l.	-17754,2	–
1	2 faj: <i>nemorosa</i> , <i>pratensis</i> , <i>nutans</i> , <i>austriaca</i> , FVPD	-17686,4	135,6
2	1 faj: <i>nemorosa</i> , <i>pratensis</i> , <i>nutans</i> , <i>austriaca</i> s. l.	-17968,3	–
2	2 faj: <i>nemorosa</i> , <i>pratensis</i> , <i>nutans</i> , <i>austriaca</i> , FVPD	-17687,5	561,7

2.4.4. Diszkusszió

A *Salvia austriaca* csoport taxonjainak elterjedése

Adataink arra utalnak, hogy a két alak egyáltalán nem fordul elő szimpatrikusan (12. ábra), mely alapján valószínűsítjük a két taxon ökológiai és földrajzi elkülönülését. Nagyon valószínű, hogy ezen taxonok a közelmúltban izolálódtak, és különböző ökológiai körülményekhez adaptálódhattak. Ezeket az ökológiai körülményeket a nedvesebb erdős sztyepp és a szárazabb valódi sztyepp eltérő éghajlati viszonyai határozhatják meg (Erdős és mtsai., 2018). Mindazonáltal azt is meg kell jegyeznünk, hogy a mezei zsálya (*S. pratensis*), ami egy függőleges porzóállású, és az általunk vizsgált fajokhoz nagyon hasonló virágmérettel rendelkező faj, szinte egyáltalán nem fordul elő a valódi sztyeppzónában (Meusel és Jäger, 1992). Mindezek miatt nem zárhatjuk ki a fajok közötti, beporzókért való versengés szerepét a vizsgált taxonok jelenlegi elterjedésének kialakulásában.

Bár a *Salvia* FVPD-hez tartozó legnyugatibb megfigyelésünk (Bulgária: Bozhurluka) Lavrenko és mtsai. (1991) alapján az erdős sztyepp-zónán belül található, ez a lelőhely számos, a valódi sztyeppzónára jellemző fajnak ad otthont (pl. *Paeonia tenuifolia* L., *S. nutans*, *Adonis vologensis* Stev. stb.; személyes megfigyelés), így ez a valódi sztyeppzóna extrazonális enklávéjának tekinthető. A legkeletibb megfigyelés (Oroszország: Rosztov) a valódi sztyeppzónán belül helyezkedik el, ami északkelet felé terjeszkedik tovább. Az alkalmas élőhelyek előfordulását tekintve nem zárhatjuk ki teljesen, hogy a *Salvia* FVPD elterjedési területe tovább terjed kelet felé. Elterjedése azonban, jelenlegi ismereteink szerint, a pontuszi sztyeppe valódi sztyeppzónájára korlátozódik.

Rendkívül érdekesek a *S. austriaca* s.s. megfigyelései a Krím-félsziget délkeleti részéről, ahol szubmediterrán éghajlat és vegetáció uralkodik, ami a két taxon között megfigyelhető, erős ökológiai differenciálódást támasztja alá. Meg kell jegyeznünk ugyanakkor, hogy az elterjedési terület ezen részéből nem gyűjtöttünk genetikai mintát, ami megkérdőjelezi a Krím-félszigeten előforduló vízszintes emelőszerkezet mechanizmussal rendelkező *Salvia* alak és a *S. austriaca* s.s. egyezőségét, mindazonáltal a virágok morfológiája nem szól a két árearészletben előforduló populációk konspecifitása ellen.

Ha valóban mindkét árearészletben a *S. austriaca* s.s. fordul elő, ezen diszkontinuitás eredete az Eem-interglaciális (130–115 ezer év; (Dahl-Jensen és mtsai., 2013) melegebb és csapadékosabb időszakaira vagy a holocén klímaoptimumra (7–8 ezer év) tehető. Amint azt több szerző is kimutatta (Conea, 1970; Ghenea és Rădan, 1993; Van Andel, 1996; Markova, 2000; Tomescu, 2000; Lindner és mtsai., 2004; Magyarai és mtsai., 2010; Timar-Gabor és mtsai., 2011; Balescu és mtsai., 2020), ezekben az időszakokban a Krím-félsziget és Közép-Európa között folytonos erdős sztyepp élőhelyek terültek el, ami arra utal, hogy a *S. austriaca* s.s. a Krím-félszigeten előforduló populációja refugiális eredetű, mely állapot akár 115 ezer éve fennállhat.

A *Salvia austriaca* s.s. és a *Salvia* FVPD. közötti morfológiai különbségek

A morfometriai elemzések számos statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak ki a két taxon morfológiájában, több karakter alapján: a csésze hossza, a virágmagassága, a virág hossza, az abaxiális csatló hossza, az adaxiális csatló hossza, és a szárlevelek száma kisebb a *S. austriaca* s.s. esetében, míg a legtöbb vegetatív jelleg között nem mutattunk ki különbséget. Ez a virágjellegekre ható erős szelekció létére utal, ami a két taxon elválásának fő mozgatórugója lehet.

Filogenomika, faji szintű lehatárolás és az elválási idők becslése

Egy hatékony genomikai megközelítés, a RADseq (Andrews és mtsai., 2016) felhasználásával kapott filogenomikai eredményeink világos képet adnak a vizsgált *Salvia* taxonok közötti kapcsolatokról. Minden *a priori* meghatározott taxon monofiletikus egységet alkotott az ML törzsfán (14.A,B ábra), ami indokolja a fajfa rekonstrukcióhoz való összevonásukat (15. ábra). Ezen túlmenően azt is jól demonstrálja, hogy a genomikai megközelítés mennyire sikeres lehet a recensén elvált, közelrokon taxonok közötti filogenetikai kapcsolatok feloldásában: míg a sejtmagi és plasztisz szekvenciákon alapuló filogenetikai elemzésekben (Walker és Sytsma, 2007; Takano és Okada, 2011; Jenks és mtsai., 2013; Li és mtsai., 2013; Walker és mtsai., 2015; Will és Claßen-Bockhoff, 2017; Hu és mtsai., 2018) csak a *Salvia* nemzetség fő leszármazási vonalai közötti felbontást tudták elérni, mi a RADseq felhasználásával faji szinten jól felbontott törzsfát rekonstruáltunk.

A genetikai struktúra többváltozós elemzésének (DAPC) eredménye tükrözi ezt a megállapítást, mivel ugyanannyi csoportot talált, mint ahányat a mintáink *a priori* besorolása során megadtunk. Más csoportosítási módok (több, vagy kevesebb csoportra osztás) nem azonosítottak csoportokat a céltaxonjainkon belül, ami homogén genetikai felépítésük mellett szól. A datált fajfa rekonstrukció eddig nem látott betekintést nyújt a vizsgált céltaxonjaink evolúciós történetébe. Különösen érdekes, hogy a céltaxonjaink közötti elválás korábbi időpontra tehető (197 ezer év), mint a *S. nemorosa* és a *S. pratensis* közötti elválás (133 ezer év), amely két, széles körben különálló fajként elfogadott taxon elválását jelöli. A datálás alapján a két céltaxon nagy valószínűséggel körülbelül 200 000 évvel ezelőtt, nagyjából az utolsó előtti jégkorszak kezdetén válhatott szét, és folytatták divergens evolúciójukat az utolsó előtti interglaciális alatt. Ebben az időszakban a sztyepp- és erdei

vegetáció váltakozó expanzíós-kontrakciós ciklusai (Kajtoch és mtsai., 2016) biztosíthatják a fent leírt ökológiai és földrajzi differenciálódást elősegítő feltételeket.

Végül, a BFD elemzés teljes mértékben alátámasztotta a *S. austriaca* csoport két taxonjának (azaz a *S. austriaca* s.s. és a *Salvia* FVPD) faji szintű elkülönítését. Ezért, az összes fenti eredményt figyelembe véve, mind az ökológiai, a földrajzi, a morfológiai, a genetikai aspektusokat, mind az explicit faji szintű lehatárolás eredményét, a *Salvia* FVPD-t a tudomány számára új fajként írjuk le. Bár a Nyárády (1942) által leírt változat (*S. austriaca* L. var. *perlanata* Nyár.) minden valószínűséggel a *Salvia* FVPD-t takarja, ő nem tesz említést a virág radikálisan eltérő morfológiájáról, kivéve a csészék eltérő hosszát, melyeket mi is különözönek találtunk. Leírása főleg a tőlevelek és a virág erőteljesebb szőrözöttségére koncentrálódik. A taxonómiai szabályok tiszteletbentartása mellett (prioritás elve) nem nevezhetjük meg ezt az új taxont, melyet a disszertáció alapjául szolgáló szakcikkekben írunk le, ezért erre a taxonra a továbbiakban is *Salvia* FVPD-ként hivatkozok.

2.4.5. Konklúziók

Elemzéseink feltárták egy Európában relatíve nagy elterjedésű *Salvia* faj létezését, amely évszázadokon keresztül elkerülte a botanikusok figyelmét. Nagymértékű hasonlósága egy gyakori erdős sztyepp fajjal, az osztrák zsályával (*S. austriaca*), hozzájárulhatott ahhoz, hogy ez a faj ilyen hosszan rejtve tudott maradni. Elemzéseink azt is kimutatták, hogy ez a két faj, a *S. austriaca* és a *S. FVPD* közeli rokonok, és csak kb. 200 000 évvel ezelőtt váltak el egymástól. Emellett a két faj szinte teljes vikariáns elterjedést mutat, az előbbi az erdős sztyepp zónára, az utóbbi pedig a valódi sztyepp zónára jellemző. Úgy véljük, érdemes ennek a mintázatnak a taxonómián túlnyúló hátterét elemezni, mivel ez

némi fényt vethet a *Salvia* nemzetségben megfigyelhető fajképződési mechanizmusok természetére, és betekintést adhat a pontuszi sztyeppe természetrajzába.

A zsályákban a porzó emelőszerkezet mechanizmus a pollentranszfer nagyobb hatékonysága érdekében alakulhatott ki, mivel a csatlók alakjának, méretének és orientációjának változatossága lehetővé teszi a pollen specifikus elhelyezését a beporzó testének különböző részein (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2003, 2004). A pollentranszfer pontosságának ilyen módon való maximalizálása hasonló az Orchidaceae vagy az Asclepiadaceae családok pollínium átviteléhez, amely lehetővé teszi, hogy több faj egyazon beporzó fajt használja, miközben elkerülik a hibridizációt és a kompetíciót (Pauw, 2006). Ez megfelel a mechanikai izoláció “*Pedicularis* L. típusának” (Grant, 1994), ahol a reprodukív izolációt a beporzó testén a pollenelhelyezés helyének megváltozása idézi elő. Így a porzók emelőkar szerkezete mechanikus prezigotikus izolációt biztosíthat szimpatrikus *Salvia* fajok között (Claßen-Bockhoff és mtsai., 2004), mivel lehetővé teszi, hogy különböző, egyszerre virágzó fajok a kereszteződést elkerülve osztozzanak ugyanazon a beporzón.

A *S. austriaca* és a *Salvia* FVPD között megfigyelt különbség mögött húzódó fajképződési mechanizmusra vonatkozóan legalább három alternatív magyarázat létezik. Mindhárom forgatókönyv azon a megfigyelésen alapul, hogy míg a *S. austriaca* gyakran fordul elő együtt a mezei zsályával (amelynek hasonlóak a virágmorfológiai jellegei és ökológiai preferenciái, de eltérő a porzó emelőszerkezet mechanizmusa), a *Salvia* FVPD a jelek szerint nem fordul elő együtt a két előbbi faj egyikével sem (12. ábra).

Ha a vízszintes porzóállás a pleziomorf állapot a *S. austriaca* csoportban (azaz a *S. austriaca* által képviselt alak az ősi állapot), akkor amikor a csoport

őse kapcsolatba került a *S. pratensis*szel, a vízszintes porzóállás fennmaradt, így hatékonyan megakadályozva a hibridizációt, és lehetővé téve a két faj együttes előfordulását. Az ökológiai leválogatódásnak (ecological sorting) nevezett folyamat során (pl. Strong és mtsai., 1979; Waser, 1983; Rummel és Roughgarden, 1985; Armbruster, 1986; Armbruster és mtsai., 1994; Kraft és mtsai., 2015) a reprodukzív kompetíció a két kompetitor közül egyet eliminálna a közösség formálódása során. Ebben az esetben a *S. austriaca* és a *S. pratensis* együttélése azért lehetséges, mert már a kezdeti érintkezésük idején "preadaptálódtak" (a beporzó testének különböző részeit használják). Korábban kimutatták, hogy a fajok közötti, beporzókért folytatott verseny szerepet játszik az ökológiai leválogatódásban például a *Costus* L. (Schemske, 1981), az *Erica* L., a *Limnanthes* R. Br. (Briscoe Runquist és mtsai., 2016), a *Mimulus* L. (Briscoe Runquist és mtsai., 2016) és a *Clarkia* Pursh. (Briscoe Runquist és mtsai., 2016; Eisen és Geber, 2018) nemzetségek esetében. A *S. pratensis* hiányában a szárazabb valódi sztyepp zónában a *S. FVPD* őse másodlagosan fejlesztette ki a porzók függőleges emelőszerkezet mechanizmusát, valószínűsíthetően a szaporodási interferenciából származó evolúciós nyomás hiánya miatt. Ebben a foratókönyvben azonban azt kell feltételeznünk, hogy a zsályákban vagy evolúciósan hátrányos a vízszintes porzó emelőszerkezet mechanizmus (e stratégia ritkasága alapján ítélve, talán a pollentranszfer csökkent pontossága vagy az elhelyezett pollen kisebb mennyisége miatt (Van der Niet és mtsai., 2014), vagy pedig létezett egy rokon faj, amelynek vízszintes porzó emelőszerkezet mechanizmusa kikényszerítette ezt a változást.

A második foratókönyvben azt feltételezzük, hogy a *S. austriaca* csoportban a függőleges porzó emelőszerkezet mechanizmus a pleziomorf állapot (azaz a *Salvia* FVPD által megtartott jelleg), és ebből fejlődött ki a vízszintes porzó emelőszerkezet mechanizmus. Itt a virágmorfológiában

bekövetkezett változást feltételezhetően a *S. pratensis*szel való érintkezés és szaporodási interferencia idézte elő a mezofilabb élőhelyeken. Ez a koevolúciós folyamat karakter áthelyeződéssel jár, ahol az adaptív virágjellegek (vagyis a prezigotikus izolációt biztosító, rendkívül specifikus pollentranszfer stratégiák) közötti különbség a helyi fajegyüttesek közötti szimpatria és fajok közötti verseny következménye (Armbruster és Muchhala, 2009; Armbruster és mtsai., 2014). A virágjellegek karakter áthelyeződése szerepet játszott a közösségek szerekezetének kialakulásában pl. a *Dalechampia* L. (Armbruster, 1985, 1986), a *Stylidium* Sw. ex Willd. (Armbruster és mtsai., 1994), a *Burmeistera* H. Karst. & Triana (Muchhala N. és Potts, 2007) és a *Leavenworthia* Torr. (Norton és mtsai., 2015) nemzetségek esetében.

Mindkét fenti forgatókönyv csak egy függőleges porzó emelőszerkezet mechanizmussal rendelkező *Salvia* faj (pl. *S. pratensis* vagy annak elődje) meglétét feltételezi a szimpatikus előfordulási területen. Mivel a függőleges porzó emelőszerkezet mechanizmus szélesebb körben elterjedt a nemzetségen belül, valószínű, hogy egy ilyen fenotípusú faj már létezett a területen, amikor a *S. austriaca* őse megjelent az erdős sztyepp övezetben.

Harmadik magyarázatként a virágmorfológiában bekövetkező véletlenszerű változások vezethettek a két taxon reprodukív izolációjához, miközben szimpatrikusan fordultak elő. Az ilyen típusú, nem adaptív fajképződés köztudottan ritkán fordul elő (lásd pl. Straw, 1956; Grant, 1981; Armbruster, 1993; Armbruster és mtsai., 1994, 2014; Cozzolino és Widmer, 2005), és esetünkben rendkívül valószínűtlen, tekintve, hogy még távolabbi rokon *Salvia* fajok (néha egészen eltérő prozó emelőszerkezet mechanizmussal is) hibridizálnak (pl. Marilaun, 1891; Hihara és mtsai., 2001; Wester és Claßen-Bockhoff, 2002; Herraiz-Peñalver és mtsai., 2015; Nachychko és Sosnovsky, 2020), általában köztes morfológiájú utódokat létrehozva (Webb és Carlquist,

1964; Bernáth J. és Németh, 2000; Tychonievich és Warner, 2011). Ezért még a kismértékű génáramlás is megszüntetné az izolációt két szimpatrikus populáció között.

Bár eredményeink jól alátámasztják, hogy a *Salvia* FVPD a *S. austriacától* különálló fajt képvisel, a jelenlegi mintázásunk nem elégséges ahhoz, hogy megállapítsuk e két taxon teljes történetét, és hogy rávilágítsunk, hogy a szétválásukban milyen evolúciós erők játszottak szerepet. Ennek vizsgálatához a *Salvia* FVPD elterjedési területének legészakibb és legkeletibb részeire összpontosító, kiterjedtebb mintavételre lenne szükség, továbbá figyelmet kell fordítani a *S. austriaca* Krím-félszigeti és észak-ukrajnai populációira. A két faj, és néhány távolabbi rokon külsoport teljes filogeográfiai történetének összehasonlítása fényt deríthet jelenlegi elterjedésük eredetére. Emellett, egy jobb felbontású, a *S. stamineát* is magába foglaló filogenetikai elemzés segítené annak megállapításában, hogy az *Austriacae* fajsorban melyik beporzási típus (azaz a függőleges vagy a vízszintes porzó emelőszerkezet mechanizmus) az ősi, vagy, hogy a vízszintes porzó emelőszerkezet mechanizmus többször is kialakult-e a *Sclarea* alnemzetségben. Bebizonyítottuk, hogy a vizsgálatunkban alkalmazott genomi módszertan (azaz a RADseq) értékes eszköz ezen filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára, kiemelve hasznosságát a *Salvia* fajcsoportjain belül, de hasznos lehet a nemzetség szintjén is (lásd Eaton és Ree, 2013; Hipp és mtsai., 2014; Leaché és Oaks, 2017).

3. Összefoglalás

Dolgozatomban négy esettanulmányon keresztül tettem kísérletet arra, hogy bemutassam néhány, nemzetközileg széleskörűen, hazánkban kevésbé használt genetikai módszer alkalmazhatóságát a botanikai kutatásokban. Az első két esettanulmányban két, fokozottan védett növényfajban fejlesztett mikroszatellit markereket teszteltünk, bemutattuk alkalmazhatóságukat populációgenetikai kutatásokban, és teszteltük potenciális alkalmazhatóságukat közeli rokon fajokban. A harmadik esettanulmányban a fokozottan védett, endemikus faj, a magyarföldi husáng (*Ferula sadleriana* Ledeb.) átfogó természetvédelmi célú populáció genetikai vizsgálatát végeztük el, kitérve a faj filogenetikai helyzetére, populációgenetikai struktúrájára, demográfiai helyzetére, illetve ezen ismeretek természetvédelmi interpretációjára. A negyedik esettanulmányban egy szélesebb elterjedésű fajról, az osztrák zsályáról (*Salvia austriaca* Jacq.) bizonyítottuk be, hogy valójában két különálló fajt rejt. A két faj különállását elterjedésük, morfológiai eltéréseik, illetve genomi alapú faji lehatárolás segítségével bizonyítottuk be, kitérve a fajok filogenomikai kapcsolatára, elválásuk idejére, valamint az alkalmazott genomi módszer (RADseq) a *Salvia* nemzetségen belüli filogenomikai alkalmazhatóságára.

A mocsári kardvirág (*Gladiolus palustris* Gaud.) Közép-Európa endemikus faja. A faj egy veszélyeztetett élőhelyen, a nedves rétek és száraz gyepek közötti ökotonban fordul elő, ezért teljes elterjedési területén visszaszorulóban van. Szerepel az Európai Unió Élőhelyvédelmi Irányelvének II. mellékletében, valamint több nemzeti vörös listán. A *G. palustris* hatékony védelme érdekében olyan genetikai markereket azonosítottunk, amelyek a populáció szintjén biztosítanak felbontást. Kutatásunk során 15 mikroszatellit

markert azonosítottunk a fajban, melyek közül 11 bizonyult polimorfának. Eredményeinkben e 11 marker alapján három populáció genetikai mérőszámait közöljük, melyekből például az egyes populációk genetikai diverzitása, vagy a populációk közötti génáramlás mértéke állapítható meg. Továbbá megmutattuk, hogy az általunk azonosított markerek két rokon fajban is alkalmazhatóak lehetnek. Megállapítottuk, hogy az általunk azonosított markerek hasznos eszközt képviselnek a faj további populációgenetikai vizsgálatához.

A *F. sadleriana* egy Kárpát-medencei endemikus faj, melynek mindössze nyolc populációja ismert, ezért minden populációja fokozottan védett. Az IUCN Vörös Listáján a veszélyeztetett kategóriába sorolják, és szerepel az Európai Unió Élőhelyvédelmi Irányelvének II. és IV. mellékletében. A *F. sadleriana* sziklás, száraz gyepek, sztyepprétek és pannon molyhos tölgyes karsztbokorerdők mozaikjában fordul elő, és több tényező, például vadragás, túrázók általi taposás, illetve nyílt élőhelyének záródása fenyegeti. A faj megőrzése érdekében több, *ex situ* védelmi intézkedés történt, azonban ezek csak részlegesen dokumentáltak.

A második esettanulmányban 13 mikroszatellit marker fejlesztését írtuk le a magyarföldi husángban, majd e 13 markert jellemeztük, és bemutattuk populációgenetikai alkalmazhatóságukat néhány általánosan használt mérőszámon keresztül, három populáció felhasználásával. Az amplifikáció hatékonyságát két közel rokon fajban teszteltük. Megállapítottuk, hogy az általunk azonosított markerek kiválóan alkalmasak a magyarföldi husáng populációgenetikai vizsgálatára, és a *Ferula* nemzetségen belül szélesebb körben is alkalmazhatóak lehetnek.

A harmadik esettanulmányban a magyarföldi husáng a *Ferula* nemzetségen belül elfoglalt filogenetikai helyzetét határoztuk meg a sejtmagi riboszomális ITS szekvencia felhasználásával, a második esettanulmányban leírt

13 mikroszatellit marker segítségével pedig megvizsgáltuk a faj összes populációjának genetikai állapotát, a populációk közötti genetikai kapcsolatokat, illetve igyekeztünk feltárni evolúciós és demográfiai történetüket. Megállapítottuk, hogy a *Ferula sadleriana* legközelebbi rokonai az Eurázsiai sztyeppén honos *Ferula tatarica* Fisch. ex Spreng. és *Ferula songarica* Pall. Ex Schult. Megállapítottuk továbbá, hogy az összes populáció viszonylag magas genetikai diverzitással bír, mely a faj életmenet stratégiájának köszönhetően, a kis populációméretnek negatív hatását kiegyenlítve alakulhatott ki. A populációk egymástól viszonylag elszigeteltek, bár jól tettenérhetőek az *ex situ* fajvédelmi programokból származó betelepítések hatásai, és eredményeink két populáció esetében nem zárják ki azok telepített eredetét. További természetvédelmi kezelésként javasoljuk az eddigi intézkedések megtartását, valamint a populációk egyedszámának szorosabb követését és az egyes populációk különálló genetikai egységként való kezelését a potenciális jövőbeli telepítések tervezésénél.

A zsályák (*Salvia* L.) az ajakosvirágúak családjának legnépesebb nemzetsége, mely több, mint ezer fajt számlál. A nemzetség egyedülálló evolúciós újítása a virág felépítésében rejlik, mivel a módosult porzók mintegy emelőszerkezetszerűen működnek, ugyanis a beporzó a nektár elérése érdekében a porzó steril alsó csatlóját elmozdítva a felső csatlón található portokot maga felé mozdítja el, így elhelyezve a pollent. Ez az emelőszerkezet mechanizmus bizonyítottan szerepet játszik a nemzetségen belüli fajképződési eseményekben, mivel lehetővé teszi a szimpatrikusan előforduló, egyszerre virágzó fajoknak, hogy ugyanazt a pollinátort használják, a hibridizáció elkerülése mellett. Terepi kutatásaink során azonosítottunk egy *Salvia* taxont, amely az osztrák zsályától gyakorlatilag megkülönböztethetetlen pusztán vegetatív jellegek alapján, azonban radikálisan eltérő virágmorfológiát képvisel.

A negyedik esettanulmányban e taxon rendszertani hovatartozását igyekeztünk feltárni, melyhez vizsgáltuk földrajzi elterjedésének határait online fényképes adatbázisok, illetve saját megfigyeléseink alapján, a közte és az osztrák zsálya között megfigyelhető morfológiai eltéréseket a nemzetségben már kipróbált morfometriai módszerek segítségével, valamint az osztrák zsályához való genetikai viszonyát a RADseq genomi módszerhez kapcsolt Bayes-faktor alapú faji lehatárolás, Bayesiánus fajfa rekonstrukció valamint a két taxon elválásának molekuláris datálásának segítségével. Kitértünk továbbá a RADseq módszernek a *Salvia* nemzetségben való szélesebb körű alkalmazhatóságára. Megállapítottuk, hogy az általunk azonosított *Salvia* taxon nem fordul elő együtt az osztrák zsályával, és míg az előbbi az eurázsiai sztyeppe valódi sztyeppzónájában fordul elő, utóbbi a Pannon- és eurázsiai erdős sztyeppén, illetve a Krím-félsziget déli részén található meg. A morfometriai elemzések megmutatták, hogy míg a vegetatív jellegekben nem tapasztalható különbség a két taxon között, a virágjellegekben szignifikáns és konzisztens eltérések figyelhetők meg. Az összes filogenomikai eredményünk a két taxon faji szintű elkülönülését támogatta, és elválásuk idejét 197 ezer évvel ezelőtre becsültük, korábbra, mint két általánosan elismert faj, a mezei (*Salvia pratensis* L.) és a ligeti zsálya (*Salvia nemorosa* L.) elválását. Ezen eredményeink alapján a taxont az esettanulmány alapjául szolgáló szakcikkben a tudomány számára új fajknét írjuk le. A RADseq módszerrel teljes bizonyossággal el tudtuk különíteni a Plethiosphace fajcsoport fajait, ebből pedig arra következtethetünk, hogy a módszer más fajcsoportokon belül, de akár az egész *Salvia* nemzetségen belül alkalmas lehet a fajok leszármazási viszonyainak nagy bizonyossággal való feltárására.

Az esettanulmányainkban bemutatott módszerek a botanikai kutatások más- más részterületén alkalmazhatóak a leghatékonyabban. Míg az nrITS

szekvencia Sanger-szekvenálása alacsony költségek és munkaidő befektetés mellett kivitelezhető, az leginkább csak mély filogenetikai elválások vizsgálatára alkalmas. A mikroszatellit markerek fejlesztése, majd alkalmazása mind a költségek, mind a befektetett idő és munka tekintetében a legmegterhelőbb, ezért (amennyiben nem állnak rendelkezésre már korábban azonosított markerek) kifejlesztésük és használatuk leginkább sok (több száz) egyed vizsgálata, vagy hosszabb távú vizsgálatok esetén térülhet meg. A RADseq módszer is viszonylag költséges, és egy könyvtár limitált számú egyedet tartalmazhat (~100), ellenben kevés munkaidőt vesz igénybe, és a kapott adat mennyisége nagyságrendekkel magasabb az előző két módszerrel elérhetőnél. Ennek a módszernek is megvannak ugyanakkor a hátrányai, például kevésbé alkalmas mély filogenetikai elválások vizsgálatára, és az adatok feldolgozása során használt beállítások nagyban befolyásolhatják az eredményeket, így például nehézkessé téve két különböző beállításokkal végzett populációgenetikai vizsgálat eredményeinek összehasonlítását, akár ugyanazon fajon belül is.

4. Summary

In my thesis, I have attempted to demonstrate the applicability of some internationally widely used genetic methods in botanical research, which are less widely used in our country, through four case studies. In the first two case studies, we tested microsatellite markers developed in two endangered plant species, demonstrated their applicability in population genetics research, and tested their potential applicability in closely related species. In the third case study, we conducted a comprehensive conservation genetics study of the endemic, endangered species, *Ferula sadleriana* Ledeb., covering its phylogenetic status, population genetic structure, demographic status and the interpretation of this knowledge for conservation. In the fourth case study, we demonstrated that a species with a wide distribution, *Salvia austriaca* Jacq. constitutes of two separate species. The distinctness of the two species was demonstrated by means of their distribution patterns, morphological differences, species delimitation, including the phylogenomic relationship of the species, the time of their separation and the phylogenomic applicability of the used genomic method (RADseq) within the genus *Salvia* L.

The marsh gladiolus (*Gladiolus palustris* Gaud.) is an endemic species of Central Europe. The species occurs in an endangered habitat, the ecotone between wet meadows and dry grasslands, and is therefore in decline throughout its range. It is included in Annex II of the European Union Habitats Directive and in several national red lists. To ensure effective conservation of *G. palustris*, genetic markers have been developed that provide resolution at the population level. During our research, we developed 15 microsatellite markers in the species, 11 of which we have found to be polymorphic. In our results, we report genetic metrics for three populations based on these 11 markers, which

can be used to determine, for example, the genetic diversity of each population or the degree of gene flow between populations. Furthermore, we show that the markers we have developed can be used in two related species. We conclude that the markers we developed represent a useful tool for further population genetics studies of this species.

F. sadleriana is a Carpathian Basin endemic species with only eight known populations, all of which are strictly protected. It is listed as threatened on the IUCN Red List and is included in Annexes II and IV of the European Union Habitats Directive. *F. sadleriana* occurs in a mosaic habitat of rocky, dry grasslands, steppe slopes, and Pannonian karst white oak low woods and is threatened by a number of factors, including grazing by big game, trampling by hikers and closure of its open habitat. Several *ex situ* conservation measures have been taken to conserve the species, but these are only partially documented.

In the second case study, we described the development of 13 microsatellite markers in *F. sadleriana*, characterized these 13 markers and demonstrated their population genetic applicability through some commonly used metrics using three populations. The efficiency of amplification was tested in two closely related species. We conclude that the markers we have developed are suitable for population genetic studies of *F. sadleriana* and may have wider applicability within the genus *Ferula* L.

In the third case study, we determined the phylogenetic position of *F. sadleriana* within the genus *Ferula* using the nuclear ribosomal ITS sequence, and using the 13 microsatellite markers described in the second case study, we investigated the genetic status of all known populations of the species, the genetic relationships between populations, and sought to elucidate

their evolutionary and demographic history. We found that the closest relatives of *F. sadleriana* are *Ferula tatarica* Fisch. ex Spreng. and *Ferula songarica* Pall. Ex Schult., both native to the Eurasian steppe. We also found that all populations have relatively high genetic diversity, which may be the result of the species' life history strategy, offsetting the negative effect of small population sizes. The populations are relatively isolated from each other, although the effects of introductions from *ex situ* conservation programmes are clearly evident, and our results do not exclude the possibility of introduced origin of two populations. As further conservation treatment, we recommend maintaining the current measures, as well as closer monitoring of population numbers and treating each population as a separate genetic unit when planning potential future introductions.

Salvia is the largest genus of the Lamiaceae family, with over a thousand species. The unique evolutionary innovation of the genus lies in the flower structure, with modified stamens acting as a kind of lever, whereby the pollinator, in order to reach the nectar, pushes in the lower, sterile connective arm of the stamen, moving the fertile upper connective towards itself, thus depositing the pollen. This lever mechanism has been shown to play a role in speciation events in the genus by allowing sympatrically occurring, co-flowering species to use the same pollinator while avoiding hybridization. In our field studies, we identified a *Salvia* taxon that is virtually indistinguishable from *S. austriaca* looking at only vegetative traits, but has a radically different floral morphology. In the fourth case study, we sought to elucidate the taxonomic placement of this taxon by examining the limits of its geographic distribution based on online photographic databases and our own observations, the morphological differences between it and *S. austriaca* using morphometric methods already tested in the genus, and its genetic relationship to *S. austriaca*

using Bayes-factor species delimitation coupled with the RADseq genomic method, Bayesian species tree reconstruction and molecular dating of the separation of the two taxa. We also discuss the wider applicability of the RADseq method in the genus *Salvia*. We found that the *Salvia* taxon we identified does not co-occur with *S. austriaca*, and while the former occurs in the true steppe zone of the Eurasian steppe, the latter is found in the Pannonian and Eurasian forest-steppe and in the southern Crimean Peninsula. Morphometric analyses showed that while no differences in vegetative characters were observed between the two taxa, significant and consistent differences in floral characters were observed. All of our phylogenomic results supported the separation of the two taxa at the species level, and we estimated the time of their separation to have happened 197,000 years ago, earlier than the separation of two commonly recognized species, *S. pratensis* and *S. nemorosa*. Based on these results, we describe the taxon as a new species for science in the paper on which this case study is based on. The RADseq method has allowed us to delimit species of the *Plethiosphace* section with complete certainty, and we conclude that the method may be useful for revealing the relationships within other sections, or even within the entire *Salvia* genus, with high confidence.

The methods presented in our case studies can be applied most effectively in different areas of botanical research. While the Sanger-sequencing of the nrITS sequence is feasible at low cost and labour investment, it is mostly only suitable for the study of deep phylogenetic splits. The development and subsequent use of microsatellite markers is the most costly, both in terms of time- and labour investment, and therefore (when previously developed markers are not available) their development and use is most cost-effective for studies involving many (hundreds) of individuals or longer-term studies. The RADseq method is also relatively costly and can contain a limited number of individuals

per library (~100), but it requires fairly little labour and the amount of data obtained is orders of magnitude higher than that of the previous two methods. However, this method also has its drawbacks, such as being less suitable for studying deep phylogenetic relationships and that the settings used to process the data can have a strong influence on the results, making it difficult, for example, to compare the results of two population genetic studies with different settings, even within the same species.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Sramkó Gábornak a kutatásaim során nyújtott segítségéért és tanácsaiért. Köszönöm Laczkó Leventének az elmúlt évek során adott tanácsokat és segítőkészségét. Köszönöm Vincze Orsolyának a munkám során nyújtott támogatást. Köszönöm minden társszerzőmnek, akik szakértelmükkel és tanácsaikkal hozzájárultak a munkám színvonalának emeléséhez, Alexandru Sabin Badaraunak, Bereczki Juditnak, Cservenka Juditnak, Ivan Moysiyenkonak, Kuhn Thomasnak, Mátis Attilának, Meglécz Emesének, Molnár V. Attilának, Shyryn Almerikovának, Szabó Annának, Szövényi Péternek. Köszönöm Fekete Rékának, Jordán Sándornak, Süveges Kristófnak és Takács Attilának a terepen nyújtott segítséget.

6. Irodalomjegyzék

- Allard, R. W. és Kahler, A. L. (1971) „Allozyme polymorphisms in plant populations”, in *3rd Stadler Genetics Symposium*. Columbia, Missouri: University of Missouri.
- Allendorf, F. W. (2017) Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*. 26 (2), 420–430.
- Andrews, K. R. és mtsai. (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*. 17 (2), 81–92.
- Armbruster, W. S. (1985) Patterns of character divergence and the evolution of reproductive ecotypes of *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae). *Evolution*. 39 (4), 733–752.
- Armbruster, W. S. (1986) Reproductive interactions between sympatric *Dalechampia* species: are natural assemblages random or organized? *Ecology*. 67 (2), 522–533.
- Armbruster, W. S. (1993) Evolution of plant pollination systems: hypotheses and tests with the neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution*. 47 (5), 1480–1505.
- Armbruster, W. S. és mtsai. (1994) Floral Character Displacement Generates Assemblage Structure of Western Australian Triggerplants (*Stylidium*). *Ecology*. 75 (2), 315–329.
- Armbruster, W. S. és mtsai. (2014) Do specialized flowers promote reproductive isolation? Realized pollination accuracy of three sympatric *Pedicularis* species. *Annals of Botany*. 113 (2), 331–340.
- Arnold, M. L. (1993) *Iris nelsonii* (Iridaceae): Origin and genetic composition of a homoploid hybrid species. *American Journal of Botany*. 80 (5), 577–583.
- Arnold, M. L. és mtsai. (1991) Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88 (4), 1398–1402.
- Arnold, M. L. és Emms, S. K. (1998) Molecular Markers, Gene Flow, and Natural Selection. *Molecular Systematics of Plants II*. 442–458.
- Avery, O. T. és mtsai. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Journal of Experimental Medicine*. 79 (2), 137–158.
- Avise, J. C., Giblin-Davidson, C., és mtsai. (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76 (12), 6694–6698.
- Avise, J. C., Lansman, R. A., és mtsai. (1979) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial dna sequence relatedness in natural populations. I. population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*. 92 (1), 279–295.
- Az Európai Közösségek Tanácsa (1992) *A TANÁCS 92/43/EGK IRÁNYELVE (1992. május 21.) a természetes élőhelyek, valamint a vadon élő állatok és növények védelméről*. Elérhető: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:01992L0043-20070101&from=BG> (Elérés 26 január 2022).
- Baikova, E. (1999) „Some trends of morphological evolution in the genus *Salvia* L. (Lamiaceae).”, in *14th Symposium 'Biodiversitat und Evolutionsbiologie'*. Jena.
- Baikova, E. (2002) Two ways of stamen development in the subgenus *Calosphace* (*Salvia*: Lamiaceae). *Botanicheskii-Zhurnal-(St.-Petersburg)*. 87, 71–78.
- Baikova, E. (2004) Structural types and morphogenesis of stamens in the genus *Salvia* (Lamiaceae). *Botanicheskii-Zhurnal-(St.-Petersburg)*. 89, 881–895.
- Baird, N. A. és mtsai. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*. 3 (10), e3376.
- Bartha, L. és mtsai. (2013) Molecular evidence for reticulate speciation in *Astragalus* (Fabaceae) as revealed by a case study from sect. *Dissitiflori*. *Botany*. 91 (10), 702–714.
- Bartha, L. és mtsai. (2015) Patterns of plastid DNA differentiation in *Erythronium* (Liliaceae) are consistent with allopatric lineage divergence in Europe across longitude and latitude. *Plant Systematics and Evolution*. 301 (6), 1747–1758.

- Bateman, R. M. és mtsai. (2018) Integrating restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) with morphological cladistic analysis clarifies evolutionary relationships among major species groups of bee orchids. *Annals of Botany*. 121 (1), 85–105.
- Beadle, G. W. és Tatum, E. L. (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27 (11), 499.
- Bentham, G. (1848) „*Salvia*”, in A.P. de Candolle (szerk.) *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. 12. kiadás.
- Bentley, D. R. és mtsai. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 456 (7218), 53–59.
- Besnier, F. és Glover, K. A. (2013) ParallelStructure: A R Package to Distribute Parallel Runs of the Population Genetics Program STRUCTURE on Multi-Core Computers. *PLoS ONE*. 8 (7), e70651.
- Bilz, M. és mtsai. (2011) *European Red List of Vascular Plants*. Publications Office of the European Union.
- Black IV, W. C. és mtsai. (2001) Population Genomics: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. *Annual Review of Entomology*. 46 (1), 441–469.
- Bodor, P. és mtsai. (2010) Conservation value of the native Hungarian wild grape (*Vitis sylvestris* Gmel.) evaluated by microsatellite markers. *Vitis*. 49 (1), 23–27.
- Borovics, A. és mtsai. (1997) „Conservation of genetic resources of white oaks and beech in Hungary”, in J. Turok és mtsai. (szerk.) *First EUFORGEN Meeting on Social Broadleaves*. 1997 Bordeaux: European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN).
- Bouckaert, R. és mtsai. (2014) BEAST2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*. 10 (4), e1003537.
- Briggs, D. és Walters, S. M. (2016) *Plant variation and evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Briscoe Runquist, R. és mtsai. (2016) Pollinator-mediated assemblage processes in California wildflowers. *Journal of Evolutionary Biology*. 29, 1045–1058.
- Brown, W. M. és mtsai. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76 (4), 1967–1971.
- Brown, W. M. és Wright, J. W. (1979) Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (Genus *Chenidophorus*). *Science*. 203 (4386), 1247–1249.
- Bryant, D. és mtsai. (2012) Inferring species trees directly from biallelic genetic markers: Bypassing gene trees in a full coalescent analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 29 (8), 1917–1932.
- Cabrera, A. A. és Palsbøll, P. J. (2017) Inferring past demographic changes from contemporary genetic data: A simulation-based evaluation of the ABC methods implemented in DIYABC. *Molecular Ecology Resources*. 17 (6), e94–e110.
- Carlson, E. A. (2004) *Mendel's Legacy: The Origin of Classical Genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Catchen, J. M. és mtsai. (2011) *Stacks*: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes|Genomes|Genetics*. 1 (3), 171–182.
- Celep, F. és mtsai. (2015) *Salvia hasankeyfense* (Lamiaceae), a new species from Hasankeyf (Batman, South-eastern Turkey). *Phytotaxa*. 227 (3), 289–294.
- Chakraborty, R. és Jin, L. (1993) „A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness and population distances”, in *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Basel: Birkhäuser Basel. 153–175.
- Chalub, F. A. C. C. és Rodrigues, J. F. (2011) „Preface”, in *The Mathematics of Darwin's Legacy*. Basel: Springer Basel. 1–6.
- Chapuis, M.-P. és Estoup, A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 24 (3), 621–631.
- Chemomor, O. és mtsai. (2016) Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic Biology*. 65 (6), 997–1008.
- Chessel, D. és mtsai. (2004) The ade4 package-I-One-table methods. *R news*. 4 (1), 5–10.
- Claßen-Bockhoff, R. és mtsai. (2003) The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae) – a review. *Plant Biology*. 5 (1), 33–41.

- Claßen-Bockhoff, R. és mtsai. (2004) The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): A key innovation for adaptive radiation? *Organisms Diversity and Evolution*. 4 (3), 189–205.
- Collins, F. S. és mtsai. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431 (7011), 931–945.
- Comps, B. és mtsai. (1998) Genetic variation in beech populations (*Fagus sylvatica* L.) along the alpine chain and in the Hungarian basin. *Forest Genetics*. 5 (1), 1–9.
- Cornuet, J. M. és mtsai. (2008) Inferring population history with DIYABC: A user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*. 24 (23), 2713–2719.
- Cornuet, J. M. és mtsai. (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics*. 11 (1), 401.
- Cozzolino, S. és Widmer, A. (2005) Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*. 20 (9), 487–494.
- Csergő, A.-M. és mtsai. (2009) Genetic structure of peripheral, island-like populations: a case study of *Saponaria bellidifolia* Sm. (Caryophyllaceae) from the Southeastern Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*. 278 (1–2), 33–41.
- Dahl-Jensen, D. és mtsai. (2013) Eemian interglacial reconstructed from a Greenland folded ice core. *Nature*. 493 (7433), 489–494.
- Danecek, P. és mtsai. (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 27 (15), 2156–2158.
- Darlington, C. D. (1939) *The evolution of genetic systems*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Davey, J. W. és mtsai. (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*. 12 (7), 499–510.
- Delaunay, L. N. (1922) Comparative karyological study of species *Muscari* Mill. and *Bellevalia* Lapeyr. *Bulletin of the Tiflis Botanical Garden*. 2 (1), 1–32.
- Dempster, A. P. és mtsai. (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 39 (1), 1–22.
- Dettori, C. A. és mtsai. (2016) The genetic diversity and structure of the *Ferula communis* L. complex (Apiaceae) in the Tyrrhenian area. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 223, 138–146.
- Dietrich, M. (2006) *From Mendel to Molecules: A Brief History of Evolutionary Genetics*. Dartmouth: Open Dartmouth: Published works by Dartmouth faculty.
- Dobzhansky, T. (1937) *Genetics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Dodsworth, S. (2015) Genome skimming for next-generation biodiversity analysis. *Trends in Plant Science*. 20 (9), 525–527.
- Dong, A.-X. és mtsai. (2018) High-quality assembly of the reference genome for scarlet sage, *Salvia splendens*, an economically important ornamental plant. *GigaScience*. 7 (7), .
- Dow, B. D. és mtsai. (1995) Characterization of highly variable (GA/CT) n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theoretical and Applied Genetics*. 91 (1), 137–141.
- Doyle, J. J., Doyle, J. J. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1911–15.
- Drew, B. T. és mtsai. (2017) *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon*. 66 (1), 133–145.
- Drew, B. T. és Sytsma, K. J. (2012) Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American Journal of Botany*. 99 (5), 933–953.
- Drummond, A. J. és mtsai. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*. 4 (5), e88.
- Earl, D. A. és VonHoldt, B. M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4 (2), 359–361.
- Eaton, D. A. R. és Ree, R. H. (2013) Inferring phylogeny and introgression using RADseq data: an example from flowering plants (*Pedicularis*: Orobanchaceae). *Systematic Biology*. 62 (5), 689–706.
- Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32 (5), 1792–1797.
- Edwards, A. W. (1996) The origin and early development of the method of minimum evolution for the reconstruction of phylogenetic trees. *Systematic biology*. 45 (1), 79–91.
- Eisen, K. E. és Geber, M. A. (2018) Ecological sorting and character displacement contribute to the structure of communities of *Clarkia* species. *Journal of Evolutionary Biology*. 31 (10), 1440–1458.

- Evanno, G. és mtsai. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*. 14 (8), 2611–2620.
- Ewens, W. J. (2011) „What changes has mathematics made to the Darwinian theory?“, in *The Mathematics of Darwin's Legacy*. Basel: Springer Basel. 7–26.
- Excoffier, L. és mtsai. (2005) Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics*. 169 (3), 1727–1738.
- Faircloth, B. C. és mtsai. (2012) Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology*. 61 (5), 717–726.
- Felsenstein, J. (1973) Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology*. 22 (3), 240–249.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17 (6), 368–376.
- Felsenstein, J. (1982) Numerical methods for inferring evolutionary trees. *The Quarterly Review of Biology*. 57 (4), 379–404.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39 (4), 783.
- Fowler, J. C. S. és mtsai. (1988) Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation—A concise review relevant to forensic biology. *Journal of Forensic Sciences*. 33 (5), 1111–1126.
- Freville, H. és mtsai. (2001) Comparative allozyme and microsatellite population structure in a narrow endemic plant species, *Centaurea corymbosa* Pourret (Asteraceae). *Molecular Ecology*. 10 (4), 879–889.
- Gabriellian, E. (2001) The genus *Gladiolus* (Iridaceae) in southern Transcaucasia. *Boccone*. 13, 445–455.
- Galton, F. (1889) *Natural inheritance*. New York: Macmillan and Company.
- García, B. Y. B. és Zamudio, S. (2015) Four new species of *Salvia* (Lamiaceae) from central Mexico. *Phytotaxa*. 217 (1), 35–52.
- Garza, J. C. és Williamson, E. G. (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 10 (2), 305–318.
- Goldstein, D. B. és mtsai. (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*. 139 (1), 463–471.
- Grant, V. (1981) *Plant speciation*. New York: Columbia University Press.
- Grant, V. (1994) Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (1), 3–10.
- Gulyás, G. és mtsai. (2005) Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 47 (2), 61–67.
- György, Z. és mtsai. (2016) Microsatellite markers reveal common East Alpine–Carpathian gene pool for the arctic–alpine *Rhodiola rosea* (Crassulaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 302 (6), 721–730.
- Hamilton, A. P. (1980) „*Gladiolus*“, in *Flora Europaea*, vol 5. *Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)*. Cambridge: Cambridge University Press. 101–102.
- Hamrick, J. L. és Allard, R. W. (1972) Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 69 (8), 2100–2104.
- Hardy, G. H. (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 28 (706), 49–50.
- Harley, R. M. és mtsai. (2004) „Labiatae“, in Kadereit, J. W. (szerk.) *Flowering Plants · Dicotyledons. Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 167–275.
- Harris, H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. 164 (995), 298–310.
- Herraiz-Peñalver, D. és mtsai. (2015) Identification of a hybrid species of sage (*Salvia officinalis* L. × *S. lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*) through the study of the essential oil. *Journal of Essential Oil Research*. 27 (5), 363–372.
- Hihara, S. és mtsai. (2001) A new natural hybrid of *Salvia* (Lamiaceae) from Japan, *Salvia* × *sakuensis*. *Journal of Phytogeography and Taxonomy*. 49, 163–170.
- Hipp, A. L. és mtsai. (2014) A framework phylogeny of the american oak clade based on sequenced RAD data. *PLOS ONE*. 9 (4), e93975.
- Hoang, D. T. és mtsai. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 35 (2), 518–522.

- Hohenlohe, P. A. és mtsai. (2010) Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLOS Genetics*. 6 (2), e1000862.
- Höhn, M. és mtsai. (2005) Genetic analysis of Swiss stone pine populations (*Pinus cembra* L. subsp. *cembra*) from the Carpathians using chloroplast microsatellites. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica*. 1, 39–47.
- Höhn, M. és mtsai. (2009) Variation in the chloroplast DNA of Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) reflects contrasting post-glacial history of populations from the Carpathians and the Alps. *Journal of Biogeography*. 36 (9), 1798–1806.
- Horváth, O. és mtsai. (2020) The phylogenetic position of *Vincetoxicum pannonicum* (Borhidi) Holub supports the species' allopolyploid hybrid origin. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 89 (3).
- Hruby, K. (1962) Key to the supraspecific taxa of the genus *Salvia*. *Preslia*. 34, 368–373.
- Hu, G. X. és mtsai. (2018) Phylogeny and staminal evolution of *Salvia* (Lamiaceae, Nepetoideae) in East Asia. *Annals of Botany*. 122 (4), 649–668.
- Hubby, J. L. és Lewontin, R. C. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. the number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 54 (2), 577.
- Huelsenbeck, J. P. és Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17 (8), 754–755.
- Huxley, J. (1942) *Evolution. The modern synthesis*. Crows Nest: Allen & Unwin.
- Jacob, J. J. és mtsai. (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*. 67 (1), 213–224.
- Jenks, A. A. és mtsai. (2013) Phylogeny of new world *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data. *Journal of Plant Research*. 126 (4), 483–496.
- Jombart, T. (2008) ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24 (11), 1403–1405.
- Kajtoch, Ł. és mtsai. (2016) Phylogeographic patterns of steppe species in Eastern Central Europe: a review and the implications for conservation. *Biodiversity and Conservation*. 25 (12), 2309–2339.
- Kalapos, T. (1998) „A magyarországi husáng (*Ferula sadleriana* Ledeb.) Pilis-tetői populációjának dinamikája”, in Csontos, P. (szerk.) *Sziklagyeppek szünbotanikai kutatása*. Budapest: Scientia Kiadó. 41–54.
- Kalyanamoorthy, S. és mtsai. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14 (6), 587–589.
- Kamvar, Z. N. és mtsai. (2013) The poppr R package for genetic analysis of populations with mixed (clonal/sexual) reproduction. *Phytopathology*. 103 (6), 70.
- Karron, J. D. (1991) „Breeding Systems in Rare Plant Species”, in Falk, D. A. és Holsinger, K. E. (szerk.) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. 87–89.
- Kass, R. E. és Raftery, A. E. (1995) Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association*. 90 (430), 773–795.
- Kassambara, A. és Mundt, F. (2019) *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*.
- Katoh, K. és mtsai. (2009) “Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT.” in Posada, D. (szerk.) *Bioinformatics for DNA sequence analysis*. New York: Humana Press, 39–64.
- Kendall, M. G. (1948) *Rank correlation methods*. Griffin.
- Kereszty, Z. és Galántai, M. (1994) Hazai védett növényfajok ex-situ konzervációja. *Botanikai Közlemények*. 81 (2).
- Khederzadeh, S. és mtsai. (2017) Genetic comparison of Iranian asafetida (*Ferula assa-foetida* L.) populations based on cpDNA ribosomal protein L16 intron. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 5 (4), 577–583.
- Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217 (5129), 624–626.
- Kingman, J. F. C. (1982) On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability*. 19 (A), 27–43.
- Kingman, J. F. C. (2000) Origins of the coalescent: 1974–1982. *Genetics*. 156 (4), 1461–1463.
- Kino, L. M. (1993) Origins of genotypic variation in north american dandelions inferred from ribosomal DNA and chloroplast DNA restriction enzyme analysis. *Evolution*. 47 (1), 136–151.
- Király, G. és mtsai. (2011) *Ferula sadleriana*. The IUCN Red List of Threatened Species: e. T161991A5524668.
- Király, G. (ed. . (2007) *Vörös Lista. A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai. [Red list of the vascular flora of Hungary]*.

- Kishino, H. és mtsai. (2001) Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 18 (3), 352–361.
- Kohn, D. és mtsai. (2005) What Henslow taught Darwin. *Nature*. 436 (7051), 643–645.
- Kolomiychuk, V. és Vynokurov, D. (2016) Syntaxonomy of the Festuco-Brometea class vegetation of the Azov sea coastal zone. *Hacquetia*. 15 (2), 79–104.
- Kraft, N. J. B. és mtsai. (2015) Community assembly, coexistence and the environmental filtering metaphor. *Functional Ecology*. 29, 592–599.
- Kreitman, M. (1983) Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 304 (5925), 412–417.
- Kreitman, M. (2000) Methods to detect selection in populations with applications to the human. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 1 (1), 539–559.
- Kriebel, R. és mtsai. (2019) Tracking temporal shifts in area, biomes, and pollinators in the radiation of *Salvia* (sages) across continents: leveraging anchored hybrid enrichment and targeted sequence data. *American journal of botany*. 106 (4), 573–597.
- Kun, Á. (2017) *Evolúcióbíológia*. Budapest: Typotex.
- Kurzyna-Młynik, R. és mtsai. (2008) Phylogenetic position of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*. 274 (1–2), 47–66.
- Laczko, L. és mtsai. (2019) Is *Nymphaea lotus* var. *thermalis* a Tertiary relict in Europe? *Aquatic Botany*. 155, 1–4.
- Laczko, L. és Sramko, G. (2020) *Hepatica transsilvanica* Fuss (Ranunculaceae) is an allotetraploid relict of the tertiary flora in Europe – Molecular phylogenetic evidence. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 89 (3).
- Lágler, R. és mtsai. (2005) Morphological and molecular analysis of common millet (*P. miliaceum*) cultivars compared to an aDNA sample from the 15th century (Hungary). *Euphytica*. 146 (1–2), 77–85.
- Lander, E. S. és mtsai. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409 (6822), 860–921.
- Larget, B. és Simon, D. L. (1999) Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 16 (6), 750–759.
- Lavrenko, E. M. és mtsai. (1991) *The steppes of the Eurasia*. Leningrad: Nauka.
- Le, S. és mtsai. (2008) FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*. 25 (1), 1–18.
- Leaché, A. D. és mtsai. (2014) Species delimitation using genome-wide SNP data. *Systematic Biology*. 63 (4), 534–542.
- Leaché, A. D. és Oaks, J. R. (2017) The utility of single nucleotide polymorphism (SNP) data in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 48 (1), 69–84.
- Learn, G. H. és Schaal, B. A. (1987) Population subdivision for ribosomal DNA repeat variants in *Clematis fremontii*. *Evolution*. 41 (2), 433.
- Lemmon, A. R. és mtsai. (2012) Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Systematic Biology*. 61 (5), 727–744.
- Lemmon, E. M. és Lemmon, A. R. (2013) High-throughput genomic data in systematics and phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 44, 99–121.
- Lendvay, B. és mtsai. (2013). Characterization of nuclear microsatellite markers for the narrow endemic *Syringa josikaea* Jacq. fil. ex Rchb. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 301–305.
- Lendvay, B. és mtsai. (2014) Genetic structure in *Pinus cembra* from the Carpathian Mountains inferred from nuclear and chloroplast microsatellites confirms post-glacial range contraction and identifies introduced individuals. *Tree Genetics & Genomes*. 10 (5), 1419–1433.
- Lendvay, B. és mtsai. (2016) Phylogeography of *Syringa josikaea* (Oleaceae): Early Pleistocene divergence from East Asian relatives and survival in small populations in the Carpathians, *Biological Journal of the Linnean Society*, 119 (3), 689–703.
- Lendvay, B. és Kalapos, T. (2009) A magyarországi husáng (*Ferula sadleriana*) populációjának állapotfelmérése 2008-ban. *Természetvédelmi Közlemények*. 15, 486–492.
- Lendvay, B. és Kalapos, T. (2014) Population dynamics of the climate-sensitive endangered perennial *Ferula sadleriana* Ledeb. (Apiaceae). *Plant Species Biology*. 29 (2), 138–151.
- Levy, S. E. és Boone, B. E. (2019) Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 9 (7), a025791.

- Lewontin, R. C. és Hubby, J. L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 54 (2), 595.
- Li, H. és Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 25 (14), 1754–1760.
- Li, Q. Q. és mtsai. (2013) Phylogenetic relationships of *Salvia* (Lamiaceae) in China: evidence from DNA sequence datasets. *Journal of Systematics and Evolution*. 51 (2), 184–195.
- Li, S. és mtsai. (2000) Phylogenetic tree construction using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of the American Statistical Association*. 95 (450), 493–508.
- Li, W. és mtsai. (2020) Genetic diversity of the critically endangered *Ferula sinkiangensis* K.M.Shen (Apiaceae) and the implications for conservation. *Turkish Journal of Botany*. 44 (2), 145–152.
- Lippé, C. és mtsai. (2006) High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology*. 15 (7), 1769–1780.
- Malkócs, T. és mtsai. (2019) Isolation and characterization of 15 SSR loci for the endangered European tetraploid species *Gladiolus palustris* (Iridaceae). *Applications in Plant Sciences*. 7 (5) 1–4.
- Malkócs, T. és mtsai. (2020) Development and characterization of novel SSR markers in the endangered endemic species *Ferula sadleriana*. *Applications in Plant Sciences*. 8 (2), 3–6.
- Mamanova, L. és mtsai. (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods*. 7 (2), 111–118.
- Mandel, J. R. és mtsai. (2014) A target enrichment method for gathering phylogenetic information from hundreds of loci: An example from the Compositae. *Applications in Plant Sciences*. 2 (2), 1300085.
- Marchi, A. és mtsai. (2003) Genetic differentiation of two distinct chemotypes of *Ferula communis* (Apiaceae) in Sardinia (Italy). *Biochemical Systematics and Ecology*. 31 (12), 1397–1408.
- Marilaun, A. K. (1891) *Pflanzenleben. Bd. 2. Geschichte der Pflanzen*. Leipzig and Wien: Bibliographisches Institut.
- Martínez-Ambríz, E. és mtsai. (2019) A new species of *Salvia* from the Fulgentes clade (Lamiaceae), from Puebla, Mexico. *Phytotaxa*. 409 (1), 29–38.
- Martínez-Gordillo, M. és mtsai. (2016) *Salvia robertoana* (Lamiaceae), a new species from Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa*. 269 (4), 271–278.
- Mather, K. (1949) *Biometrical genetics. The study of continuous variation*. London: Methuen Co. Ltd.
- Mátis, A. és mtsai. (2017) Validating the systematic placement of *Eriosynaphe* in the genus *Ferula* (Apiaceae: Scandiceae: Ferulinae) linked with the description of *Ferula mikraskythiana* sp. nov. from Romania. *Phytotaxa*. 298 (3), 239.
- Mau, B. és Newton, M. A. (1997) Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 6 (1), 122–131.
- Maxam, A. M. és Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (2), 560–564.
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- McCormack, J. E. és mtsai. (2013) Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 66, 526–538.
- McKain, M. R. és mtsai. (2018) Practical considerations for plant phylogenomics. *Applications in Plant Sciences*. 6 (3), 1–15.
- Megléc, E. és mtsai. (2014) QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Molecular Ecology Resources*. 14 (6), 1302–1313.
- Meirmans, P. G. és Van Tienderen, P. H. (2004) genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*. 4 (4), 792–794.
- Menitkiy, Y. (1987) „*Salvia*”, in A.L. Takhtadjan (szerk.) *Flora Armenii vol. 8*. Erevan: Izdatel'stvo Akademii Nauk Armianskoi SSR.
- Meusel, H. és Jäger, E. (1992) *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora*. Jena: Gustav Fischer.

- Miller, M. A. és mtsai. (2012) „The CIPRES science gateway”, in *Proceedings of the 1st Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment on Bridging from the eXtreme to the campus and beyond - XSEDE '12*. New York: ACM Press.
- Miller, M. R. és mtsai. (2007) Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*. 17 (2), 240–248.
- Moghaddam, M. és Farhadi, N. (2015) Influence of environmental and genetic factors on resin yield, essential oil content and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2 (3), 69–76.
- Molnár V., A. (2003) *Növényritkaságok a Kárpát-medencében*. Szeged: WinterFair Kft.
- Mosolygó-L, Á. és mtsai. (2016) Molecular genetic evidence for allotetraploid hybrid speciation in the genus *Crocus* L. (Iridaceae). *Phytotaxa*. 258 (2), 121–136.
- Mouhaddab, J. és mtsai. (2017) Using microsatellite markers to map genetic diversity and population structure of an endangered Moroccan endemic tree (*Argania spinosa* L. Skeels) and development of a core collection. *Plant Gene*. 10, 51–59.
- Mount, D. M. (2004) *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Muchhala N. és Potts, M. D. (2007) Character displacement among bat-pollinated flowers of the genus *Burmeistera*: analysis of mechanism, process and pattern. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*. 274, 2731–2737.
- Müller, H. (1873) *Die Befruchtung der Blumen durch Insekten und die gegenseitige Anpassung beider*. Leipzig: W. Engelmann.
- Nachychko, V. O. és Sosnovsky, Y. V (2020) On the Romanian endemic species of *Salvia* (Lamiaceae) and its natural hybrids: nomenclatural and taxonomic aspects. *Phytotaxa*. 434 (3), 270–280.
- Nagy, J. és mtsai. (2014) „Új ismeretek a nagymarosi *Ferula sadleriana* Ledeb. előfordulással kapcsolatban (New data on the occurrence of *Ferula sadleriana* Ledeb. from Nagymaros)”, in *Recent Flora- and Vegetation Research in the Carpathian Basin X*. 2014 Sopron: University of West-Hungary, Faculty of Forestry Institute of Botany and Nature Conservation.
- Nagylaki, T. (1989) Gustave Malecot and the transition from classical to modern population genetics. *Genetics*. 122 (2), 253–268.
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106 (949), 283–292.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70 (12), 3321–3323.
- Nei, M. (1983) „Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution”, in Masatoshi Nei és P. K. Koehn (szerk.) *Evolution of Genes and Proteins*. Sunderland: Sinauer Association. 165–190.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nei, M. és mtsai. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*. 19 (2), 153–170.
- Nei, M. és Roychoudhury, A. K. (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 76 (2), 379–390.
- Nguyen, L.-T. és mtsai. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32 (1), 268–274.
- Van der Niet, T. és mtsai. (2014) Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*. 113 (2), 199–212.
- Norton, N. A. és mtsai. (2015) Reproductive character displacement shapes a spatially structured petal color polymorphism in *Leavenworthia stylosa*. *Evolution*. 69 (5), 1191–1207.
- Nyárády, E. G. (1942) Új növények a Délkeleti-Kárpátok és a Feketetenger vidékének flórájához. *Acta Universitatis Szegediensis: sectio scientiarum naturalium: pars botanica* I. III, 31–45.
- Olson, D. M. és mtsai. (2001) Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on Earth: A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience*. 51 (11), 933–938.
- Panahi, M. és mtsai. (2015) Phylogenetic relationships among *Dorema*, *Ferula* and *Leutea* (Apiaceae: Scandiceae: Ferulinae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA noncoding sequences. *Taxon*. 64 (4), 770–783.

- Panahi, M. és mtsai. (2018) Taxonomy of the traditional medicinal plant genus *Ferula* (Apiaceae) is confounded by incongruence between nuclear rDNA and plastid DNA. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 188 (2), 173–189.
- Pante, E. és mtsai. (2015) Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity*. 114, 450–459.
- Paradis, E. (2010) Pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*. 26 (3), 419–420.
- Pascual, M. és mtsai. (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*. 16 (15), 3069–3083.
- Paun, O. és mtsai. (2016) Processes driving the adaptive radiation of a tropical tree (Diospyros, Ebenaceae) in New Caledonia, a biodiversity hotspot. *Systematic Biology*. 65 (2), 212–227.
- Paun, O. és Schönswetter, P. (2012) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. *Methods in molecular biology*. 862, 75–87.
- Pauw, A. (2006) Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (*Rediviva peringueyi*, Melittidae) in a guild of South African orchids (Coryciinae). *American Journal of Botany*. 93 (6), 917–926.
- Peakall, R. és Smouse, P. E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 28 (19), 2537–2539.
- Pearson, K. (1894) Contributions to the mathematical theory of evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. A*. 185, 71–110.
- Pedryc, A. és mtsai. (2006) Characterization of different apricot cultivars grown in Hungary with SSR markers. *Acta Horticulturae*. (725), 691–698.
- Pemberton, J. M. és mtsai. (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*. 4 (2), 249–252.
- Pérez-Collazos, E. és mtsai. (2009) The phylogeographical history of the Iberian steppe plant *Ferula loscosii* (Apiaceae): a test of the abundant-centre hypothesis. *Molecular Ecology*. 18 (5), 848–861.
- Pérez-Collazos, E. és Catalán, P. (2008) Conservation genetics of the endangered Iberian steppe plant *Ferula loscosii* (Apiaceae). *Plant Biology*. 10 (4), 492–501.
- Pető, Á. és mtsai. (2017) The first archaeobotanical evidence of *Lagenaria siceraria* from the territory of Hungary: histology, phytoliths and (a)DNA. *Vegetation History and Archaeobotany*. 26 (1), 125–142.
- Pimenov, M. és Leonov, M. (1993) *The genera of the Umbelliferae: a nomenclator*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Powell, J. R. (1994) „Molecular techniques in population genetics: A brief history”, in Schierwater, B. és mtsai. (szerk.) *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Experientia Supplementum*. Basel: Birkhäuser. 131–156.
- Prakash, S. és mtsai. (1969) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 61 (4), 841.
- Pritchard, J. K. és mtsai. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155 (2), 945–959.
- Puritz, J. B. és mtsai. (2014) Demystifying the RAD fad. *Molecular Ecology*. 23, 5937–5942.
- Queller, D. C. és mtsai. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*. 8 (8), 285–288.
- Radosavljević, I. és mtsai. (2012) Development of new microsatellite markers for *Salvia officinalis* L. and its potential use in conservation-genetic studies of narrow endemic *Salvia brachyodon* Vandas. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (12), 12082–12093.
- Rahali, F. Z. és mtsai. (2016) Metabolite profiles of essential oils and molecular markers analysis to explore the biodiversity of *Ferula communis*: Towards conservation of the endemic giant fennel. *Phytochemistry*. 124, 58–67.
- Rannala, B. (2015) The art and science of species delimitation. *Current Zoology*. 61 (5), 846–853.
- Rannala, B. és Yang, Z. (2003) Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*. 164 (4), 1645–1656.
- Rannala, B. és Yang, Z. (2008) Phylogenetic inference using whole genomes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9, 217–231.

- Rannala, B. és Yang, Z. (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 43 (3), 304–311.
- Raymond, M. és Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86, 248–249.
- Redding, D. W. és Mooers, A. Ø. (2006) Incorporating evolutionary measures into conservation prioritization. *Conservation Biology*. 20 (6), 1670–1678.
- Reith, M. és mtsai. (2007) New insights into the functional morphology of the lever mechanism of *Salvia pratensis* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. 100 (2), 393–400.
- Reuss, G. (1853) *Května Slovenska, čili, Opis všech jevnosnubných na Slovensku divorostaučích a mnohých zahradních zrostlin podlé saustavy De Candolleovy, s připojeným zrostlinářským názvoslovím, slovníkem a návodem k určité zrostlin podlé saustavy Linné-ovy*. Tiskem F. Lorbera.
- Riley, L. és mtsai. (2010) Genetic diversity following demographic recovery in the insular endemic plant *Galium catalinense* subspecies *acrispum*. *Conservation Genetics*. 11 (5), 2015–2025.
- Rivera-Colón, A. G. és mtsai. (2021) Simulation with RADinitio improves RADseq experimental design and sheds light on sources of missing data. *Molecular Ecology Resources*. 21, 363–378.
- Robertson, A. (1905) Cytology and classification. *New Phytologist*. 4 (5–6), 134–139.
- Rochette, N. C. és mtsai. (2019) Stacks2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*. 28, 4737–4754.
- Rousset, F. (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8 (1), 103–106.
- Rummel, J. D. és Roughgarden, J. (1985) A theory of faunal buildup for competition communities. *Evolution*. 39 (5), 1009–1033.
- Saiki, R. K. és mtsai. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230 (4732), 1350–1354.
- Saitou, N. és Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (4), 406–425.
- Sanger, F. és mtsai. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (12), 5463–5467.
- Schaal, B. A. és mtsai. (1987) Ribosomal DNA variation in the native plant *Phlox divaricata*. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (6), 611–611.
- Scharf, S. J. és mtsai. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*. 233 (4768), 1076–1078.
- Schnittler, M. és Günther, K. F. (1999) Central European vascular plants requiring priority conservation measures – an analysis from national Red Lists and distribution maps. *Biodiversity & Conservation* 1999 8:7. 8 (7), 891–925.
- Sersic, A. (2004) Pollination biology in the genus *Calceolaria* L. (Calceolariaceae). *Stapfia*. 82, 1–121.
- She, M.-L. és Watson, M. F. (2005) „*Ferula* L.”, in Wu, ZY és mtsai. (szerk.) *Flora of China*. Beijing: Science Press.
- Shuka, L. és Tan, K. (2009) On the distribution of *Dracocephalum ruyschiana* (Lamiaceae) in the Balkan Peninsula. *Phytologia balcanica*. 15 (3), .
- Simpson, G. G. (1944) *Tempo and mode in evolution*. New York: Columbia University Press.
- Sinama, M. és mtsai. (2011) Challenges of microsatellite development in Lepidoptera: *Euphydryas aurinia* (Nymphalidae) as a case study. *European Journal of Entomology*. 108 (2), 261–266.
- Sites, J. W. és Marshall, J. C. (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 18 (9), 462–470.
- Slatkin, M. és mtsai. (1991) Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. *Systematic Zoology*. 40 (2), 248.
- Smit, A. F. A. és mtsai. (2013) *RepeatMasker v.1.317*.
- Soltis, D. E. és mtsai. (1989) Chloroplast DNA variation in a wild plant, *Tolmiea menziesii*. *Genetics*. 121 (4), 819–826.
- Soltis, D. E. és mtsai. (1991) Chloroplast-DNA variation in *Tellima grandiflora* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany*. 78 (10), 1379–1390.
- Soltis, D. E. és mtsai. (1992) „Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications”, in *Molecular Systematics of Plants*. Boston: Springer. 117–150.

- Soltis, D. E. és mtsai. (1997) Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution*. 206 (1), 353–373.
- Somlyay, L. (2007) A *Ferula sadleriana* Ledeb. „újabb” hazai lelőhelye. *Kiteibelia*. XII. (1), 106–107.
- Sramkó, G. (2008) Az nrITS szekvencia változatosság a mediterrán bangó (*Ophrys L.*) nemzetség poszméhbangó (*O. fuciflora*) fajkomplexében. Debreceni Egyetem.
- Sramkó, G. és mtsai. (2011) Convergent evolution in *Ophrys kotschy* (Orchidaceae) revisited: a study using nrITS and cplGS sequences. *Annales Botanici Fennici*. 48, 97–106.
- Sramkó, G. és mtsai. (2014) Molecular phylogeny and evolutionary history of the Eurasiatic orchid genus *Himantoglossum* s.l. (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 114 (8), 1609–1626.
- Sramkó, G. és mtsai. (2016) Molecular phylogenetics, seed morphometrics, chromosome number evolution and systematics of European *Elatine* L. (Elatinaceae) species. *PeerJ*. 4e2800.
- Sramkó, G., Laczkó, L., és mtsai. (2019) Evolutionary history of the Pasque-flowers (*Pulsatilla*, Ranunculaceae): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 135, 45–61.
- Sramkó, G., Paun, O., és mtsai. (2019) Iterative allogamy–autogamy transitions drive actual and incipient speciation during the ongoing evolutionary radiation within the orchid genus *Epipactis* (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 124 (3), 481–497.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 22 (21), 2688–2690.
- Stange, M. és mtsai. (2018) Bayesian divergence-time estimation with genome-wide single-nucleotide polymorphism data of sea catfishes (Ariidae) supports Miocene closure of the Panamanian Isthmus. *Systematic biology*. 67 (4), 681–699.
- Stebbins, G. L. (1950) *Variation and evolution in plants*. New York: Columbia University Press.
- Steel, M. és Penny, D. (2000) Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*. 17 (6), 839–850.
- Stefanovits-Bányai, É. és mtsai. (2002) Recent developments in biochemical characterization of *Vitis vinifera* L. varieties in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*. 8 (2).
- Straw, R. M. (1956) Floral Isolation in *Penstemon*. *The American Naturalist*. 90 (850), 47–53.
- Strong, D. R. és mtsai. (1979) Test of community-wide character displacement against null hypotheses. *Evolution*. 33 (3), 897.
- Szabó, Z. és mtsai. (2005) Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica*. 146 (1–2), 87–94.
- Szatmári, L. és mtsai. (2021) A comparison of microsatellites and genome-wide SNPs for the detection of admixture brings the first molecular evidence for hybridization between *Mustela eversmanii* and *M. putorius* (Mustelidae, Carnivora). *Evolutionary Applications*. 14 (9), 2286–2304.
- Szatmári, P.-M. (2015) Additional glacial relicts in Carei Plain Natural Protected Area, North-Western Romania. *Acta Horti Botanici Bucurestiensis*. 42 (1), 23–40.
- Szczepaniak, M. és mtsai. (2016) Natural hybridization between *Gladiolus palustris* and *G. imbricatus* inferred from morphological, molecular and reproductive evidence. *Preslia*. 88 (1), 137–161.
- Szítár, K. és Török, K. (2007) Long-term changes in species composition of seven Hungarian rocky grassland communities. *Természetvédelmi Közlemények*. 13, 141–152.
- Tajbakht, P. és mtsai. (2018) Genetic diversity among and within *Ferula asafoetida* H. Karst. populations using molecular and phytochemical markers. *Phytochemistry*. 155 (July), 19–29.
- Takano, A. és Okada, H. (2011) Phylogenetic relationships among subgenera, species and varieties of Japanese *Salvia* L. (Lamiaceae). *Journal of plant research*. 124 (2), 245–252.
- Taysumov, M. A. és mtsai. (2018) On the history of formation and ways of penetration of the relict dendroflora into Chechnya and adjacent territories. *Advances in Engineering Research*. 958–962.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Teisher, J. K. és mtsai. (2017) Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae) and evolution of the twisted geniculate lemma awn. *Annals of Botany*. 120 (5), 725–738.

- Thimm, S. G. (2008) *Pollen-placement and pollen-portioning in diverse Salvia-species*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Thompson, J. D. és mtsai. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22 (22), 4673–4680.
- Thorne, J. L. és mtsai. (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 15 (12), 1647–1657.
- Tóth, E. G. és mtsai. (2017) High genetic diversity and distinct origin of recently fragmented Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations along the Carpathians and the Pannonian Basin. *Tree Genetics and Genomes*. 13 (2), 47.
- Tóth, E. G. és mtsai. (2019) Mid-Pleistocene and Holocene demographic fluctuation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Carpathian Mountains and the Pannonian Basin: Signs of historical expansions and contractions. *Quaternary International*. 504, 202–213.
- Tóth, J. P. és mtsai. (2019) Phylogenetic relationships in the genus *Lethrus* (Coleoptera: Geotrupidae) reveal contrasting evolutionary history in Europe. *Systematic Entomology*. 44 (4), 899–910.
- Trapp, A. (1956a) Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die Antherengestaltung sympetaler Blüten. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 32, 279–312.
- Trapp, A. (1956b) Zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Staubblätter sympetaler Blüten. *Botanische Studien*. 5.
- Troll, W. (1929) *Roscoea purpurea* SM., eine Zingiberacee mit Hebelmechanismus in den Blüten. Mit Bemerkungen über die Entfaltungsbewegungen der fertilen Staubblätter von *Salvia*. *Planta*. 71–78.
- Vardareli, N. és mtsai. (2019) Genetic characterization of tertiary relict endemic *Phoenix theophrasti* populations in Turkey and phylogenetic relations of the species with other palm species revealed by SSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 305 (6), 415–429.
- Venter, J. C. és mtsai. (2001) The sequence of the human genome. *Science*. 291 (5507), 1304–1351.
- Volkova, P. és mtsai. (2020) Out of Colchis: The Colonization of Europe by *Primula vulgaris* Huds. (Primulaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 89 (3).
- Vos, P. és mtsai. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23 (21), 4407–4414.
- Walker, J. B. és mtsai. (2004) *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany*. 91 (7), 1115–1125.
- Walker, J. B. és mtsai. (2015) Unravelling species relationships and diversification within the iconic California Floristic Province sages (*Salvia* subgenus *Audibertia*, Lamiaceae). *Systematic Botany*. 40 (3), 826–844.
- Walker, J. B. és Sytsma, K. J. (2007) Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*. 100 (2), 375–391.
- Waser, N. M. (1983) Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: a review of evidence. *Handbook of experimental pollination biology*. 277–293.
- Watson, J. D. és Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171 (4356), 737–738.
- Wei, Y. K. és mtsai. (2019) *Salvia daiguii* (Lamiaceae): a new species from west Hunan, China. *Edinburgh Journal of Botany*. 76 (3), 359–368.
- Weinberg, W. (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. " (On the detection of heredity in man). *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg*. 64, 368–382.
- Weir, B. S. és Cockerham, C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38, 1358–1370.
- Weiser, E. L. és mtsai. (2013) Simulating retention of rare alleles in small populations to assess management options for species with different life histories. *Conservation Biology*. 27 (2), 335–344.
- Weitemier, K. és mtsai. (2014) Hyb-Seq: Combining target enrichment and genome skimming for plant phylogenomics. *Applications in Plant Sciences*. 2 (9), 1400042.
- Werth, E. (1956) Zur Kenntnis des Androeceums der Gattung *Salvia* und seiner stammesgeschichtlichen Wandlung. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 69, 381–386.

- Wester, P. és Claßen-Bockhoff, R. (2007) Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* Species. *Annals of Botany*. 100 (2), 401–421.
- Wester, P. és Claßen-Bockhoff, R. (2002) *Salvia haenkei* Benth. and *S. orbignaei* Benth.–two ornithophilous species from Bolivia and their hybrids. *Botanikertagung*. 22–27.
- White, T. J. és mtsai. (1990) „Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, in *PCR Protocols*. Elsevier. 315–322.
- Whittemore, A. T. és Schaal, B. A. (1991) Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88 (6), 2540–2544.
- Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag.
- Wiens, J. J. (2007) Species Delimitation: New Approaches for Discovering Diversity. *Systematic Biology*. 56 (6), 875–878.
- Will, M. és Claßen-Bockhoff, R. (2017) Time to split *Salvia* s.l. (Lamiaceae) – New insights from Old World *Salvia* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 109, 33–58.
- Will, M. és Claßen-Bockhoff, R. (2014) Why Africa matters: evolution of Old World *Salvia* (Lamiaceae) in Africa. *Annals of Botany*. 114, 61–83.
- Willis, K. J. és mtsai. (1995) The late Quaternary environmental history of Bátorliget, N.E. Hungary. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 118 (1–2), 25–47.
- Wilson, A. C. és mtsai. (1977) Biochemical Evolution. *Annual Review of Biochemistry*. 46 (1), 573–639.
- Wright, S. (1922) Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*. 56 (645), 330–338.
- Yang, Z. és Rannala, B. (2006) Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. *Molecular Biology and Evolution*. 23 (1), 212–226.
- Yang, Z. és Rannala, B. (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Molecular Biology and Evolution*. 14 (7), 717–724.
- Yang, Z. és Rannala, B. (2010) Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (20), 9264–9269.
- Yang, Z. és Rannala, B. (2012) Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*. 13 (5) 303–314.
- Yanofsky, C. és mtsai. (1964) On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 51 (2), 266.
- Yaqoob, U. és Nawchoo, I. A. (2016) Reproductive ecology of an endangered monocarpic herbaceous perennial, *Ferula jaeschkeana* Vatke. *Tropical Ecology*. 57 (4), 849–864.
- Yates, F. és Mather, K. (1963) Ronald Aylmer Fisher, 1890–1962. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*. 991–129.
- Zalewska, Z. (1928) Recherches sur l'évolution des étamines, considérée du point de vue de leur adaptation à la pollinisation des fleurs de la Sauge (*Salvia*). *Bulletin international de l'Académie polonaise des sciences & des lettres*. 3, 133–160.
- Zelditch, M. és mtsai. (2004) Geometric morphometrics for biologists: A primer. Waltham: Elsevier Academic Press.
- Zuckermandl, E. és Pauling, L. (1965) „Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins”, in *Evolving Genes and Proteins*. Elsevier. 97–166.

7. Szerzői hozzájárulás az egyes esettanulmányokhoz

1. esettanulmány: Laboratóriumi elemzések, Adatelemzés, Kézirat írása
2. esettanulmány: Laboratóriumi elemzések, Adatelemzés, Kézirat írása
3. esettanulmány: Laboratóriumi elemzések, Adatelemzés, Kézirat írása
4. esettanulmány: Terepi mintavételezés, Morfometriai vizsgálatok, Laboratóriumi elemzések, Adatelemzés, Kézirat írása

8. Publikációk listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/172/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Malkócs Tamás
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057910

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Malkócs, T.**, Laczkó, L., Bereczki, J., Meglécz, E., Szövényi, P., Sramkó, G.: Development and characterization of novel markers in the endangered endemic species *Ferula sadleriana*. *Appl Plant Sci.* 8 (2), 1-4, 2020. ISSN: 2168-0450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aps3.11321>
IF: 1.936
2. **Malkócs, T.**, Almerikova, S., Bereczki, J., Cservenka, J., Meglécz, E., Sramkó, G.: Isolation and characterization of 15 SSR loci for the endangered European tetraploid species *Gladiolus palustris* (Iridaceae). *Appl. Plant Sci.* 7 (5), 1-4, 2019. ISSN: 2168-0450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aps3.1245>
IF: 1.591

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

3. Nagy, T., Nótári, K., Takács, A., **Malkócs, T.**, Tökölly, J., Molnár, V. A.: Precipitation and timing of flowering in ghost orchids (*Epipogium aphyllum* Sw.). *Acta bot. Hung.* 60 (1-2), 223-230, 2018. ISSN: 0236-6495.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/034.60.2018.1-2.10>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

4. **Malkócs, T.**, Viricel, A., Becquet, V., Evin, L., Dubillot, E., Pante, E.: Complex mitogenomic rearrangements within the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *BMC Ecol Evo.* 22 (1), 1-21, 2022. EISSN: 2730-7182.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-022-01976-0>





5. Fekete, R., Bódis, J., Fülöp, B., Süveges, K., Urgyán, R., **Malkócs, T.**, Vincze, O., Silva, L., Molnár, V. A.: Roadsides provide refuge for orchids: characteristic of the surrounding landscape.
Ecol. Evol. 10, 13236-1324, 2020. ISSN: 2045-7758.
IF: 2.912
6. Jamieson, A. J., **Malkócs, T.**, Piernéy, S. B., Fujii, T., Zhang, Z.: Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna.
Nat. Ecol. Evol. 1 (3), 1-4, 2017. EISSN: 2397-334X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-016-0051>

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

7. **Malkócs, T.**, Almerikova, S., Laczkó, L., Meglécz, E., Cservenka, J., Bereczki, J., Sramkó, G.: A *Gladiolus palustris* populációgenetikai vizsgálata a Kárpát-medencében = The population genetic structure of *Gladiolus palustris* in the Carpathian Basin.
In: XII. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia : program és összefoglalók : Debrecen, 2018. február 23-25. = 12th International Conference "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-Pannonian region" : programme and abstracts : Debrecen, 23-25 February 2018. Szerk.: Molnár V. Attila, Sonkoly Judit, Takács Attila, DE TTK Növénytan Tanszék, Debrecen, 38, 2018. ISBN: 9789634739265

Ismeretterjesztő, népszerűsítő cikkek (1)

8. Bak, H., Fekete, R., **Malkócs, T.**, Süveges, K.: Olajligetek és orchideák.
Egy. Élet. 58 (9), 26-27, 2020. ISSN: 0230-7731.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,439

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,527

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

Debrecen, 2022.04.11.





Registry number: DEENK/172/2022.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Tamás Malkócs

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

MTMT ID: 10057910

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Malkócs, T.**, Laczkó, L., Bereczki, J., Meglécz, E., Szövényi, P., Sramkó, G.: Development and characterization of novel markers in the endangered endemic species *Ferula sadleriana*.
Appl Plant Sci. 8 (2), 1-4, 2020. ISSN: 2168-0450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aps3.11321>
IF: 1.936
2. **Malkócs, T.**, Almerekova, S., Bereczki, J., Cservenka, J., Meglécz, E., Sramkó, G.: Isolation and characterization of 15 SSR loci for the endangered European tetraploid species *Gladiolus palustris* (Iridaceae).
Appl. Plant Sci. 7 (5), 1-4, 2019. ISSN: 2168-0450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aps3.1245>
IF: 1.591

List of other publications

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

3. Nagy, T., Nótári, K., Takács, A., **Malkócs, T.**, Tököllyi, J., Molnár, V. A.: Precipitation and timing of flowering in ghost orchids (*Epipogium aphyllum* Sw.).
Acta bot. Hung. 60 (1-2), 223-230, 2018. ISSN: 0236-6495.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/034.60.2018.1-2.10>

Foreign language scientific articles in international journals (3)

4. **Malkócs, T.**, Viricel, A., Becquet, V., Evin, L., Dubillot, E., Pante, E.: Complex mitogenomic rearrangements within the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia).
BMC Ecol Evo. 22 (1), 1-21, 2022. EISSN: 2730-7182.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-022-01976-0>





5. Fekete, R., Bódis, J., Fülöp, B., Süveges, K., Urgyán, R., **Malkócs, T.**, Vincze, O., Silva, L., Molnár, V. A.: Roadsides provide refuge for orchids: characteristic of the surrounding landscape.
Ecol. Evol. 10, 13236-1324, 2020. ISSN: 2045-7758.
IF: 2.912
6. Jamieson, A. J., **Malkócs, T.**, Piernay, S. B., Fujii, T., Zhang, Z.: Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna.
Nat. Ecol. Evol. 1 (3), 1-4, 2017. EISSN: 2397-334X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-016-0051>

Hungarian abstracts (1)

7. **Malkócs, T.**, Almerekova, S., Laczkó, L., Meglécz, E., Cservénka, J., Bereczki, J., Sramkó, G.: A *Gladiolus palustris* populációgenetikai vizsgálata a Kárpát-medencében = The population genetic structure of *Gladiolus palustris* in the Carpathian Basin.
In: XII. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia : program és összefoglalók : Debrecen, 2018. február 23-25. = 12th International Conference "Advances in research on the flora and vegetation of the Carpatho-Pannonian region" : programme and abstracts : Debrecen, 23-25 February 2018. Szerk.: Molnár V. Attila, Sonkoly Judit, Takács Attila, DE TTK Növénytan Tanszék, Debrecen, 38, 2018. ISBN: 9789634739265

Informational/educational articles (1)

8. Bak, H., Fekete, R., **Malkócs, T.**, Süveges, K.: Olajligetek és orchideák.
Egy. Élet. 58 (9), 26-27, 2020. ISSN: 0230-7731.

Total IF of journals (all publications): 6,439

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 3,527

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

11 April, 2022



9. Függelék

1. Függelék Lelőhely és voucher információ az 1. esettanulmányban felhasznált *Gladiolus* egyedekhez.

Faj	Lelőhely, ISO országkód	N	Geokoordináták	Voucher ^a
<i>Gladiolus tenuis</i>	Horodyshe, UA	1	49°02'19,4" N, 39°39'32,7" E	DE-Soo-45670
<i>Gladiolus tenuis</i>	Krasny Kurgan, RU	1	43°58'19,8" N, 42°35'54,8" E	DE-Soo-45671
<i>Gladiolus tenuis</i>	Mikhaylovka, RU	1	49°50'19,3" N, 43°07'48,9" E	DE-Soo-45672
<i>Gladiolus imbricatus</i>	Prejmer, RO	1	45°43'36,8" N, 25°44'04,5" E	DE-Soo-45681
<i>Gladiolus imbricatus</i>	Lunca de Jos, RO	1	46°34'18,2" N, 25°59'22,9" E	DE-Soo-45679
<i>Gladiolus imbricatus</i>	Zakopane, PL	1	49°16'40,7" N, 19°54'11,0" E	DE-Soo-45682
<i>Gladiolus imbricatus</i>	Komlóska-Újhuta, Zsidó-rét, HU	1	48°21'58,8" N, 21°28'23,0" E	DE-Soo-09423
<i>Gladiolus imbricatus</i>	Cluj-Napoca, Valea morilor, RO	1	46°41'51,5" N, 23°35'56,4" E	DE-Soo-38677
<i>Gladiolus palustris</i> ^{b,d}	Raposka, HU	25	46°51'39,9" N, 17°25'01,3" E	DE-Soo-45673
<i>Gladiolus palustris</i> ^c	Nyirád, HU	20	47°00'02,1" N, 17°25'31,5" E	DE-Soo-45674
<i>Gladiolus palustris</i> ^d	Bátonyterenye, Lengyendi-Galya, HU	12	47°55'05,8" N, 19°54'12,8" E	DE-Soo-09419
<i>Gladiolus palustris</i> ^d	Ásotthalom: Csodarét, HU	1	46°11'55,0" N, 19°49'48,1" E	DE-Soo-45683
<i>Gladiolus palustris</i> ^d	Schwangau, DE	1	47°33'38,5" N, 10°43'53,7" E	DE-Soo-45684
<i>Gladiolus palustris</i> ^d	Augsburg, DE	1	48°18'24,3" N, 10°55'43,2" E	DE-Soo-45685

Megjegyzés: N = egyedszám.

^a A voucher egyedek a Debreceni Egyetem (DE) herbáriumában találhatóak.

^b Ezen populációból származó öt egyedben kerestünk polimorf markereket.

^c Ezen populációból egy egyedden végeztük a kezdeti, specifikus PCR amplifikációt 46 primerrel.

^d Ezen populációból egy egyed genomi DNS-e lett felhasználva a 454 piroszekvenáló könyvtár készítéséhez.

2. Függelék Multiplex csoportok és lókuszonkénti PCR-termék mennyiségek az 1. esettanulmányban.

Multiplex 1:

Lókusz	Fluoreszcens festék	Allél méret (bp)	Hozzáadott mennyiség (μL)
GI Pal03	NED TM	211	3,50
GI Pal04	6FAM TM	137	2,50
GI Pal13	6FAM TM	95–107	1,50
GI Pal14	6FAM TM	189–207	2,00
GI Pal21	NED TM	122–142	2,50
GI Pal22	6FAM TM	293–305	3,00
GI Pal41	PET TM	287	2,00
GI Pal42	VIC®	242–251	1,50

Multiplex 2:

Lókusz	Fluoreszcens festék	Allél méret(bp)	Hozzáadott mennyiség (μL)
GI Pal01	PET TM	201	1,50
GI Pal08	VIC®	137–141	2,00
GI Pal11	PET TM	136–138	2,50
GI Pal24	VIC®	291–297	4,00
GI Pal37	NED TM	261–270	2,00
GI Pal39	6FAM TM	238–240	3,00
GI Pal46	VIC®	207–219	2,00

3. Függelék

Lelőhely és voucher információ a 2. esettanulmányban felhasznált *Ferula* populációkhoz.

Faj	Lelőhely, ISO országkód	Geokoordináták	Voucher ^a
<i>Ferula sadleriana</i>	Pilis-tető, HU ^{1,3}	47°40'51,17" N, 18°52'47,28" E	DE-Soo-45690
<i>Ferula sadleriana</i>	Pisznice, HU ¹	47°41'59,06" N, 18°29'27,49" E	DE-Soo-45689
<i>Ferula sadleriana</i>	Konyári-fennsík, SK ¹	48°34'29,35" N, 20°23'09,96" E	DE-Soo-45687
<i>Ferula sadleriana</i>	Tordai-hasadék, RO ²	46°33'31,27" N, 23°40'56,32" E	DE-Soo-45691
<i>Ferula soongarica</i>	Katon-Karagay, KZ	49°13'14,66" N, 85°46'55,45" E	DE-Soo-45033
<i>Ferula soongarica</i>	Markakol: Uspenka, KZ	48°30'11,92" N, 85°53'16,15" E	DE-Soo-45692
<i>Ferula soongarica</i>	Ust'-Kamenogorsk, KZ	50°02'51,72" N, 81°23'19,39" E	DE-Soo-45028
<i>Ferula tatarica</i>	Strilcovskaya steppe, UA	49°17'03,87" N, 40°02'04,73" E	DE-Soo-45688
<i>Ferula tatarica</i>	Kalach-na-Donu, RS	48°41'16,44" N, 43°27'13,03" E	DE-Soo-45038
<i>Ferula tatarica</i>	Danilovka valley, RS	50°34'24,40" N, 45°39'36,05" E	DE-Soo-45037

^a A voucher egyedek a Debreceni Egyetem herbáriumában (DE) találhatóak meg.

¹ Ezen populációból egy egyed lett felhasználva a primerfejlesztés kezdeti lépéseként készített Nextera szekvenáló-könyvtár elkészítéséhez.

² Ezen populációból származó egy egyeden teszteltük a 44 primerpár specifikus amplifikációját.

³ Ezen populációból származó öt egyeden lett tesztelve a specifikusan amplifikálódó primerek populációs szintű variabilitása.

4. Függelék

Az nrITS filogenetikai elemzéshez felhasznált *Ferula* egyedek és külsoportok listája, benne a taxon nevével, a törzsfán szereplő névvel, GenBank azonosítóval és a szekvencia forrásával.

A táblázat elérhető:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1oXTsGbbK3biySq6fuodtl_6iS5NueTmh/edit?usp=sharing&ouid=114405304670162720162&rtpof=true&sd=true

5. Függelék Demográfiai forgatókönyvek az első DIYABC-elemzéshez, ahol minden effektív populációméretet egy szín jelöl. Az y tengelyen található jelölések megfelelnek egy-egy koaleszcens eseménynek. A jelölések közötti távolság nem arányos az események között eltelt idővel.

Az ábra elérhető:

<https://drive.google.com/file/d/163piBaz0oKGOSugSB1WbVNWGAWy5mPV/P/view?usp=sharing>

6. Függelék Prior eloszlások az első DIYABC elemzéshez (5. Függelék). N: effektív populációméret; t: koaleszcencia esemény ideje, generációkban megadva; ra: keveredési ráta.

Paraméter	Prior eloszlás	Feltételek
Bélkő (N1)	Uniform (100–5000)	
Kis-Kevély (N2)	Uniform (5–1000)	
Konyári-fennsík (N3)	Uniform (100–5000)	
Nagymaros (N4)	Uniform (5–1000)	
Pilis-tető (N5)	Uniform (2000–10000)	
Pisznice (N6)	Uniform (100–5000)	
Pelsőci-fennsík (N7)	Uniform (100–5000)	
Tordai-hasadék (N8)	Uniform (100–5000)	
t1	Uniform (5–2000)	
t2	Uniform (5–2000)	$t2 \geq t1$
t3	Uniform (10–5000)	$t3 \geq t2$; $t3 > t1$
t4	Uniform (10–5000)	$t4 > t1$
t5	Uniform (10–5000)	$t5 \geq t4$; $t5 > t2$; $t5 > t1$
t6	Uniform (10–5000)	$t6 > t1$
ra	Uniform (0,001–0,999)	

7. Függelék Demográfiai forgatókönyvek a második DIYABC-elemzéshez, ahol minden effektív populációméretet egy szín jelöl. Az y tengelyen található jelölések megfelelnek egy-egy koaleszcens eseménynek. A jelölések közötti távolság nem arányos az események között eltelt idővel.

Az ábra elérhető: https://drive.google.com/file/d/1aXSDV-3z5EBVX3vCXG56AQfGQ_J1DqyQ/view?usp=sharing

8. Függelék Prior eloszlások a második DIYABC elemzéshez (7. Függelék). N: effektív populációméret; t: koaleszcencia esemény ideje, generációkban megadva; ra, rb: keveredési ráta.

Paraméter	Prior eloszlás	Feltételek
Bélkő (N1)	Uniform (100–5000)	
Kis-Kevély (N2)	Uniform (5–1000)	
Konyári-fennsík (N3)	Uniform (100–5000)	
Nagymaros (N4)	Uniform (5–1000)	
Pilis-tető (N5)	Uniform (2000–10000)	
Pisznice (N6)	Uniform (100–5000)	
Pelsőci-fennsík (N7)	Uniform (100–5000)	
Tordai-hasadék (N8)	Uniform (100–5000)	
N9	Uniform (100–5000)	
N10	Uniform (100–5000)	
t1	Uniform (5–2000)	
t2	Uniform (5–2000)	
t3	Uniform (5–2000)	t3>t2
t4	Uniform (5–5000)	t4>=t3; t4>t2
t5	Uniform (10–5000)	t5>t4; t5>t3; t5>t2; t5>t1
t6	Uniform (10–10000)	t6>t1; t6>t2; t6>t3; t6>t4; t6>t5
t7	Uniform (10–10000)	t7>t1; t7>t2; t7>t3; t7>t6
t8	Uniform (10–10000)	t8>t1; t8>t2; t8>t7
t9	Uniform (10–10000)	
ra	Uniform (0,001–0,999)	
rb	Uniform (0,001–0,999)	

9. Függelék Prior eloszlások a harmadik DIYABC elemzéshez (2. ábra). N: effektív populációméret; t: koaleszcencia esemény ideje, generációkban megadva; ra: keveredési ráta.

Paraméter	Prior eloszlás	Feltételek
Bélkő (N1)	Uniform (100–5000)	
Kis-Kevély (N2)	Uniform (5–1000)	
Konyári-fennsík (N3)	Uniform (100–5000)	
Nagymaros (N4)	Uniform (5–1000)	
Pilis-tető (N5)	Uniform (2000–10000)	
Pisznice (N6)	Uniform (100–5000)	
Pelsőci-fennsík (N7)	Uniform (100–5000)	
Tordai-hasadék (N8)	Uniform (100–5000)	
N2b	Uniform (2000–10000)	
N3b	Uniform (10–10000)	
N1b	Uniform (10–20000)	
N1c	Uniform (10–20000)	
N1d	Uniform (10–20000)	
N1e	Uniform (10–20000)	
t1	Uniform (5–2000)	
t2	Uniform (5–2000)	
t3	Uniform (5–2000)	
t4	Uniform (5–5000)	t4>t3; t4>t2
t5	Uniform (10–5000)	t5>t2
t6	Uniform (10–10000)	t6>t1
t7	Uniform (10–10000)	
ra	Uniform (0,001–0,999)	

10. Függelék Legnagyobb valószínűség (ML) alapú filogenetikai fa, amelyet a *Ferula* nemzetségből származó 243 nrITS szekvenciából generáltunk. A szürke kiemelés jelöli a *Ferula* „A” kládját vagy *Peucedanoides* fajsorát. A 0 ághosszúságú ágakat összezsúrtuk és szürke háromszögekkel jelöltük. Az 50-nél kisebb bootstrap támogatási értékkel rendelkező elágazásokat töröltük. A bootstrap értékek az ágak alatt vannak feltüntetve. Az ebben a tanulmányban generált új szekvenciák piros színnel vannak jelölve.

Az ábra elérhető: <https://drive.google.com/file/d/1AEIbd-M2M85z3TCiPBjd6MM-FfJbc2G7/view?usp=sharing>

11. Függelék Populációnkénti allélgazdagság értékek az összes lókuszra vonatkoztatva.

Az ábra elérhető:

https://drive.google.com/file/d/1Zn8_iGFyLp95W413iYXFNjtlOBWQ-OdK/view?usp=sharing

12. Függelék Genotípus halmozódási görbék az összes mintázott egyedre és külön-külön az egyes populációkra. Az x tengelyen a lókuszok számát, az y tengelyen pedig a multilókusz genotípusok számát tüntettük fel.

Az ábra elérhető:

https://drive.google.com/file/d/1uXZcaO6j_kaDMIzCdLrTOxHFzkn4HipM/view?usp=sharing

13. Függelék A FreeNA nyers kimeneti értékei, az EM algoritmussal becsült eredeti és korrigált allélfrekvenciákkal, kiegészítve a null allélfrekvenciákkal.

A táblázat elérhető:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1WwdGBWIY4REmI8XfFxpAE312-Qf-Yv9Q/edit?usp=sharing&ouid=114405304670162720162&rtpof=true&sd=true>

14. Függelék Az első DIYABC elemzésben (5. Függelék) 10^5 szimulált adatsor populációgenetikai paraméterei prior eloszlásának főkomponens elemzése. A kis körök a szimulált adatsorokat jelölik, minden szín egy-egy különböző forgatókönyvnek felel meg. A nagy sárga kör a megfigyelt adatsort jelöli.

Az ábra elérhető:

<https://drive.google.com/file/d/1GZSnzTmBPpvGdL3j9d1GqNN5fnQEnbpe/view?usp=sharing>

15. Függelék Az első DIYABC elemzésben (5. Függelék) a modellellenőrzéshez használt populációgenetikai paraméterek főkomponens-elemzése a kiválasztott forgatókönyv (8. forgatókönyv) alapján. A kis kék körök a prior eloszlásból mintázott 10^3 szimulált adatsort jelölik. A nagy, teli kék körök 10^3 szimulált adatsor képviselnek, amelyeket a posztterior eloszlásból mintáztunk. A nagy sárga kör a megfigyelt adatsornak felel meg.

Az ábra elérhető: https://drive.google.com/file/d/1Ej_-dP9aphKRDCi45M-t-vTV87Gsk_jf/view?usp=sharing

16. Függelék A második DIYABC elemzésben (7. Függelék) 10^5 szimulált adatsor populációgenetikai paraméterei prior eloszlásának főkomponens elemzése. A kis körök

a szimulált adatkészleteket jelölik, minden szín egy-egy különböző forgatókönyvnek felel meg. A nagy sárga kör a megfigyelt adatsort jelöli.

Az ábra elérhető:

<https://drive.google.com/file/d/16aP6Ip0CcT5nYljnKfAyaqaNSIE5Ox9b/view?usp=sharing>

17. Függelék A második DIYABC elemzésben (7. Függelék) a modellellenőrzéshez használt populációgenetikai paraméterek főkomponens-elemzése a kiválasztott forgatókönyv (1. forgatókönyv) alapján. A kis zöld körök a prior eloszlásból mintázott 10^3 szimulált adatsort jelölik. A nagy, teli zöld körök 10^3 szimulált adatsor képviselnek, amelyeket a poszterior eloszlásból mintáztunk. A nagy sárga kör a megfigyelt adatsornak felel meg.

Az ábra elérhető: <https://drive.google.com/file/d/1RW9h5e3ahj43-cA5nIJAgnydynHZkVxF/view?usp=sharing>

18. Függelék A harmadik DIYABC elemzésben (2. ábra) 10^5 szimulált adatsor populációgenetikai paraméterei prior eloszlásának főkomponens elemzése. A kis zöld körök a szimulált adatsorokat jelölik. A nagy sárga kör a megfigyelt adatsort jelöli.

Az ábra elérhető:

https://drive.google.com/file/d/1a18rASrSx2ZHZ_MG6BDOW1cEeGhlbimH/view?usp=sharing

19. Függelék A harmadik DIYABC elemzésben (2. ábra) a modellellenőrzéshez használt populációgenetikai paraméterek főkomponens-elemzése. A kis zöld körök a prior eloszlásból mintázott 10^5 szimulált adatsort jelölik. A nagy, teli zöld körök 10^5 szimulált adatsor képviselnek, amelyeket a poszterior eloszlásból mintáztunk. A nagy sárga kör a megfigyelt adatsornak felel meg.

Az ábra elérhető: <https://drive.google.com/file/d/1RP17ujsocAVgOO5oy24wKvXi2Ci-hlxU/view?usp=sharing>

20. Függelék A negyedik esettanulmányban felhasznált *Salvia austriaca* és *Salvia* FVPD előfordulások földrajzi koordinátái, az előfordulások forrásának feltüntetésével.

A táblázat elérhető: https://docs.google.com/document/d/1cSiqZKQaq0W-wrzbHgcccPHOSqfxQL0_G/edit?usp=sharing&oid=114405304670162720162&rtpof=true&sd=true

21. Függelék A negyedik esettanulmányban felhasznált genetikai minták földrajzi koordinátái és herbáriumai azonosítói.

Azonosító	Taxon	Lelőhely	Földrajzi szélesség	Földrajzi hosszúság	Herbáriumai azonosítója
ausJoz1	<i>Salvia austriaca</i>	Debrecen-Józsa (HU)	47,590784	21,585314	DE-Soo-48344
ausJoz2	<i>Salvia austriaca</i>	Debrecen-Józsa (HU)	47,590784	21,585314	DE-Soo-48345
ausKol1	<i>Salvia austriaca</i>	Cluj-Napoca: Valea Calda (RO)	46,808743	23,696131	DE-Soo-48356
ausKol2	<i>Salvia austriaca</i>	Cluj-Napoca: Valea Calda (RO)	46,808743	23,696131	DE-Soo-48357
ausSar1	<i>Salvia austriaca</i>	Sárkeresztúr (HU)	47,000761	18,530032	DE-Soo-48348
perBoz1	<i>Salvia FVPD</i>	Bozhurluka (BG)	43,414276	25,401062	DE-Soo-48352
perBoz2	<i>Salvia FVPD</i>	Bozhurluka (BG)	43,414276	25,401062	DE-Soo-48353
perEfo1	<i>Salvia FVPD</i>	Eforie Sud (RO)	44,037856	28,621514	DE-Soo-48358
perHag1	<i>Salvia FVPD</i>	Hagieni reserve (RO)	43,804756	28,472409	DE-Soo-48359
perHag2	<i>Salvia FVPD</i>	Hagieni reserve (RO)	43,804756	28,472409	DE-Soo-48360
perMyk1	<i>Salvia FVPD</i>	Mykhaylivskyi steppe (UA)	47,41983	31,6248	DE-Soo-48342
perMyk2	<i>Salvia FVPD</i>	Mykhaylivskyi steppe (UA)	47,41983	31,6248	DE-Soo-48343
nemo01	<i>Salvia nemorosa</i>	Gostilya (BG)	43,55384	24,16401	DE-Soo-45265
nemo02	<i>Salvia nemorosa</i>	Gostilya (BG)	43,55321	24,16134	DE-Soo-48351
nutHus01	<i>Salvia nutans</i>	Huși (RO)	46,695141	28,104288	DE-Soo-48349
nutHus16	<i>Salvia nutans</i>	Huși (RO)	46,695141	28,104288	DE-Soo-48350
nutUfa01	<i>Salvia nutans</i>	Ufa: Kipchak-Askarovo (RS)	53,9495	55,05375	DE-Soo-48354
nutUfa10	<i>Salvia nutans</i>	Ufa: Kipchak-Askarovo (RS)	53,9495	55,05375	DE-Soo-48355
prat01	<i>Salvia pratensis</i>	Debrecen-Józsa (HU)	47,5852	21,5874	DE-Soo-48346
prat02	<i>Salvia pratensis</i>	Debrecen-Józsa (HU)	47,5852	21,5874	DE-Soo-48347

^a: A voucherek a Debreceni Egyetem Soó Rezső herbáriumában találhatóak.

22. Függelék Bayesiánus Információs Kritérium (BIC) értékek a k-átlag klaszterező elemzésben, 1 és 10 közötti K értékekre.

Az ábra elérhető:

https://drive.google.com/file/d/1JE8l7q3VdcuMIFVdr_IVm1QBxWZSPSRy/view?usp=sharing

23. Függelék Poszterior besorolási valószínűség értékek négy főkomponens első két diszkrimináló függvénye alapján, a k-átlag klaszterező elemzés csoportjait használva, 4, 6 és 7 K értékeknél.

Az ábra elérhető:

<https://drive.google.com/file/d/1vrRBEDlrMqWoFL6kXxGd4EtAcaGWf-wl/view?usp=sharing>