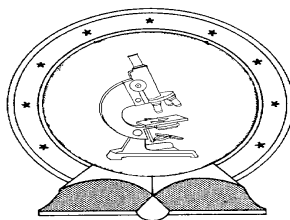


DE TTK



1949

**A *Crocus vernus* (Iridaceae) fajcsoport Kárpát-medencei
fajainak molekuláris taxonómiája**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Mosolygó-Lukács Ágnes

Témavezető
Dr. Surányi Gyula
egyetemi adjunktus

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2016.

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

Debrecen, 2016. március 08.

.....
Mosolygó-Lukács Ágnes

*Tanúsítom, hogy **Mosolygó-Lukács Ágnes** doktorjelölt 2010-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

Debrecen, 2016. március 08.

.....
Dr. Surányi Gyula

**A *Crocus vernus* (Iridaceae) fajcsoport Kárpát-medencei fajainak
molekuláris taxonómiája**

**Molecular taxonomy of the *Crocus vernus* species complex in the
Carpathian Basin**

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

Írta: Mosolygó-Lukács Ágnes
okleveles biológus –ökológus és -biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász Nagy Pál Doktori Iskolája
(Biológia Doktori program) keretében

Témavezető:

Dr. Surányi Gyula

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:

tagok:

..... ..

A doktori szigorlat időpontja:.....

Az értekezés bírálói:

..... ..

..... ..

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

..... ..

..... ..

..... ..

Az értekezés védésének időpontja:..... ..

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
2.	Irodalmi áttekintés.....	4
	A <i>Crocus</i> nemzetség bemutatása	4
	A <i>Crocus vernus</i> fajcsoport bemutatása.....	7
	A hazai <i>Crocus</i> fajok természetvédelmi besorolása és a természetvédelmi genetikai alapfogalmai	14
	AFLP.....	15
3.	Anyag és Módszer	18
	Növényi minták.....	18
	DNS izolálás	21
	AFLP	23
	AFLP elővizsgálatok	23
	AFLP vizsgálatok a teljes adatsoron.....	25
	Kloroplaszt szekvencia analízis	27
	Adatelemzés.....	28
	AFLP adatok elemzése	28
	Kloroplaszt szekvencia adatok elemzése.....	30
	Citológiai vizsgálat	30
4.	Eredmények	31
	AFLP vizsgálatok.....	31
	AFLP elővizsgálatok	31
	AFLP vizsgálatok a teljes adatsoron.....	33
	Szekvencia alapú vizsgálatok eredményei.....	39
	Citológiai vizsgálatok eredményei.....	40
5.	Diszkusszió	41
	A <i>Crocus vernus</i> fajcsoport Kárpát-medencében előforduló fajainak genetikai variabilitása.....	41
	Vizsgálataink alapján levonható taxonómiai következtetések	46
	Allotetraploid fajkeletkezés a <i>Crocus vernus</i> fajcsoportban.....	47
6.	Összefoglalás	51
7.	Summary	53
8.	Köszönetnyilvánítás.....	56
9.	Irodalomjegyzék	57
10.	Függelék.....	65

Rövidítések jegyzéke

APG	Angiosperm Phylogeny Group
AFLP	Amplified fragment length polymorphism = Amplifikált Fragmenthossz Polimorfizmus
bp	Bázispár
CTAB	Cetil-trimetil-ammónium-bromid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EDTA	Etiléndiamintetraecetsav
ESU	Evolutionarily Significant Unit = Evolúciósan szignifikáns egység
ETS	External Transcribed Spacer = génen kívüli átírt szekvenciák
ICUN	International Union for Conservation of Nature
FCU	Functional Conservation Unit = Funkcionális konzervációs egység
ITS	Internal Transcribed Spacer = átírt köztes szekvenciák
HPLC	High Performance Liquid Chromatography = Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
KöM	Környezetvédelmi Minisztérium
MP	Maximum Parszimónia
NJ	Neighbour-Joining = Szomszéd összevonás
PcoA	Principle Coordinate Analysis = Főkoordináta analízis
PCR	Polimerase Chain Reaction = Polimeráz láncreakció

PVP	Polivinil-pirrolidon
SDS	Nátriumdodecilszulfát
s.s.	<i>Sensu stricto</i> = szűkebb értelemben véve
TBE	Tris-bórsav-EDTA
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean = Csoportátlag eljárás
UV	ultraivola sugárzás

1. Bevezetés

A *Crocus vernus* fajcsoport morfológiailag és citogenetikailag rendkívül változatos növénycsoport, amelynek nevezéktani története több mint 200 éves múltra tekint vissza. Mióta az angol író és botanikus John Hill a tavasszal virágzó svájci sáfrányokat *Crocus vernus* névvel illette, több mint 30 szerző 28 különböző fajt, alfajt vagy változatot közölt a fajcsoport elterjedési területéről. Ezek a leírások alapvetően morfológiai és citogenetikai bélyegek alapján különítették el a taxonokat. A molekuláris biológiai módszerek robbanásszerű fejlődésével és a PCR alapú technikák rutinszerű alkalmazásával a növényi molekuláris taxonómiai és filogenetikai vizsgálatok új lehetőséget adtak a botanikusok számára a bizonytalan és nehezen értelmezhető növénycsoportok rendszertanának vizsgálatára. A nemzetség és a fajcsoport átfogó molekuláris genetikai vizsgálataival lehetőség nyílt az ellentmondások tisztázására és a pontos fajhatárok megállapítására. Az elmúlt 10 év során több munkacsoport is foglalkozott a *Crocus* nemzetség filogenetikájával, és a *Crocus vernus* fajcsoport molekuláris taxonómiai vizsgálata is elkezdődött. A fajcsoport pontos nevezéktana, genetikai variabilitása és filogenetikája azonban még koránt sem tisztázott.

Kutatómunkám alapvető célja a *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei fajainak genetikai variabilitás vizsgálata volt AFLP markerek és kloroplaszt szekvencia adatok alapján.

A munka céljai összefoglalva:

1. Az AFLP technika optimalizálása és alkalmazása a *Crocus vernus* fajcsoport genetikai variabilitásának vizsgálatára.
2. Új genetikai markerek alkalmazása a *Crocus vernus* fajcsoport molekuláris taxonómiai vizsgálatához.
3. A *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei fajainak molekuláris taxonómiai, filogenetikai és populációgenetikai vizsgálatai AFLP markerek alapján.
4. A *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei fajainak citogenetikai vizsgálata.

2. Irodami áttekintés

A *Crocus* nemzetség bemutatása

A *Crocus* L. nemzetség az APG III rendszerben, amely a zárvatermők molekuláris rendszertani osztályozásán alapszik az Egyszikűek (*Monocots*) kládján belül a Liliaceae főrendbe, ezen belül az Egyszikűek legnépesebb rendjébe a Spárgavirágúakhoz (*Asparagales*), majd ezen belül a Nöszirmifélék (*Iridaceae*) családjába tartozik. A nemzetség mintegy 160 eurázsiai elterjedésű fajt foglal magába, amelynek fajdiverzitási központjai a Balkán-félsziget és Kis-Ázsia területén találhatóak (MATHEW 1982, SCHNEIDER et al. 2013, HARPKE et al. 2014). A nemzetség citogenetikailag rendkívül változatos, a kromoszómszám $2n=7-70$ között változik, mindemellett a nemzetség kariotípus evolúciójában meghatározó szerepe van a poliploidia és diszploidia jelenségének (BRIGHTON et al. 1973; GOLDBLATT & TAKEI 1997, HARPKE et al. 2013).

A *Crocus* nemzetség rendszertanát összefoglaló *Crocus* monográfia 1982-ben készült el, amely morfológiai bélyegek alapján a nemzetséget két alnemzetségre osztotta: *Corciris* és *Crocus* alnemzetségekre (MATHEW 1982). A *Corciris* alnemzetséget egyedülként a monotipikus bánáti sáfrány (*Crocus banaticus*) képviseli. A *Crocus* alnemzetséget az előlevél megléte alapján 2 szekcióra - *Corcus* és *Nudiscapus* - osztotta, majd figyelembe véve a bibe és a hagymagumó erezettségének morfológiai jegyeit, valamint a virágzási időt további 15 sorozatot különít el. Az 1930-as évektől elkezdődtek a *Crocus* nemzetség citogenetikai vizsgálatai. Az első részletesebb citogenetikai adatokat Feinbrun közölte, amelyben bemutatja a nemzetségre jellemző kromoszómaszámokat és ploidia szinteket (FEINBRUN 1958). Az 1970-es évektől a Kew Gardens munkatársai elkészítették *Crocus* nemzetség átfogó citogenetikai vizsgálatát, amelyben a nemzetség teljes elterjedési területéről 88 faj citogenetikai jellegettségét összegezték (BRIGHTON et al. 1973). Vizsgálataik megállapították, hogy a *Crocus* nemzetség a rendkívül változatos kromoszóma számú ($2n=6-64$) és kariomorfológiájú taxonokkal az *Iridaceae* család citogenetikailag legváltozatosabb csoportját képviseli. Több fajcsoport esetén, mint a *C. biflorus*, *C. sativus*, és *C. vernus* fajcsoportok a rendelkezésükre álló adatokból nem sikerült pontos fajhatárokat meghatározni.

A nemzetség rendszertanával és fejlődéstörténetével kapcsolatban a molekuláris genetikai módszerek, ennek köszönhetően a molekuláris taxonómiai módszerek fejlődésével a 2000-es évektől sorra új eredmények láttak napvilágot, amelyek jelentősen megváltoztatták a nemzetség morfológiai és citogenetikai jellegekre épülő rendszertanát. A nemzetség első átfogó filogenetikai vizsgálata 5 kloroplaszt marker szekvencia adatai alapján készült el, amely igazolta a nemzetség monofiletikus eredetét, azonban nem támogatta a *Corciris* és *Crocus* alnemzetségekre és ezek további szekciókba való felosztását (PETERSEN et al. 2008). Vizsgálataikban a *Crocus banaticus* nem különült el a *Crocus* alnemzetség tagjaitól, így genetikai alapon a *Crociris* alnemzetség nem különíthető el. A kloroplaszt szekvencia alapú filogenetika továbbra is támogatta a fajok sorozatokba rendszerezését és 9 korábban sorozatként kategorizált csoport monofiletikus eredetét (Függelék 1. A és 1. B ábrák), azonban a két fajokban leggazdagabb *Biflora* és *Reticulati* sorozatok ebben az analízisben nem bizonyultak monofiletikus eredetű csoportoknak (PETERSEN et al. 2008). A nemzetség további átfogó citogenetikai és molekuláris filogenetikai feldolgozása során az ITS, a *trnL-F* kloroplaszt intergénikus marker és egy alacsony kópiaszámú nukleáris gén egy részletét (*pCOSAt103*) vizsgálták 110 taxon bevonásával, valamint további citológiai vizsgálatokat végeztek (HARPKE et al. 2013). A kombinált ITS és kloroplaszt szekvencia adatok megerősítették a Mathew morfológiai alapú rendszerében megállapított *Corcus* és *Nudiscapus* szekciók monofiletikus eredetét. Továbbá nyolc sorozat elkülönülése is megerősítést nyert, hasonlóan PETERSEN et al. kloroplaszt szekvencia alapú rendszeréhez (Függelék 2. A és 2. B ábrák A és B). Kariológiai eredményeik igazolták a poliploidizációs események és a diszploidia meghatározó szerepét a nemzetség citogenetikai evolúciója során. Allotetraploid eredetűnek tekintik a *Nudiscapus* szekciót, valamint poliploid eredetűeknek feltételezik a *Crocus*, *Scardici*, *Longiflora* és *Versicolores* sorozatokat. Az *At103* nukleáris régió felszaporításával és klónozásával nyert szekvencia adatok pedig szintén megerősítették a *Nudiscapus* szekció allotetraploid eredetét.

A *Crocus* nemzetség fajszerkezetét a morfológiai és citogenetikai jellegek alapján korábban 80-90 körülinek tekintették, azonban a molekuláris genetikai kutatások bevonásával, valamint a Mediterráneum keleti részén jelenleg is folyó intenzív florisztikai vizsgálatok eredményi alapján mára már 160 körüli tehető az ide tartozó fajok száma (MATHEW 1982, PETERSEN et al. 2008; SCHNEIDER et al. 2013, HARPKE et al. 2014).

A *Crocus* nemzetség legismertebb tagja a jóféle sáfrány (*Crocus sativus* L.), amely ősi fűszernövény. Termesztése i.e. 1500-2500 körülre tehető Irán, India, Kína területein, Európában pedig a Mediterráneum területén és Kelet-Európa térségében (NEGBI et al. 1989, BEIKI et al. 2010). A sáfrány fűszer a virág kicsípett, szárított bibéje (Crocus stigma), amely mélyvörös színű, jellegzetes aromás illatú. Lassú és fáradtságos kézi munka az apró, törekeny virágok betakarítása és a bibék kitépése is. Egy kilogramm szárított bibéhez megközelítőleg 150000 frissen kinyílt virág szükséges. Ezek után nem meglepő, hogy minden idők egyik legdrágább fűszernövényeként tartják számon.

A sáfrány mindamellett, hogy értékes fűszernövény, változatos élettani hatásai által a farmakológiai kutatások középpontjába került. Az utóbbi években számos kutatási eredmény látott napvilágot a *C. sativus* és más *Crocus* fajok terápiás felhasználási lehetőségeiről rákellenes, antimutagén és antioxidáns tulajdonságai révén (ABDULLAEV & ESPINOSA-AGUIRRE 2004, CHRYSSANTHI et al. 2007). A sáfrány számos a népi gyógyászatban és orvosi felhasználásban is ismert és alkalmazott másodlagos anyagcsereterméket tartalmaz (AHMAD et al. 2011). A glikozidok közül krocint, pikrokrocint, krocetint és szafranált tartalmaz, amelyek görcsoldó, köptető, emésztést serkentő, nyugtató és antidepresszáns hatásúak.

A *Crocus sativus* őszi virágzású, steril, triploid faj ($2n = 3x = 24$), amely csak vegetatívan szaporodik. Pontos eredete máig ismeretlen. Korábban autotriploid eredetű fajnak feltételezték. MATHEW (1982) *Crocus* monográfiája a *C. cartwrightianus* Herb. fajhoz sorolja, a Flora Europaea (TUTIN et al. 1980) alfaji kapcsolatot feltételez. A legújabb molekuláris genetikai eredmények azonban arra utalnak, hogy a *C. sativus* allopoliploid eredetű, feltételezhetően két vagy három genom játszott szerepet a kialakulásában, amelyek közül az egyik szülői faj biztosan a *C. cartwrightianus* (FERNANDEZ 2004).

A *Crocus vernus* fajcsoport bemutatása

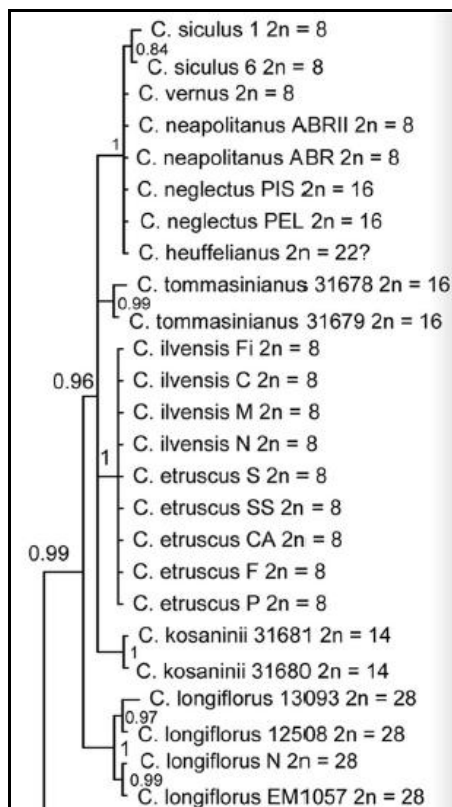
A *Crocus vernus* (L.) Hill. fajcsoport a morfológiai bélyegeken alapuló és a molekuláris filogenetikai alapú rendszerezésben is a *Crocus* szekcióba, ezen belül a *Verni* sorozatba tartozik (MATHEW 1982, HARPKE et al. 2014). A nemzetség legészakibb előfordulású fajai tartoznak ide, elterjedési területük a Pireneusoktól, az Alpokon, az Appenini-félszigeten és a Kárpát-medence térségén át egészen az Észak-Balkánig húzódik. Északi elterjedésük az Északi-Kárpátok vonulatán túl a Szudéták vidékéig tart.

A *Crocus vernus sensu lato* nevezéktanával és rendszertanával kapcsolatos viszonyosságok több mint 250 éves múltra tekintenek vissza. A *Crocus vernus* fajnevet először HILL (1765) alkalmazta a Svájcban előforduló, tavasszal nyíló *Crocus* növényekre. Az első részletesebb taxonómiai leírást Wulfen közli (WULFEN 1778), amelyben az Ausztriában előforduló természetes populációkat jellemzi. Ez a leírás szolgált később alapul a *Crocus albiflorus* leírásához is (KITAIBEL 1814). A fajcsoportot nagy morfológiai és citogenetikai változatosság jellemzi, ennek következtében a botanikusok az elmúlt 100 évben számos fajt neveztek meg az elterjedési terület különböző részeiről, amelyek rendkívül bonyolult nevezéktani és rendszertani helyzetet teremtettek. A fajcsoporthoz tartozó taxonokat a Flora Europaea (TUTIN 1980) és a *Crocus* monográfia (MATHEW 1982) is *Crocus vernus* összefoglaló névként kezeli és csupán két alfajra osztja: (1) *C. vernus ssp. albiflorus*, amely egy alpesi elterjedésű, jellemzően fehér virágú, diploid növény ($2n=8$). (2) *C. vernus ssp. vernus*, amely egy összefoglaló név. Ide tartoznak a lila virágú, $2n= 10, 12, 18, 20, 22, 23$ -as kromoszómaszámú taxonok. Faji szinten ebben a kategóriában a *C. heuffelianus*, *C. scepusiensis*, *C. neapolitanus* és *C. siculus* taxonok különíthetők el.

A közelmúltban elkészült a *Crocus vernus* nevezéktani revíziója (PERUZZI et al. 2013), amelyben kijelölték a *Crocus vernus* névhez tartozó lektotípust. Ez egy Alpokban előforduló $2n=8$ kromoszómaszámú, fehér virágú növény, amely a közép-európai taxonómusok körében a *Crocus albiflorus* Kit. ex Schult. fajként ismert. A *Crocus vernus* fajcsoport nevezéktanában ez alapvető változásokat jelentett, amelynek következményei az alábbi nevezéktani módosításokat eredményezte. A továbbiakban a *C. albiflorus* taxonra a *C. vernus* fajnevet kell alkalmazni, így a *C. albiflorus* taxonnév a *C. vernus* szinonímájává vált. A Közép-Olaszországban elterjedt, korábban *C. vernus*-ként azonosított taxon esetében pedig a *C. neapolitanus* érvényes taxon nevet állapították meg.

A *Crocus vernus* fajcsoport részletesebb citogenetikájával az 1960-as években egymástól függetlenül két munkacsoport kezdett foglalkozni: a Kew Gardens munkatársai és a krakkói Jagelló Egyetem kutatói. SKALIŃSKA (1968) a *C. albiflorus* és *C. scepusiensis* kariológiai összehasonlítása során több hasonlóságot is talált a két faj között. Ennek alapján arra a következtetésre jutott, hogy a *C. albiflorus* szerepet játszhatott a *C. scepusiensis* kialakulásában. RAFIŃSKI & PASSAKAS (1976) a *C. scepusiensis* és a *C. heuffelianus* dél-erdélyi $2n=18$ -os kromoszómaszámú populációit vizsgálták. Eredményeik alapján a két taxon kromoszómaszáma megegyezik, azonban a kromoszómák morfológiájában különbségeket találnak. A Kew Gardens-ben elkezdett a *Crocus* nemzetség citogenetikai feldolgozására irányuló vizsgálat alapján a *C. vernus* fajcsoporothoz tartozó taxonokat rendkívül nagy citogenetikai változatosság jellemezte, így a fajcsoport részletes vizsgálatát 1976-ban tovább folytatták (BRIGHTON *et al.* 1973, BRIGHTON 1976). Ennek eredményeként BRIGHTON (1976) több új citológiai adatot is közölt. Leírta a *C. heuffelianus* $2n=10$ -es citotípusát Ukrajnából és Erdélyből, valamint Olaszország és Csehország területeiről a *C. vernus* $2n=16$ -os kromoszómaszámú populációit. A *C. heuffelianus* $2n=18$ -as citotípusa és *C. scepusiensis* esetében ő is hasonló megállapításra jut, mint a lengyel kutatócsoportok. A két faj kromoszómaszáma megegyezik, azonban kariomorfológiai különbségek figyelhetők meg közöttük.

A fajcsoport taxonómiájával kapcsolatos legújabb eredmények morfológiai, molekuláris genetikai (*trnL-trnF*, *ndhF*, ITS, *At103*) és kariológiai vizsgálatok alapján a Verni sorozat filogenetikai rekonstrukciójára irányultak (HARPKE *et al.* 2014). A morfológiai jellegzetességeket vizsgálva 12 különböző alaktani karaktert hasonlítottak össze, amelynek eredményeként a Verni sorozaton belül két csoport különítették el. Az első csoportba a MATHEW (1982) értelmezésében vett *C. vernus* fajcsoporthoz tartozó fajok és a *C. tommasinianus* tartozik. A második csoportot a *C. etruscus*, *C. ilvensis*, *C. kosaninii* és *C. longiflorus* fajok alkotják (1. ábra). A morfometriai és molekuláris genetikai és citogenetikai eredményeket összegezve pedig megállapították, hogy a *Crocus vernus* fajcsoport a következő 5 önálló fajt foglalja magába: *C. siculus*, *C. vernus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus*, *C. heuffelianus* (1. ábra).



1. ábra: A *Verni* sorozaton belül a *Crocus vernus* fajcsoport filogenetikai viszonyai HARPKE et al. (2014) vizsgálataiban. Eredményeik alapján a *Crocus vernus* fajcsoportához tartozó taxonok (*C. siculus*, *C. vernus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus* és *C. heuffelianus*) monofiletikus egységet alkotnak.

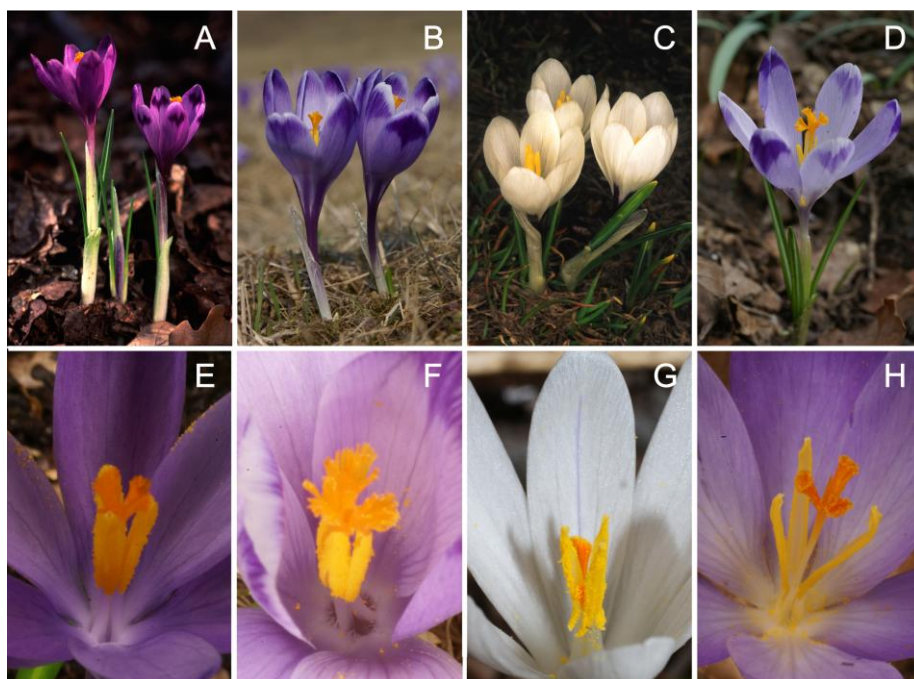
Ez a vizsgálat azonban nem terjedt ki a fajcsoport közép-európai elterjedésű taxonjaira, úgymint a *C. scepusiensis*, *C. vittatus*, valamint a *C. heuffelianus* kapcsán is mindösszesen 1 növényi mintát vizsgáltak Szerbia területéről, amelynek kromoszómaszám adata is bizonytalan. Tehát a *Verni* sorozat és a *C. vernus* fajcsoport rendszertanával és fejlődéstörténetével kapcsolatos kérdések továbbra is megválaszolásra várnak.

A Kárpát-medencéből és térségéből hét természetesen előforduló *Crocus* fajt ismerünk. A bánáti sáfrány (*Crocus banaticus* Gay) elterjedési területe a Balkánon át Erdélyig terjed és több sajátos, a nemzetségre jellemző általános alakot jellegzetességektől eltérő bélyegeket hordoz. A *C. banaticus* esetén a belső lepellevélek cimpája rövidebb, mint a külsőké és felálló háromszög alakúak, míg a külső lepellevélek cimpája széles tojásdad alakú. A bibe lila színű és finom szálú sallangokra oszlik. Sajátos morfológiai bélyegei alapján Mathew önálló alnemzetségben sorolta, azonban a kloroplaszt és a kombinált ITS/*trnL*-F filogenetikai eredmények alapján nem különül el ilyen élesen a nemzetség többi tagjától, a *Crocus* szekcióhoz tartozik, közeli rokonságot mutatva a *C. malyi* és *C. longiflorus* fajokkal. (PETERSEN et al. 2008, Harpke et al. 2013).

A tarka sáfrány (*Crocus reticulatus* Stev.) a Tiszántúlon, a Duna-Tisza közén és a Dunántúlon a Bakonyalján, Dél és Nyugat Dunántúlon fordul elő. Morfológiai jellegzetességei a külső leplek hátoldalán található három sötétlila hosszanti csík, valamint a kemény, hálózatos-recés burkú hagymagumó.

Az illír sáfrány (*Crocus tommasisnianus* Herb.) balkáni elterjedésű faj, hazánkban a Tolna megyei Gyulaj közelében található egy populációja, amelynek hazai őshonossága vitatott. Lepellevei halvány lilák, rózsaszínbe hajlóak, foltot nem viselnek. A fajt Jávorka Sándor 1949-ben a kárpáti sáfrány változataként, Csapody-sáfrány (*Crocus heuffelianus* var. *csapodyae*) néven írta le. 1964-ben Priszter Szaniszló azonosítja a közép balkáni *C. tommasinianus* fajjal. A molekuláris genetikai eredmények alapján a *Crocus vernus* fajcsoport közeli rokona (HARPKE et al. 2014, 1. ábra).

A Kárpát-medencében és térségében a *Crocus vernus* fajcsoport tagjai közül négy faj fordul elő (2. ábra).



2. ábra: A *Crocus vernus* fajcsoport képviselői a Kárpát-medencében.
A és E: *C. heuffelianus*, B és F: *C. scepusiensis*, C és G: *C. vernus*,
D és H: *C. vittatus* (Molnár V. Attila fotói).

A *Crocus vernus* (L) Hill (= *Crocus albiflorus* Kit. ex Schult.) (2. ábra C és G) egy alpesi faj, hazánkban csak az Alpoknál, Kőszeg mellett fordul elő, ahol tízezernél is több egyedet számláló állománya él (KESZEI 1997). Elterjedési területe Svájc, Észak-Olaszország, Ausztria és Németország. A Nyugat-Balkánon a Pireneusok és az Alpok magashegyvidéki területeire korlátozódik (BRIGHTON et al. 1976). Jellemzően fehér virágú, a fajcsoport tagjai között a legkisebb termetű. Bibéje a porzóknál rövidebb vagy legfejebb egyforma magasságú, lepeltorka szőrös. Kromoszómaszáma $2n=8$, heteromorf kromoszómaszerelvény jellemzi (BRIGHTON 1976). A faj nevezéktani revíziója során egy svájci (Ticino település) növényt jelöltek ki érvényes lektotípusnak (PERUZZI et al. 2013).

A kárpáti sáfrány (*Crocus heuffelianus* Herb.) (2. ábra A és E) elterjedési területe a Balkántól északkeleti irányba a Kárpátok vonulatain, Románián és Ukrajnán át, Lengyelországig húzódik. Hazánkban az Észak-Alföldön fordul elő több természetes populációja, ide a Kárpátokból leereszkedő vizek mentén jutott el. A fajt 1835-ben az Észak Bánát-ból Herbert írta le és Heuffel Jánosról orvos-botanikusról nevezte el, aki többek között a Bánság flórájának lelkes kutatója volt. A *C. heuffelianus* balkáni flóraelem, leplei lila színűek, a lelpélcimpák megnyúlt tojásdadok, a lepelcsúcsok alatt jellegzetes V vagy szív alakú folt figyelhető meg. Fontos morfológiai jellegzetessége, hogy a lepeltorok csupasz, szőrözöttség nem jellemzi. A faj locus classicusa a Bánát hegységben található (HARPKE et al. 2014). Az elmúlt évtizedekben *C. heuffelianus* taxonnév alatt a *C. vernus* fajcsoporttal foglalkozó botanikusok számos citogenetikai adatot közöltek, úgymint $2n=10, 12, 14, 18, 20, 22$ -es kromoszómaszámú populációk (BRIGHTON 1976, MIHALY & KRICSFALUSY 1997, HARPKE et al. 2014, HARPKE et al. 2015). Ez a nagyfokú citogenetikai változatosság egyrészt a *Crocus* nemzetségre jellemző diszploidiából adódik, a 12-es kromoszómaszámú populáció (Koszovó) feltételezhetően hibrid triploid alak, valamint ezen szerzők a $2n=18$ -as kromoszómaszámú szlovén *C. vittatus* populációkat is *C. heuffelianus* taxonként tárgyalják. A Kárpát-medencében a *C. heuffelianus* $2n=10$ -es kromoszómaszámú citotípusa fordul elő (BRIGHTON 1976, MURIN & HINDAKOVA 1984, MÁJOVSKY 1990). Mindezeket figyelembe véve a dolgozatomban *C. heuffelianus sensu stricto* néven a Kárpát-medencei $2n=10$ citotípust nevezem meg.

A Dunántúlon két populációja ismert a halvány sáfránynak (*Crocus vittatus* Schloss. & Vukot.) (2. ábra D és H) Bakonyalján Kup település határában és Somogy megyében a Baláta-tó környékén. A taxont a 1854-ben Schlosser és Vukotinovic Horvátország síkvidéki területéről, nyílt lomboserdőkből írta le. Locus classicus-a a Zágráb melletti Gostovic település. Elterjedési területe a Kárpát-medence délkeleti részén Szlovénia, Horvátország, Magyarország területén át Romániában a Déli-Kárpátokig tart. Morfológiailag hasonlít a *C. heuffelianus* fajhoz, a lepeltorka azonban szőrös. Kromoszómaszáma $2n=18$. MÁJOVSKÝ et al. (1990) a szlovák *Crocus* fajok citotaxonómiájával foglalkozó munkájában a Kárpát. medence déli területein előforduló $2n=18$ kromoszómaszámú növényekre "*Crocus uniflorus* Schur" nom. nud. fajnevet használja.

A szepességi sáfrány (*Crocus scepusiensis* Borb. ex Klucz.) (2. ábra B és F) a fajcsoport és egyben a nemzetség legészakibb előfordulású faja, amely az Északnyugati-Kárpátok vonulatain fordul elő. A faj locus classicus-a a Poprád mellett található Levoča hegységben található (MÁJOVSKÝ et al.

1990). MÁJOVSKÝ *et al.* (1990) érvényes taxon névként a *Crocus discolor* Reuss.-t nevezi meg, azonban az irodalomban a *Crocus scepusiensis* név terjedt el Brighton 1976-ban megjelent, a *C. vernus* fajcsoport citogenetikájával foglalkozó munkája hatására. A *C. scepusiensis* morfológiai bélyegek tekintetében nagyon hasonló a *C. heuffelianus* fajhoz, azonban fontos elkülönítő bélyege a szőrös lepeltorok. A fajt $2n=18$ kromoszóma szám jellemzi, azonban kariomorfológia különbségek alapján, úgy mint a kromoszómák morfológiája és a másodlagos befűződések elhelyezkedése a *C. scepusiensis* egyértelműen elkülöníthető a *C. heuffelianus* $2n=18$ -as citotípusától. (SKALINSKA 1968, BRIGHTON 1976, MÁJOVSKÝ *et al.* 1990). Eredetét tekintve MÁJOVSKÝ *et al.* (1990) úgy vélekedik a *C. scepusiensis* a *C. heuffelianus* ($2n=10$) faj északi populációiból származik autoploidizáció révén két kromoszóma elvesztésével.

A hazai *Crocus* fajok természetvédelmi besorolása és a természetvédelmi genetikai alapfogalmai

A hazánkban előforduló sáfrány fajok a 3/2001 (V. 9.) KöM rendelet melléklete alapján kivétel nélkül védettek. A *C. albiflorus*, *C. tommasinianus* és *C. vittatus* fajok eszmei értéke 50 000 Ft, míg a *C. heuffelianus* és *C. reticulatus* fajoké 10 000 Ft.

Az 1989-ben megjelent, a Magyarországon kipusztult és veszélyeztetett állat- és növényfajok Vörös Könyvében a *C. reticulatus* 'potenciálisan veszélyeztetett', a *C. tommasinianus* és *C. vittatus* 'aktuálisan veszélyeztetett', míg a *C. albiflorus* 'a kipusztulás közvetlen veszélyébe került' kategóriákban szerepelnek.

Az IUCN 2001-es rendszerében a *C. albiflorus* 'kipusztulással veszélyeztetett', a *C. tommasinianus* és *C. vittatus* 'veszélyeztetett', a *C. heuffelianus* 'sebezhető', míg a *C. reticulatus* 'veszélyeztetettség közeli'.

A természetvédelmi genetika a biológiai sokféleség megőrzése érdekében a különböző szintű konzervációbiológiai csoportok definiálását kiemelt jelentőségűnek tartja (HUGES et al. 1997). Ennek értelmében, a konzervációbiológiában az Evolúciósan Szignifikáns Egység (ESU) és Funkcionális Konzervációs Egység (FCU) fogalmakat vezették be (Funk et al. 2012)

Az ESU kritériumait számos konzervációbiológiai témájú publikációban különböző megközelítésekben definiálták (RYDER 1986, MORITZ 1994, CRANDALL et al. 2000, FRASER & BERNATCHEZ 2001). Általánosságban az ESU kritériumai szerint azokat a populációkat vagy populációcsoportokat tekinthetjük önálló evolúciós egységeknek, amelyek ökológiailag és genetikailag elkülönülnek a közel rokon populációcsoportoktól (CRANDALL et al. 2000, FUNK et al. 2012). Az ESU a genetikai differenciálódás mellett ökológiai elkülönülést is mutat, ami földrajzi izolációval is párosulhat. Az FCU a gyakorlati konzervációbiológiában fontos fogalom, amely azokat a populációkat vagy populációcsoportokat jelöli, amelyek demográfiailag és ökológiailag is függetlenek és a faj/populáció hosszútávú fennmaradása szempontjából kulcsfontosságúak (HUGES et al. 1997). A *Crocus vernus* fajcsoporton belül átfogó populációgenetikai munkák még nem készültek, így a konzervációbiológiai szempontból rendkívül fontos védett taxonok és populációk esetén az ESU és FCU egységeinek azonosítása és jellemzése még nyitott kérdés.

AFLP

Az AFLP módszer egy DNS ujjlenyomat technika, amelyet Zabeau és Vos holland kutatók szabadalmaztattak és publikáltak (Vos et al. 1995). A módszer első lépéseként genomiális DNS-t izolálunk, amelyet restrikciós endonukleázokkal hasítunk. Az így keletkezett fragmenteket PCR reakcióval amplifikáljuk olyan szelektív nukleotidokat tartalmazó primerekkel, amelyek az adapterekre és hasítóhelyekre komplementer szekvenciákat tartalmaznak. Ily módon szelektíven csökkenthető a felszaporított fragmentek száma. Az így kapott AFLP fragmentek detektálása nagy elválasztóképességű elektroforézissel (pl.: poliakrilamid vagy kapilláris gélelektroforézis) történik. Az AFLP technikát alkalmazva egyszerre nagy mennyiségű adathoz jutunk, a teljes genomot vizsgálva és nagy előnye, hogy nincs szükség előzetes szekvencia ismeretre (Vos et al. 1995, MUELLER et al. 2008). Az AFLP technika az adott fragmentek hiányát és jelenlétét vizsgálja, így a DNS fragmentek hosszában lévő különbségek kimutatására nem alkalmas (AJMONE-MARSAN et al. 2001). A restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) technikával összehasonlítva az AFLP során az amplifikációs lépésben a megfelelő primerpárokkal kiválasztva beállítható a detektált fragmentek száma. A fragmentmintázatból a fragmentek jelenléte vagy hiánya alapján 0/1 bináris adatok nyerhetők, amelyek a fenetikai, filogenetikai és populációgenetika vizsgálatok alapját képezik. A módszer fejlődésével a restrikciós fragmentek felszaporítására már kétlépéses PCR reakciót alkalmaznak, ezek a preszelektív és szelektív amplifikációs lépések. Az egymást követő amplifikációs lépésekre azért van szükség, mert az egy lépésben történő amplifikáció olyan nagy mennyiségű fragment felszaporítását eredményezi, amely a kiértékelést meglehetősen nehezíti. Így a preszelektív amplifikációt követően a szelektív amplifikációban a primerek 3' végéhez 2–3, véletlenszerűen kiválasztott bázist adunk, ezáltal a fragmentek egy bizonyos hányada kerül felszaporításra. Ily módon már könnyebben értékelhető mennyiségű fragmentet detektálhatunk.

A módszer általánosan használt növénytaxonómiai, populációgenetikai és filogeográfiai vizsgálatok során (KOOPMANN 2005., MEUDT & CLARKE 2007, CULUMBER et al. 2011, CHENNAOUI-KOURDA et al. 2012, JUAN et al. 2012, DE RIEK et al. 2013). Az AFLP markerek túlnyomórészt nukleáris eredetűek, így abban az esetben, ha a szekvencia alapú genetikai markerek feloldóképessége faji szinten nem megfelelő, a nagyobb felbontóképességű AFLP módszer alkalmas lehet a genetikai variabilitás mértékének megállapítására (DESPRÉS et al. 2003, SIMMONS et al. 2007, GARCIA-PEREIRA et al. 2010).

Az elmúlt évtizedben a *Crocus* fajok genetikai variabilitás vizsgálataiban és a *Crocus sativus* populációgenetikájával foglalkozó vizsgálatokban is sikeresen alkalmazták az AFLP technikát (ZUBOR et al. 2004, NAZZAL et al. 2011, EROL et al. 2011, 2014, SIRACUSA et al. 2013, BUSCONI et al. 2015).

ZUBOR et al. (2004) 6 *Crocus* faj genetikai variabilitását vizsgálta AFLP technikával és közeli rokonsági kapcsolatot állapított meg a *C. sativus* és *C. cartwrightianus* között.

NAZZAL et al. (2011) vizsgálatai a Kelet-Jordánia területén előforduló *Crocus hyemalis* és *Crocus moabiticus* fajokra irányultak. Vizsgálataikban az AFLP technika hatékony módszernek bizonyult *Crocus* fajok genetikai variabilitás vizsgálatára, eredményeik igazolták a két taxon faji szintű elkülönülését.

Törökország egy endemikus, morfológiailag rendkívül változatos sáfrány fajtát, a *Crocus antalyensis* taxont EROL et al. (2011) vizsgálta AFLP módszerrel. Vizsgálataik során elsőként alkalmaztak AFLP markereket *Crocus* fajok populációgenetikai vizsgálatára. Eredményeik igazolták, hogy a *Crocus antalyensis* az AFLP markerek alapján genetikailag elkülönül a közelrokon *Crocus flavus* subsp. *dissectus* fajtól, valamint a *Crocus antalyensis* fajon belül három különböző alfajt különítettek el. Egy későbbi vizsgálatában EROL et al. (2014) 26 különböző *Crocus* faj genetikai diverzitását, populáció szerkezetét és genetikai alapú rokonsági kapcsolatát vizsgálta Törökország területéről és az Égei-tenger két görög szigetéről. Kísérleti rendszerükben 12 AFLP primerpár alkalmazásával megállapították, hogy az AFLP technika a *Crocus* fajok genetikai variabilitás vizsgálataira és populációgenetikai vizsgálatok esetén is alkalmazható módszer.

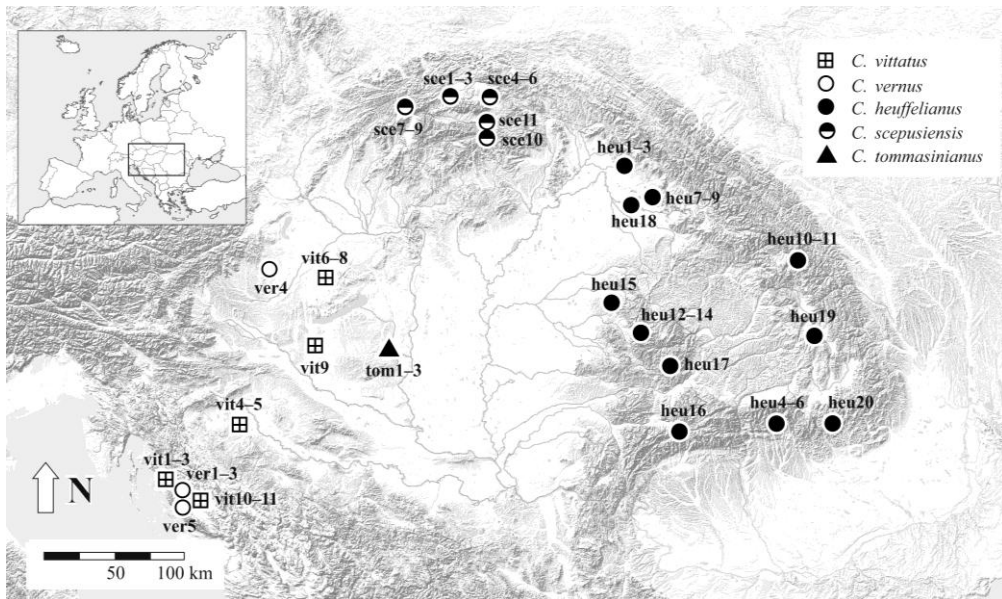
SIRACUSA et al. (2013) *Crocus sativus* populációk morfológiai vizsgálatait és hatóanyag vizsgálatainak -HPLC módszerrel- eredményeit hozták összefüggésbe a *Crocus sativus* populációgenetikai vizsgálataival. A különböző földrajzi területekről -Ázsia és Európa- származó minták között jelentős genetikai elkülönülést tapasztaltak, annak ellenére, hogy fenotípusos megjelenésükben ezek a növények nem mutattak jelentős eltérést.

AFLP és Methyl-Sensitive AFLP technika alkalmazásával BUSCONI et al. (2015) 112 *Crocus sativus* populáció vizsgálatával keresett összefüggést a genetikai variabilitás és epigenetikai jellegzetességek vonatkozásában. Vizsgálataikban a genetikai variabilitás alacsony fokú volt, 12 különböző genotípust különböztettek meg. Ezzel szemben a Methyl-Sensitive AFLP eredményei magas epigenetikai variabilitást bizonyítottak és 38 különböző epigenetikai típust különítettek el.

3. Anyag és Módszer

Növényi minták

Molekuláris genetikai vizsgálatainkhoz a növényi minták gyűjtése 2007 és 2012 között történt Magyarország, Románia, Szlovákia, Horvátország és Olaszország területeiről (1. táblázat, 3. ábra). A molekuláris taxonómiai és citogenetikai vizsgálatokba nyolc, a *Crocus* nemzetségbe tartozó fajt vontunk be 32 különböző populációból (1. táblázat). Külsőportként az elővizsgálatok során a *Crocus sativus*, a teljes adatsort vizsgálva a *Crocus banaticus* szerepelt. A terepi gyűjtések során a 1-2 cm²-es levéldarabokat gyűjtöttünk és szilikagélt tartalmazó tasakokba vagy 96 %-os etanolba tettük. A mintákat a vizsgálatok megkezdéséig szobahőmérsékleten, az alkoholban tárolt minták esetén pedig -80 °C-on tároltuk.



3. ábra: A Kárpát-medencéből és térségéből gyűjtött növényi minták.

A gyűjtőutak során a Kárpát-medence és térsége területéről begyűjtöttük a *Crocus vernus* fajcsoporthoz tartozó természetesen előforduló fajokat. Nevezetesen a *C. heuffelianus*, *C. vittatus*, *C. scepusiensis*, *C. vernus* fajok populációiból. Továbbá a közép-olasz elterjedésű *C. neapolitanus* fajból is sikerült egy mintát gyűjteni

A *C. tommasinianus* a fajcsoport balkáni elterjedésű rokona, amelynek egyetlen hazai populációjából, Gyulaj mellől gyűjtöttünk növényi mintákat, amelyet közeli külcsoporthoz vontunk be a vizsgálatainkhoz.

A mintgyűjtések során csak a *C. vittatus* faj esetén gyűjtöttünk mintát a locus classicus-ból (Horvátország, Gostovic település). Így taxonómiai értelemben csak a *C. vittatus* esetében jelenthetjük ki biztosan a faji megfelelőséget. Azonban figyelembe véve a leírt fajok alaktani jellegzetességeit, kromoszómaszám adataikat, élőhelyeiket és elterjedési területük határait, a vizsgálatainkba bevont taxonokról feltételezzük és kijelenthetjük, hogy a *C. vernus*, *C. heuffelianus* (2n=10-es citotípus), *C. scepusiensis*, *C. tommasinianus*, *C. neapolitanus* és *C. banaticus* fajokról van szó és vizsgálatainkba ezeket a taxonokat vontuk be.

1. táblázat: A vizsgálatokhoz begyűjtött *Crocus* minták populációinak adatai.

Taxon	Ország	Gyűjtési hely	Minta név	
			Teljes adatsor	Elővizsgálat
<i>C. sativus</i>	SP	Ledana	-	sativ_led
<i>C. banaticus</i>	RO	Sovata	ban1–2	ban_szo
	RO	Hateg	ban3–5	-
	UA	Bustina	ban6	-
	RO	Finis	ban7	-
<i>C. tommasinianus</i>	HU	Gyulaj	tom1–3	tom_gyu
<i>C. heuffelianus</i>	HU	Csaholc	heu1–3	-
	RO	Curtea de Arges	heu4–6	-
	RO	Borsa	heu10–11	-
	RO	Finis	heu12–14	-
	RO	Betfia	heu15	heu_bet
	RO	Petroșani	heu16	-
	RO	Bucium	heu17	-
	RO	Luete	heu19	-
	RO	Rucar	heu20	-
	UA	Munkaceve	heu7–9	-
	UA	Shajan	heu18	-
<i>C. scepusiensis</i>	SK	Kriván	sce1–3	-
	SK	Ždiar	sce4–6	sce_zdi
	SK	Vrútky	sce7–9	-
	SK	Vernár	sce10	-
	SK	Poprad	sce11	-
<i>C. vittatus</i>	HR	Vratnik	vit1–3	-
	HR	Gostovic	vit4–5	-
	HU	Kup	vit6–8	vit_kup
	HU	Szenta	vit9	-
	HR	Kuterevo	vit10–11	-
<i>C. vernus</i>	HU	Kőszeg	ver4	-
	HR	Gorici	ver1–3	-
	HR	Kuterevo	ver5	-
<i>C. neapolitanus</i>	IT	Acquapendete	nea1	-

DNS izolálás

A genomiális DNS kivonáshoz fenol-kloroform extrakciót (BENNER et al. 1995) és módosított CTAB extrakciót (SRAMKÓ et al. 2015) alkalmaztunk.

A fenol-kloroform extrakció során a mintákat folyékony nitrogén segítségével eldörzsöltük. A mintákhoz 300 µl lízis puffert (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA [pH 8,0], 1 % SDS) adtunk, kevertettük, majd centrifugáltuk (13000 g, 5 perc). Ezt követően a felülúszó fázist új Eppendorf csövekbe pipettáztuk, ezáltal megváltunk a maradék növényi daraboktól. 300µl TE telített fenolt adtunk a vizes fázishoz, kevertettük, 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd újabb kevertetés után centrifugáltuk (13000 g 5 perc). A felülúszó vizes fázist ismét új Eppendorf csövekbe tettük és 1:1 térfogatarányban ismét TE telített fenolt adtuk hozzá, kevertettük, majd centrifugáltuk (13000 g, 5 perc). Ezt követően a felülúszó vizes fázishoz 1:1 térfogatarányban kloroformot adtunk, kevertettük, majd centrifugáltuk (13000 g, 10 perc, 4 °C-on). A felülúszó vizes fázishoz tized térfogatú nátrium-acetátot és tized térfogatú izopropanolt adtunk, majd 10 percig jégen inkubáljuk. Ezt követően rövid centrifugálás következett (10000 g, 2 perc) és a keletkező felülúszó vizes fázist új Eppendorf csövekbe pipettáztuk. A nukleinsav precipitáció során a vizes fázishoz 3-szoros térfogatú 96%-os hideg etanolt adtunk és legalább 1 órán át -20 °C-ra helyeztük. Ezt követően 20 perc centrifugálás (15000 g 4 °C-on) után a nukleinsav csapadékot 300 µl 70%-os hideg etanollal mostuk, 5 percig centrifugáltuk, majd vákuumban megszáritottuk. A szárítást követően a csapadékot 100 µl steril, bidesztillált vízben feloldottuk. A kapott minta nukleinsav koncentrációját spektrofotométer segítségével határoztuk meg (Schimadzu Uv1601). A steril, bidesztillált vízben feloldott ismert koncentrációjú DNS mintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A további vizsgálatokban a DNS kivonatokat CTAB extrakcióval készítettük SRAMKÓ et al. (2015) módszere alapján. A növényi DNS izolálás során a CTAB általánosan alkalmazott erős kationos detergens, amely roncsolja a sejtfalat, a sejtmembránt és denaturálja a fehérjéket. A DNS izolálás során növényi szövetek másodlagos anyagcseretermékei, úgymint a polifenolok és poliszacharidok megnehezítik a megfelelő minőségű DNS kivonat készítését. A CTAB és az extrakcióban szintén alkalmazott PVP azonban minimalizálja a másodlagos anyagcseretermékek DNS károsító hatását a sejtfeltárás során, így az extrakció hatékonyabbá válik. (DOYLE & DOYLE 1987).

A mintákat folyékony nitrogénnel kvarchomok és PVP jelenlétében eldörzsöltük. Ezt követően 750 µl CTAB oldatot adtunk a mintákhoz, majd rázótermosztátban 1 órán át 65 °C-on inkubáltuk. A mintákat 20 000 g fordulaton 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóval megegyező mennyiségű kloroform: izoamil-alkohol 24:1 arányú keverékét adtuk. 10 perc óvatos rázatás után a mintákat 20 000 g-n 5 percig centrifugáltuk, majd megismételtük a kloroformos lépést. A keletkezett felülúszóhoz egy egységnyi jéghideg izopropanolt adtunk és 0,08 egységnyi 7,5 M ammónium-acetátot, majd a mintákat -20 °C-ra helyeztük minimum 1 órára. Ezt követően 20 000 g fordulaton 15 percig centrifugáltuk és a keletkezett nukleinsav pelletet kétszer megmostuk 300 µl 70 %-os hideg etanollal. A pelletet szobahőmérsékleten megszárítottuk és feloldottuk 40 ml 10 mM Tris (pH 8.0) pufferben. A DNS koncentráció fotometriás meghatározását NanoDrop ND-1000 készüléken végeztük (Thermo Scientific).

AFLP

Az AFLP vizsgálatok során két különböző kísérleti rendszert állítottunk fel a *Crocus* fajok genetikai variabilitásának tanulmányozására.

(1) Az elővizsgálatok során egy kisebb adatsoron dolgoztunk, amelyben 6 *Crocus* populációt teszteltünk. Ebben a kísérleti rendszerben a restrikciós DNS fragmentek felszaporítására egylépéses PCR reakciót alkalmaztunk. A DNS fragmentmintázat detektálása poliakrilamid gélelektroforézissel és ezüstfestéssel történt.

(2) A kísérletek második szakaszában az AFLP kísérleti rendszert a teljes adatsoron, 32 különböző *Crocus* populáció bevonásával alkalmaztuk. A PCR reakció során kétlépéses amplifikációt alkalmaztunk. A fragmentanalízist ez esetben kapilláris gélelektroforézissel végeztük.

AFLP elővizsgálatok

Az AFLP vizsgálatokat a VOS *et al.* (1995) által leírt módszer alapján végeztük az alábbi módosításokkal. A restrikciós endonukleázokkal történő hasítás első lépésben 200 ng mennyiségű genomiális DNS-t 30 U *EcoRI* (Thermo Scientific) restrikciós enzimmal hasítottuk 37 °C-on 16 órán keresztül. Ezt követően 2 U *TruI* (Thermo Scientific) enzimmal folytattuk a restrikciós emésztést 65 °C-on 2 órán át. Ezután a *TruI*+*EcoRI* restrikciós enzimekkel emésztett DNS fragmentekhez ismert szekvenciájú adapter oligonukleotidokat kapcsoltuk T4 ligáz enzimmal. A ligálási lépésben az alábbi reakcióösszetételt alkalmaztuk: 1+1 µl 10 pmol/ µl *EcoRI* adapter (sense és antisense szál) 1+1 µl 100 pmol/ µl *TruI* adapter (sense és antisense szál) 0,2 µl 5 U/ µl T4 DNS ligáz (Thermo Scientific), 4 µl 10x T4 DNS ligáz puffer (Thermo Scientific), 1,8 µl nukleázmentes víz. A ligálást 3 órán át 37 °C-on végeztük, majd 70°C-on inaktiváltuk az enzimet.

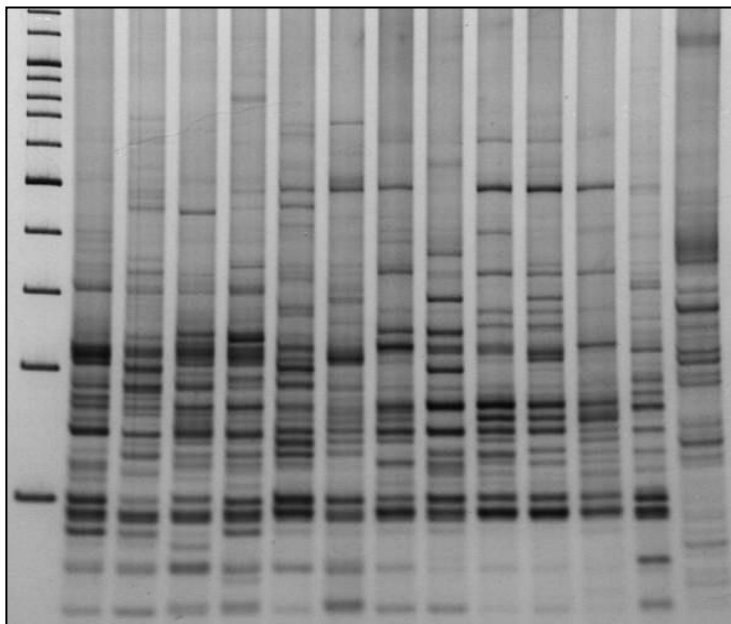
A *TruI* és *EcoRI* adapterekkel ligált DNS fragmentek felszaporításához egylépéses PCR reakciót alkalmaztunk. Az alkalmazott primerek szekvenciái az alábbiak voltak: *EcoRI*: 5' – GACTGCGTACCAATTCACG és *TruI*: 5' – GATGAGTCCTGAGTAACAA.

A PCR reakciókat 20 µl térfogatban állítottuk össze az alábbi reakcióelegyet használva: 2 µl 10 µM-os *EcoRI* primer, 2 µl 10 µM-os *TruI* primer, 1,5 µl 25mM-os $MgCl_2$, 1 µl 10 mM-os dNTP-mix, 1,5 µl 1U/µl Taq polimeráz enzim (Thermo Scientific), 2 µl 10x Taq polimeráz puffer (Thermo Scientific), 4–6 µl ligátum, 7 µl steril bidesztillált víz. Az amplifikáció a következő hőmérsékleti profil alapján történ: 94 °C 2 perc kezdeti denaturáció, a következő 35 ciklus: 94 °C 30 mp, 52 °C 1 perc, elongáció: 72 °C 1 perc majd a végső extenzió: 72 °C 4 perc.

A restrikciós enzimekkel történő hasítás után és PCR reakcióban felszaporított DNS fragmenteket akrilamid gélelektroforézissel választottuk el. A DNS mintázat meghatározásakor 6% koncentrációjú vagy 5-10 %-os gradiens poliakrilamid gélt használtunk. Puffer közegnek 0,5X TBE puffert alkalmaztunk. A DNS mintákat gélre vitel előtt 2 percig 90 °C-on inkubáltunk, majd rögtön jégre tettük. A gélelektroforézis során 5 µl PCR terméket töltöttünk a gélre. A DNS fragmentek elválasztás utáni kimutatására minden esetben az ezüsfestés módszerét alkalmaztuk (SAMMONS et al. 1981., AN et al. 2009). Az ezüsfestés első lépéseként egy lépésben fixálátuk és festettük a gélt 5 percig 5% etanol, 1% salétromsav (65%), 0,1% $AgNO_3$ tartalmú oldatban. A következő lépésben leállítottuk a festést és mostuk a gélt bidesztillált vízzel. Végül 2-3 perces előhívást végeztünk 1,3% NaOH, 0,65% Na_2CO_3 , 0,4% formaldehid (35%) tartalmú oldattal. A megfestett gélekről a UVITECH cég gél dokumentációs rendszerének használatával készítettünk digitális fényképeket.

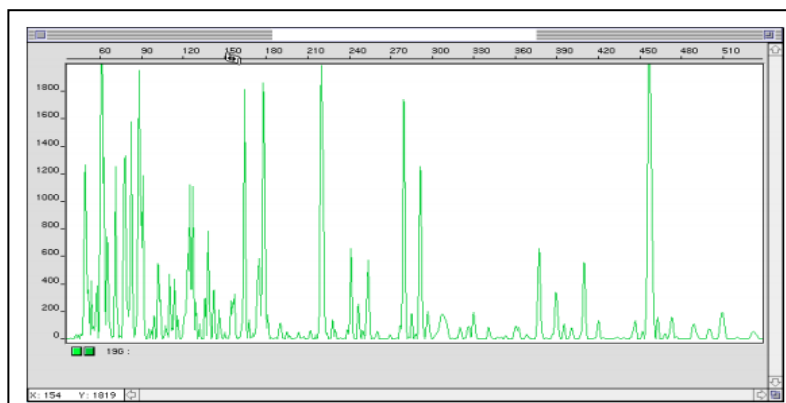
AFLP vizsgálatok a teljes adatsoron

A második kísérleti rendszerben további AFLP optimalizációs kísérleteket végeztünk a teljes *Crocus* adatsor bevonásával. Első lépésként a *TruI*+*EcoRI* restriktív enzimekkel emésztett DNS fragmenteket a PCR reakcióban két lépésben, egy pre-szelektív és szelektív amplifikációval szaporítottuk fel. A szelektív amplifikáció során 64 különböző primerkombináció felbontóképességét teszteltük az akrilamid géleken elválasztott fragmentmintázatok minősége alapján. A fragmenteket 50-500 bp mérettartományban vizsgáltuk. A legintenzívebb, diszkrét fragmenteket eredményező 5 különböző primerpárt választottunk ki a végső analízishez (4. ábra). Az 5 különböző szelektív primerpárral felszaporított fragmenteket ezután kapilláris elektroforézissel választottuk el. A végső analízishez azonban ezek közül csak hármat választottunk ki, az a kapott elektroferogrammok minősége alapján (5. ábra).



4. ábra: A *Crocus vittatus* és *Crocus vernus* minták AFLP analíziséből származó, akrilamid gélelektroforézissel elválasztott és ezüsfestéssel detektált fragmentmintázata. A szelektív amplifikációhoz használt primerkombináció az *EcoRI* 5'-AGT és *TruI* 5'-CTG voltak.

A preszelektív PCR reakciókat 20 µl térfogatban állítottuk össze az alábbi reakcióelegyet használva: 2 µl 10 µM-os *Eco*RI preszelektív primer, 2 µl 10 µM-os *Tru*I preszelektív primer, 10 µl 1x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), 4 µl nukleázmentes víz, 2 µl ligátum. A preszelektív amplifikáció a következő hőmérsékleti profil alapján történ. 2 perc kezdeti denaturáció 94 °C, 30 ciklus az alábbiak szerint: denaturáció 94 °C 30 mp, primerkötődés 56 °C 30 mp, elongáció 72 1 perc °C, majd a végső extenzió 72 °C 7 perc. A szelektív amplifikáció során a specifikusabb primerkötődés érdekében touchdown PCR módszert alkalmaztunk. A reakciókat szintén 20 µl térfogatban állítottuk össze az alábbi reakcióelegyet használva: 2 µl 10 µM-os *Eco*RI fluoreszcensen jelölt szelektív primer, 2 µl 10 µM-os *Tru*I szelektív primer, 10 µl 1x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), 4 µl nukleáz mentes víz, 2 µl preszelektív PCR termék. A szelektív amplifikáció a következő hőmérsékleti profil alapján történt. 94°C 2 perc kezdeti denaturáció, következő 13 ciklus: 94°C 45 mp, touchdown anelláció: 65 °C-56,6 °C (ciklusonként -0,7 °C) 30 mp, 72 °C 1 perc extenzió, következő 22 ciklus: 94 °C 30 mp, 56 °C 30 mp anelláció, 72 °C 1 perc, majd a végső extenzió 72 °C 10 perc. A felszaporított fragmenteket kapilláris gélelektroforézissel detektáltuk (Genetic Analyzer 310, Applied Biosystems) GeneScan-500 LIZ size standard jelenlétében. A nyers AFLP adatokat a GeneScan 3.7 software (Applied Biosystems) segítségével gyűjtöttük be. A fragmenteket 50-500 bp tartományban vizsgálva bináris adatokká alakítottuk a GeneMapper 3.7 programmal



5. ábra: A *Crocus* minták AFLP analíziséből származó kapilláris elektroforézissel detektált fragmentmintázatot bemutató elektroferogram.

Kloroplaszt szekvencia analízis

A kloroplaszt markerek uniparentális öröklődésük és különösen alkalmasak közeli rokon növényfajok filogenetikai vizsgálataira (HEINZE 2007). A kloroplaszt analízis során populációnként 1 egyedet vontunk be a vizsgálatokba, ez alól kivételt képzett a közeli kulcsoportként bevont *C. tommasinianus* 3 egyede és a *C. vittatus* egy populációja a Velebitből, amelyből szintén három egyedet vizsgáltunk. A kloroplaszt szekvencia analízis során mintáinkban az *accD-psaI* intergénikus spacer szekvenciát szaporítottuk fel az alábbi primerpárt alkalmazva: *accD*-F: 5'-GGA AGT TTG AGC TTT ATG CAA ATG G-3' és *psaI*-R: 5'-AGA AGC CAT TGC AAT TGC CGG AAA-3' PCR (SMALL et al. 1998).

A PCR reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 1x Dream Taq Green puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM *accD*-F és *psaI*-R primer, 0,2 U Dream Taq polimeráz enzim. (Thermo Scientific), 1 µl DNS templát. Az amplifikáció során az első 16 ciklusban touchdown hőmérsékleti profilt alkalmaztunk, amelyben a primerkötést 56 °C-on kezdtük és ciklusonként 0,5 °C-kal csökkentettük az értéket. A PCR reakció részletes hőmérsékleti profilja az alábbi volt. 3 perces kezdeti denaturáció 94 °C, ez követte 16 ciklus az alábbiak szerint: 94 °C 30 mp denaturáció, anelláció: 56 °C -0.5 °C/ciklus 30 mp, 72 °C 90 mp extenzió, ezt követte 21 ciklus 48 °C-os anellációval 30 mp; majd a végső extenzió 72 °C 7 perc. A felszaporított PCR terméket 1 % agaróz gélen ellenőriztük, amelyet etídium-bromiddal festettünk. A gélelektroforézis során 5 µl mintát töltöttünk a gélre. A szekvenálást a Macrogen cég végezte (Szöul, South Korea).

Adatelemzés

AFLP adatok elemzése

Az AFLP fragmentmintázat értékelése során az 50 és 500 bp közötti mérettartományban minden monomorf (minden mintára jellemző) és polimorf (legalább egy mintára nem jellemző) AFLP markert megvizsgáltunk, azok meglétét vagy hiányát bináris adatok formájában rögzítettük. Ha egy adott marker jelen volt, akkor 1-es értéket, ha nem, akkor 0 értéket kapott. A bináris értékekből 0/1 adatmátrixot készítettünk, amelyek a fenetikai és filogenetikai elemzések és a populációgenetikai mérőszámok számításának alapját jelentették.

Az elővizsgálatok során a poliakrilamid géleken elválasztott AFLP fragmentek mintázatát ezüsfestéssel tettük láthatóvá, majd bináris adatokká alakítottuk. Ezekből első lépésként NEI és LI (1979) genetikai hasonlósági mutatókat számoltunk, majd megállapítottunk a vizsgált minták páronkénti genetikai távolságát, amelyből távolságmátrixot állítottunk elő. A távolságmátrix alapján UPGMA dendrogramokat szerkesztettünk a UVIBANDMAP Analysis programmal.

A teljes adatsor bevonása során a kapilláris elektroforézissel detektált AFLP fragmenteket bináris adatokká alakítottuk, majd ezek alapján filogenetikai és fenetikai elemzéseket végeztünk. A filogenetikai összefüggések megállapítására parszimónia alapú elemzést végeztünk PAUP* v4.0b10 programmal (SWOFFORD 2003). A parszimónia módszerek az adatmátrixból számolva nagy valószínűséggel megtalálják a legtakarékosabb -legkisebb össz-élhosszúságú- fát. Míg a Fitch-féle parszimónia (FITCH, 1971) lehetőséget ad több karakterállapotra (pl. a négyféle nukleotid), addig a Wagner-parszimónia (FARRIS, 1977) bináris vagy sorba rendezett adatokat igényel. A Dollo parszimónia (FARRIS, 1970) csak egy irányba engedi változni a tulajdonságokat, azonban egy karakterállapotnak csupán egyféle származtatását engedélyezi (PODANI, 1997). Az AFLP analízis esetén az adatok megjelenésének és elvesztésének egyenlő esélye alapján a Dollo parszimónia a legalkalmasabb parszimónia módszer az eredmények kiértékelésre (SWOFFORD & OLSEN 1990, BACKELJAU et al. 1990). Ez alapján AFLP adataink filogenetikai kiértékeléséhez mi is ezt a módszert alkalmaztuk. A parszimónia elemzéseket elvégeztük a teljes adatsorral, valamint egy szűkített adatsorral is, amelyből kizártuk a feltételezett hibrid taxonokat (*C. vittatus* és *C. scepusiensis*).

A fenetikai elemzés során Jaccard hasonlósági index alapján PcoA analízist végeztünk PC-Ord szoftver használatával.

Populációgenetikai elemzéseink során a genetikai variabilitás mértékének megállapítására a következő mérőszámokat határoztuk meg. Vizsgáltuk az AFLP fragmentek számát, a polimorf fragmentek számát és a genetikai diverzitás mértékét az átlagos heterozigóta gyakoriság (H_e) értékével kifejezve. A *Crocus vernus* fajcsoporthoz tartozó fajok populációszerkezetének hierarchiáját varianciánalízissel (AMOVA) vizsgáltuk 999 ismétléssel, amelynek során két különböző csoportosítást elemtünk. Az első elemzés során a populációkat defináltuk önálló csoportokként, míg a második elemzés során a fajokat. Az analízisből a *C. neapolitanus* fajt kizártuk, mivel a vizsgálatokhoz egyetlen egyed állt rendelkezésre. A genetikai divergencia mérőszámaként a Φ_{PT} értékét határoztuk meg, amely az F_{ST} értéknek feleltethető meg multiallélos markerezési módszerek alkalmazása esetén (Nei 1973). Populációgenetikai vizsgálatainkat a GenALEx 6.5 programmal végeztük.

A hibridizáció vizsgálatára Bayes-féle utólagos valószínűségen (“Bayesian posterior probability”) alapuló statisztikai analízist végeztünk a *C. heuffelianus*, *C. vernus*, *C. scepusiensis* és *C. vittatus* minták bevonásával a NewHybrids programmal (ANDERSON & THOMSON 2002). Az utólagos valószínűség kiszámítása a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmuson alapszik, amely egy randomizációs technika az utólagos valószínűségek becslésére. A NewHybrids egy speciálisan hibridizációs fajkeletkezés tesztelésére írt program, amely hat lehetséges genotípus csoportot (P_1 : első szülői genotípus, P_2 : második szülői genotípus, F_1 : első generációs hibridek, F_2 : második generációs hibridek, $B_{\times 1}$ és $B_{\times 2}$: visszakereszteződések) definiál az általunk vizsgált taxonok *a priori* csoportosításában. Az analízist 20000 generáción keresztül futtatuk, azonban az első 5000 futást az elemzés során nem vettük figyelembe.

Kloroplaszt szekvencia adatok elemzése

A kapott szekvenciákat az elektroferogramjaik alapján ellenőriztük, az egyértelmű szekvenálási hibából adódó báziscseréket kijavítottuk a Chromas Lite 2.0 program segítségével. A szekvenciák illesztését a BioEdit v7.1.3 program segítségével végeztük (HALL 1999). A lehetséges rokonsági kapcsolatokat az egyes taxonok közötti pontmutációk alapján vizsgáltuk MP analízissel (FITCH *et al.* 1971), PAUP* v4.0b10 program segítségével. Kulcsoportként a vizsgálatba a *C. banaticus* négy különböző populációjából származó egyedeket vontuk be. A törzsfá elágazási pontjainak statisztikai támogatottságát bootstrap (BS) módszerrel (FELSENSTEIN 1985) teszteltük 1000 ismétléssel.

Citológiai vizsgálat

A citogenetikai vizsgálatok során a *Crocus vernus* fajcsoportához tartozó fajok és a *C. tommasinianus* esetében is kromoszóma szám meghatározást végeztünk. A vizsgálatához gyökércsúcsok merisztéma sejtjeit vizsgáltuk. A mintákat előkezeltük α -monobróm-naftalin telített vizes oldatában szobahőmérsékleten 2 órán át. Ezután Carnoy-oldatban (etanol: ecetsav 3:1) fixálátuk 24 órán keresztül. A fixálás után a mintákat 70%-os etanolba tettük és felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Ezt követően dörzs-preparátumot készítettünk, amelyet 1%-os kármínecetsavval festettünk. A mintákat Zeiss Axio Imager A2 optikai mikroszkóppal vizsgáltuk és Zeiss AxioCam HRC készülékkel digitalizáltuk. A képek elkészítéséhez mintánként a 3-6 legjobb metafázisos sejtet választottuk ki.

4. Eredmények

AFLP vizsgálatok

Az AFLP technika alkalmazásával 8 *Crocus* faj genetikai variabilitását vizsgáltuk 32 populáció esetén két különböző kísérleti rendszerben, amelynek során a következő eredményeket kaptuk.

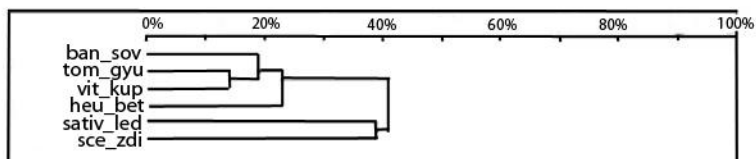
AFLP elővizsgálatok

Az AFLP elővizsgálatok során 6 *Crocus* faj genetikai variabilitását vizsgáltuk AFLP markerek alapján. A vizsgálatokba kulcsoportként *C. sativus* és *C. banaticus* egyedeket vontunk be. A *C. vernus* fajcsoportot a *C. vittatus*, *C. scepusiensis* és *C. heuffelianus* s.s. taxonok képviselték. Ehhez a vizsgálathoz azonban még nem állt rendelkezésünkre *C. vernus* minta. Az analízishez populációnként egy egyedet vontunk be. A restikciós DNS fragmentek amplifikációja egy lépésben történt *EcoRI*-ACG és *TruI*-CAA primerpár alkalmazásával. Az akrilamid gélelektroforézissel elválasztott fragmenteket 50-500 bp tartományban detektáltuk, amelyeket bináris adatokká alakítottunk. A Nei és Li hasonlósági mutató alapján készített távolságmátrix felhasználásával három különböző UPGMA dendrogrammot készítettünk (6. ábra A, B, C). Az egyes UPGMA dendrogrammok szerkesztését az adott fajt reprezentáló különböző egyedek bevonásával végeztük.

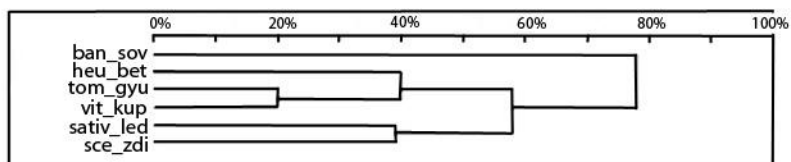
A három különböző elemzésben a *C. heuffelianus*, *C. vittatus* és *C. tommasinianus* minták egy kládot alkottak, azonban a *C. scepusiensis* minták esetén nagyobb genetikai távolságot állapítottunk meg. Az elemzésekben a különböző *C. scepusiensis* egyedekről általánosan elmondható, hogy a kulcsoportként bevont taxonokkal (*C. sativus*, *C. banaticus*) hozhatók szorosabb kapcsolatba. Az A és B elemzésben szereplő egy-egy különböző *C. scepusiensis* egyed egy kládon belül helyezkedett el a *C. sativus* mintával, míg a C elemzésben szereplő egyed a *C. banaticus* mintával alkot egy klasztert.

A kulcsoportként bevont *C. sativus* és *C. banaticus* fajok elkülönülését nem sikerült egyértelműen megállapítani.

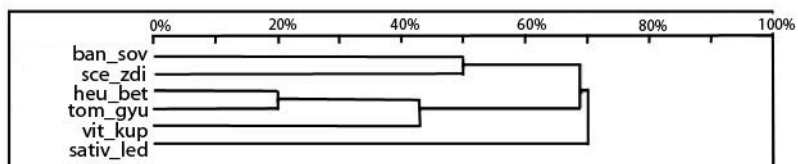
A



B



C



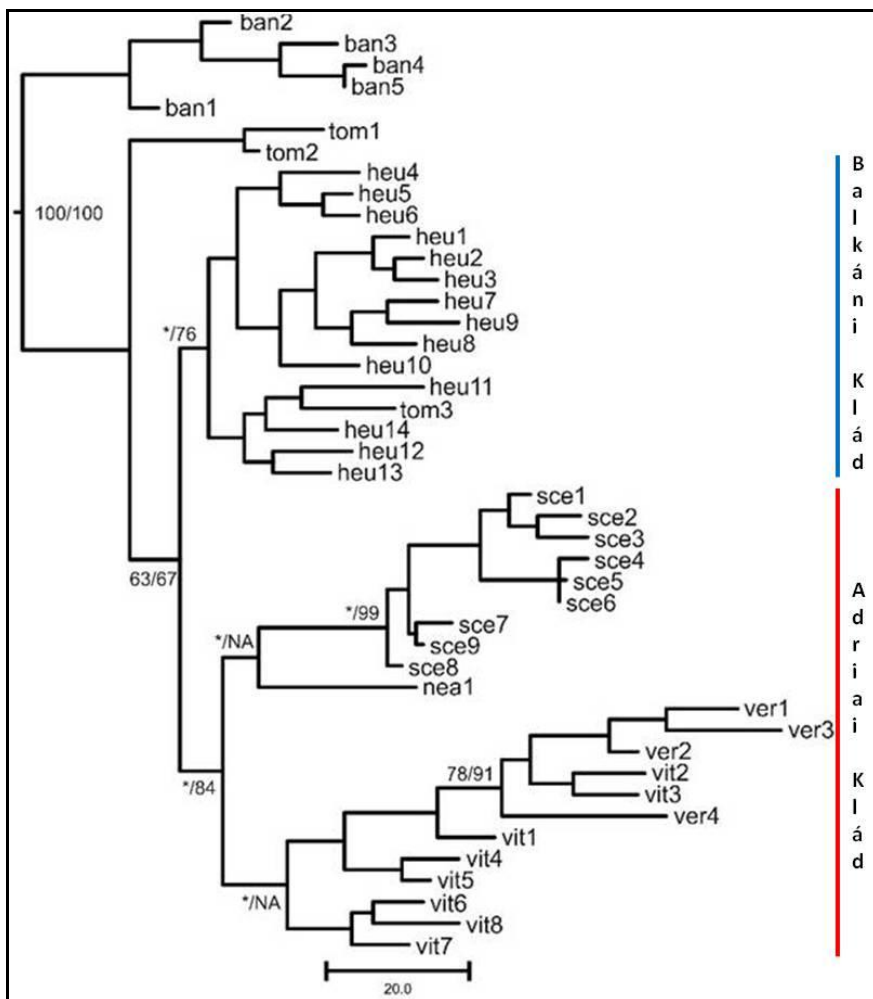
6. ábra Az AFLP elővizsgálatok eredményeiből készített UPGMA dendogrammok. Az A, B és C dendogrammok az analízisbe bevont adott fajt reprezentáló különböző egyedekben térnek el. Az analízisben szereplő *Crocus* minták pontos nevét és lelőhelyét az 1. táblázat tartalmazza.

AFLP vizsgálatok a teljes adatsoron

A teljes adatsor bevonásával készített AFLP analízis során hét *Crocus* faj 44 egyedét vizsgálatuk. Populációnként két vagy három egyedet vontunk be. Ez alól kivételt képzett a *C. neapolitanus* faj, amelyből csak egy egyed állt rendelkezésünkre. A három szelektív primerkombináció összesen 185 AFLP fragmentet eredményezett, amelyek közül 157 volt polimorf (85%). A detektált fragmentek száma primerpáronként 42 és 73 között változott. A legtöbb fragmentet az *EcoRI*-AAG és *TruI*-CAG primerkombináció, míg a legkevesebbet az *EcoRI*-ACC és *TruI*-CTG primerekkel történő amplifikáció eredményezte. Az AFLP adatok alapján filogenetikai, fenetikai és populációgenetikai elemzéseket végeztünk.

Az MP analízis eredményét az 7. ábrán látható kladogram mutatja be. A teljes adatsor bevonásával készített filogenetikai fa első leágazását a kulcsoportként bevont *C. banaticus* egyedek alkotják (ban1-5) 100%-os BS támogatottság mellett. A következő leágazásban a *C. tommasinianus* két egyede (tom1-2) és a *C. vernus* fajcsoport egyedei szerepelnek. A *Crocus vernus* fajcsoporton belül a minták két alkládot alkotnak, azonban statisztikai támogatottságot a két csoportra való elkülönülés nem kap. (i) A balkáni kládot a magyarországi és erdélyi *C. heuffelianus* s.s. minták és egy *C. tommasinianus* egyed (tom3) alkotja. (ii) Az adriai klád további két alkládra osztható. Egy kládot alkotnak a magyar és horvát *C. vittatus* és *C. vernus* minták, míg a felvidéki *C. scepusiensis* minták és az olasz *C. neapolitanus* minta egy másik alkládot képvisel. Ezen alkládon belül a *C. scepusiensis* minták 99 %-os BS támogatottság mellett különülnek el a *C. neapolitanus* mintától.

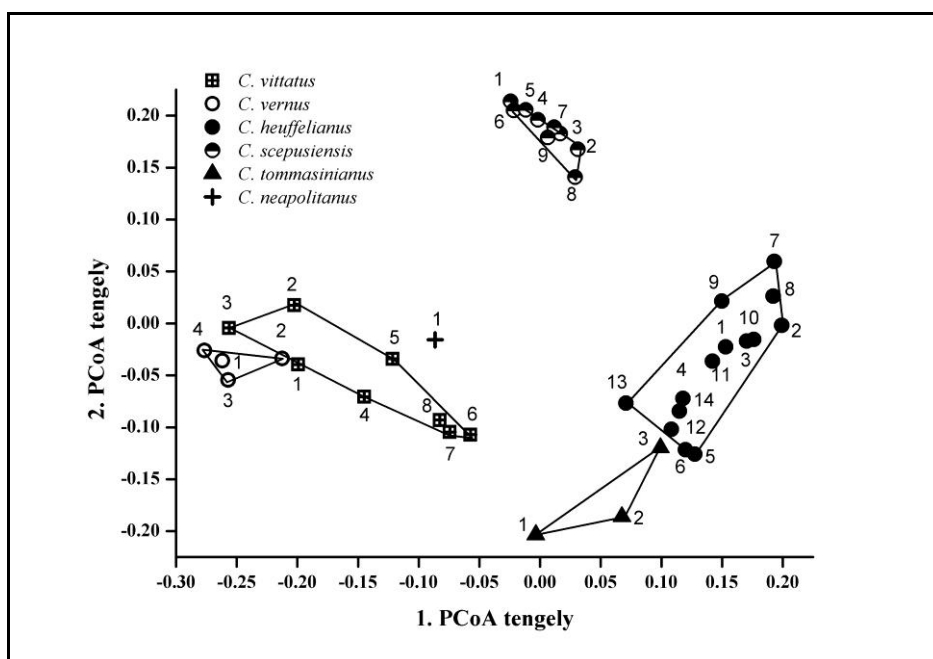
A szűkített adasorral megismételve a MP analízist, amelynek során a feltételezett hibrid mintákat kizártuk az analízisből a balkáni és adriai kládok 84% és 76%-os statisztikai támogatottság mellett különülnek el.



7. ábra Az általunk vizsgált *Crocus* mintákból származó AFLP adatok alapján rekonstruált MP filogenetikai fa.

A PCoA analízis a *Crocus vernus* fajcsoporton belül elkülönítette az általunk vizsgált hat taxont megerősítve a faji szintű elkülönülésüket. Kivételt egyetlen *C. vernus* egyed jelentett (ver2), amely a *C. vittatus* egyedek által alkotott csoportba került (8. ábra). Első tengely a variancia 24%-át magyarázza, míg a második tengely a 15%-át. Az analízis három fő csoportba osztja a mintákat.

Az MP analízishez hasonlóan a balkáni csoportot a *C. heuffelianus* s.s. és *C. tommasinianus* minták alkotják, míg az adriai csoportot a *C. vernus*, *C. vittatus* és *C. neapolitanus* egyedek. A *C. scepusicensis* minták által alkotott harmadik csoport a második PCoA tengely mentén egyértelműen elkülönül a balkáni és adriai csoport egyedeitől. Az első PCoA tengely mentén pedig a balkáni és adriai klád között, köztes helyzetben helyezkedik el (8. ábra).



8. ábra: A *Crocus vernus* fajcsoportból gyűjtött minták AFLP adatain alapuló főkoordináta analízis ordinációs ábrája.

A populációgenetikai vizsgálataink során faji szinten vizsgálódva meghatároztuk AFLP fragmentek számát (F_{tot}) és a polimorf AFLP fragmentek számát (F_{pol}). Az F_{pol} érték a *C. banaticus* esetén volt a legmagasabb, 13 egyedi fragmenttel. A *C. vernus* fajcsoport közeli rokonfaja, a *C. tommasinianus* esetén 5 polimorf fragmentet detektáltunk, míg a *C. vernus* fajcsoport tagjai között a *C. neapolitanus*, *C. vittatus* és *C. heuffelianus* fajokat 4, a *C. scepusiensis*-t 3, a *C. vernus*-t 1 polimorf fragment jellemezte (2. táblázat).

A genetikai diverzitást kifejező átlagos heterozigóta gyakoriság (H_e) értékek alacsonyak voltak, 0,094 és 0,163 között változtak. A legalacsonyabb a külcsoporthként bevont *C. banaticus* estén volt (0,094). A *C. vernus* fajcsoport tagjai között ez a mutató 0,105 és 0,163 között változott (2. táblázat).

2. táblázat A genetikai variabilitás mérőszámai az AFLP adatok alapján. N - mintaszám, F_{tot} - fragmentek száma, F_{pol} - polimorf fragmentek száma, H_e - átlagos heterozigóta gyakoriság.

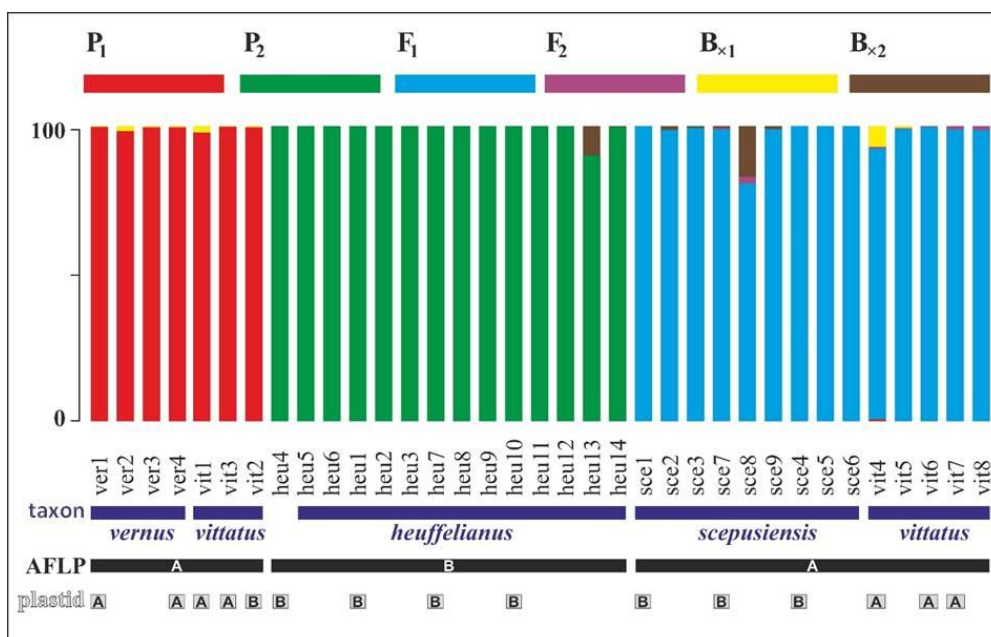
Faj	N	F_{tot}	F_{pol}	H_e
<i>C. banaticus</i>	5	93	13	0,094
<i>C. vernus</i>	4	109	1	0,137
<i>C. heuffelianus</i>	14	127	4	0,155
<i>C. scepusiensis</i>	9	114	3	0,105
<i>C. vittatus</i>	8	129	4	0,163
<i>C. neapolitanus</i>	1	82	4	NA
<i>C. tommasinianus</i>	3	102	5	0,109

A továbbiakban molekuláris varianciaanalízist végeztünk (AMOVA), amelynek során a teljes genetikai varianciát populációk és fajok szintjén vizsgáltuk. A populációk összehasonlítása során a teljes variancia nagyobb része a populációk közötti különbségből származott (57%), míg a populációkon belül ez az érték 43 % volt. Faji szinten vizsgálódva azonban a teljes variancia 61 %-a a fajok közötti varianciából adódott, míg fajokon belül ez az érték 39% volt (3. táblázat). A populációs és faji szintű csoportosítást összehasonlítva a populációk közötti genetikai differenciálódás mértéke magasabb volt ($\Phi_{IPT}=0,573$, $p<0.001$), mint fajok között vizsgálódva ($\Phi_{IPT}=0,389$, $p<0.001$).

3. táblázat Az AMOVA mérőszámai 13 *Crocus* populáció AFLP adatai alapján. *df* – szabadsági fok; *** – $P < 0.0001$

Variancia komponensei	<i>df</i>	Variancia	Variancia (%)	Φ_{IPT}
Populációk szintjén				
Populációk között	12	12,194	57	0,573***
Populációkon belül	24	9,076	43	
Fajok szintjén				
Fajok között	4	8,853	39	0,389***
Fajokon belül	32	13,916	61	

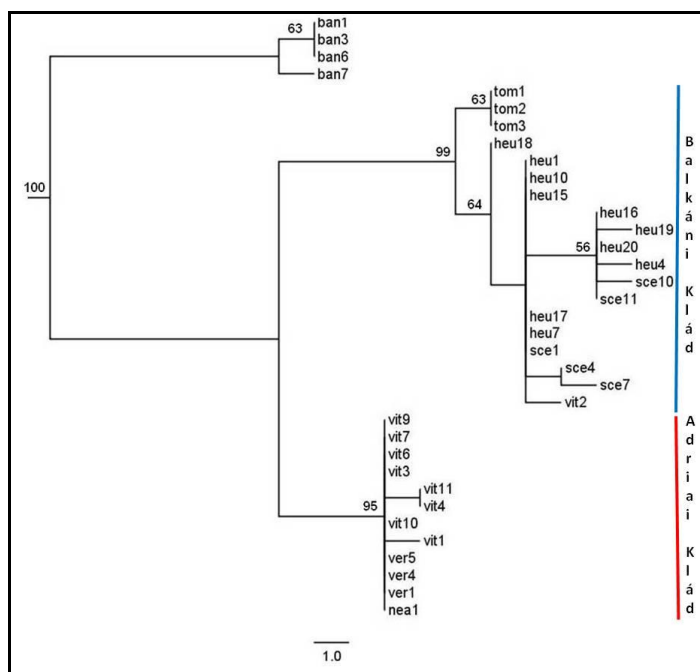
A NewHybrids analízis a *Crocus vernus* fajcsoporton belül három genetikai csoportot különített el (9. ábra). A Bayes-féle utólagos valószínűségeken alapuló hibridizációs vizsgálat P1 szülői genotípusnak a *C. vernus* és a horvát magashegységi *C. vittatus* mintákat állapította meg 100% valószínűséggel. A második, P2 szülői genotípus a *C. heuffelianus* szintén 100% valószínűséggel. F1 hibrid kategóriába a *C. scepusiensis*, a magyar és horvát *C. vittatus* minták tartoztak. B_{x1} és B_{x2} kategóriákra jellemző genotípusok a vizsgált taxonok esetében nem fordultak elő.



9. ábra Bayes-féle utólagos valószínűségeken alapuló analízis eredményei a *Crocus vernus* fajcsoporthoz tartozó taxonok bevonásával.

Szekvencia alapú vizsgálatok eredményei

A kloroplaszt szekvencia analízis során 35 *Crocus* minta esetén határoztuk meg az *accD-psaI* intergénikus spacer bázissortrendjét. Az illesztett szekvencia szakaszok 1053 bp hosszúságúak voltak és 30 variabilis karaktert hordoztak, amelyek közül 27 volt informatív a MP vizsgálatokhoz. A kloroplaszt szekvencia alapú filogenetikai elemzés során AFLP fa topológiájához hasonló filogenetikai fát kaptunk (10. ábra). Az elágazási pontok statisztikai támogatottságát a fán jelzett BS értékek mutatják. A kladogram első leágazását a külsoportként bevont *C. banaticus* alkotja 100%-os BS támogatottság mellett. A filogenetikai fa ezt követően hasonlóan az AFLP markerek alapján rekonstruált dendrogramhoz két alkládra bontható. (i) A balkáni kládot a *C. vernus* fajcsoport közelrokona, a *C. tommasinianus* három egyede, valamint a *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* minták és egy a Velebitből származó *C. vittatus* (vit2) minta alkotja (BS: 99%). Ezen belül a *C. tommasinianus* egyedek 63 %-os statisztikai támogatottság mellett különülnek el a *C. vernus* fajcsoport tagjaitól. (ii) Az adriai kládot (BS: 95 %) a *C. vittatus*, *C. vernus* és *C. neapolitanus* egyedei alkotják, faji szinten azonban nem különülnek el.



10. ábra Az *accD-psaI* szekvencia adatok alapján rekonstruált MP kladogram. A törzsfá elágazási pontjain a bootstrap értékkel feltüntetve.

Citológiai vizsgálatok eredményei

A citogenetikai vizsgálatok során a *Crocus vernus* fajcsoportához tartozó fajok és a *C. tommasinianus* esetében is kromoszóma szám meghatározást végeztünk. A mikroszkópos vizsgálatok során a *Crocus* fajok esetén viszonylag nagyméretű és jól tanulmányozható kromoszómákat találtunk. A *C. vernus* kőszegi populációjából származó minta (ver4) esetén $2n=8$ kromoszómaszámot állapítottunk meg. A Kárpátalja területéről, Munkács környékéről származó *C. heuffelianus* s.s. (heu7) kromoszómaszáma $2n=10$. A felvidéki Krivá település környékéről származó *C. scepusiensis* (sce1) kromoszómaszáma $2n=18$. A magyar *C. vittatus* populációk esetén (vit6, vit9) $2n=18$ kromoszómaszámot állapítottunk meg. A Gyulaj környékéről származó *C. tommasinianus* minta (tom1) kromoszómaszáma $2n=16$. A citológiai vizsgálatokat Barabás Sándor a Budapesti Corvinus Egyetem KTK Növényteni Tanszékének munkatársa végezte. Az együttműködés elektronikus levelezés formájában jött létre 2012. szeptember 5-én.

4. táblázat: A *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei taxonjainak kromoszómaszám adatai. A lelőhelyek rövidítése esetén az országneveket reprezentáló ISO 3611-1 szabványt követtem.

Taxon	Lelőhely	Kromoszóma adat (2n)	Forrás
<i>C. vernus</i>	SI: Bled	8	Brighton et al. (1973)
	AT: Graz	8	Brighton (1976)
	IT: Dolomitok	8	Brighton (1976)
	HR: Karlobag	8	Brighton (1976)
	HU: Kőszeg	8	Saját adat
<i>C. heuffelianus</i> s.s.	UA: Huszt	10	Brighton (1976)
	RO: Nagyvárad	10	Brighton (1976)
	UA: Saján	10	Mihaly&Kricsfalusy (1997)
<i>C. scepusiensis</i>	SL: Čertovica	18	Skalińska (1976)
	SL: Murán	18	Brighton (1976)
	SL: Kriva	18	Saját adat
<i>C. vittatus</i>	HU: Kup	18	Saját adat
	HU: Szentá	18	Saját adat
<i>C. tommasinianus</i>	ME: Kotor	16	Brighton et al. (1973)
	HU: Gyulaj	16	Saját adat

5. Diszkusszió

A *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencében előforduló fajainak genetikai variabilitása

Kutatómunkám fő célja a *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei fajainak molekuláris taxonómiai vizsgálata volt. A *C. vernus* fajcsoportban összefoglalt taxonok a molekuláris filogenetikai eredmények alapján a *Crocus* nemzetség *Verni* sorozatához tartoznak, amelynek filogenetikája és citogenetikája aktívan vizsgált kutatási terület (PERUZZI et al. 2013, HARPKE et al. 2014). Több molekuláris eredményeken alapuló publikáció is vizsgálja a *C. vernus* fajcsoport citogenetikai jellegzetességeit és filogenetikai viszonyait, azonban az elterjedési terület észak-keleti részéről, azaz a Kárpát-medencében és térségében előforduló fajok genetikai variabilitásáról, molekuláris filogenetikájáról és pontos taxonómiai viszonyairól keveset tudunk (SKALIŃSKA 1968, BRIGHTON 1976, RAFINSKI & PASSAKAS 1976, MÁJOVSKÝ et al. 1990, FRELLO & HESLOP-HARRISON 2000, HARPKE et al. 2013, 2014).

A Kárpát-medencében és térségében élő *C. vernus* fajcsoportához tartozó taxonok molekuláris filogenetikai és taxonómiai vizsgálatába terepi gyűjtőútjaink révén sikerült bevonnunk az összes itt előforduló taxont. Molekuláris vizsgálataink eredményeképpen a kloroplaszt szekvencia adatok és az AFLP markerek által feltárt filogenetikai megközelítésben a *C. vernus* fajcsoporton belül két fejlődési vonalat különböztetünk meg: a balkáni és adriai kládokat, amelyek két különböző biogeográfiai régiót reprezentálnak. A balkáni kládhoz tartozó taxonok a *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* (plasztid fa estén) és a *C. vernus* fajcsoport közelrokon faja a *C. tommasinianus*. Ezek a taxonok az elterjedési terület észak-keleti, keleti területeit reprezentálják. Az adriai kládhoz tartozó taxonok a *C. vernus*, *C. vittatus* és *C. neapolitanus*, amelyek az elterjedési terület nyugati, dél-nyugati részén fordulnak elő. Ennek a földrajzi mintázatnak a kialakulását minden bizonnyal a földtörténeti Negyedidőszak jégkorszakainak során bekövetkezett folyamatok Nyugat Palearktikum élővilágára és az egyes fajok genetikai változatosságára gyakorolt hatása magyarázza (HEWITT 1999, 2000 és 2004). A kiterjedt jégtakarók a mérsékelt égövi fajokat déli refúgiumokba száműzték. Ezek a területek a *C. vernus* fajcsoport adriai kládjába tartozó taxonok esetében az Appenini félszigeten lehettek. A korábbi molekuláris genetikai eredmények alapján tudjuk, hogy a *C. vernus* fajcsoport areájának közép-olasz területe a fajcsoport egyik fajdiverzitási központja, így azt

feltételezzük az utolsó jégkorszakot követően az area nyugati részét ezen refúgiumok populációi népesítették be újra (HARPKE et al. 2014).

Molekuláris genetikai vizsgálataimban az AFLP elővizsgálat során a restriktions DNS fragmenteket egy lépéses PCR reakcióban amplifikáltuk és poliakrilamid géleken választottuk el. A genetikai variabilitás vizsgálatához NEI és LI (1979) féle genetikai hasonlósági mutatón alapuló UPGMA dendrogrammot készítettünk. A fragmentmintázat kiértékelését nehezítette az egy lépésben történő amplifikációval felszaporított nagyszámú fragment jelenléte. Továbbá az UPGMA klaszteranalízis nem feltétlenül fejezi ki a vizsgált taxonok pontos filogenetikai viszonyait. Elővizsgálatainkban a külső csoportként bevont *C. sativus* és *C. banaticus* fajok elkülönülését nem sikerült egyértelműen megállapítani és a *C. vernus* fajcsoporton belül sem vonhatóak le nyilvánvaló faji szintű elkülönülések. Így a teljes adatsor bevonásakor olyan fenetikai és filogenetikai megközelítést alkalmaztunk, amellyel mélyrehatóbban tudtuk feltárni az AFLP markerek által reprezentált genetikai változatosságot és ezáltal közelebb kerülhettünk a *C. vernus* fajcsoport fejlődéstörténetének és pontosabb rokonsági viszonyainak megértéséhez.

A teljes *Crocus* adatsor bevonásával az AFLP analízis optimalizálása során kísérleti rendszerünkben kétlépéses PCR amplifikációt alkalmaztunk és a tesztelt primerkombinációk közül három primerpár által generált fragmenteloszlást találtunk a legmegfelelőbbnek a statisztikai kiértékeléshez. A fragmentmintázat detektálására kapilláris elektroforézist alkalmaztunk. Módszerfejlesztésünknek köszönhetően az AFLP analízis nagyobb felbontóképességet és mélyrehatóbb genetikai vizsgálatot eredményezett, így a *C. vernus* fajcsoporton belül lehetségessé vált a faji szintű identifikálás és a filogenetikai viszonyok részletesebb vizsgálata is. A fajcsoport rokonsági kapcsolatainak pontosabb megértéséhez a filogenetikai vizsgálatokba az *accD-psaI* kloroplaszt intergénikus marker analízisét is bevontuk, amelyet a *Crocus* nemzetség molekuláris genetikai vizsgálatában mi alkalmaztunk elsőként. Összehasonlítva az *accD-psaI* plasztid marker és az AFLP markerek felbontóképességét az AFLP technika faji szinten magasabb felbontást eredményezett. A plasztid fán a balkáni és adriai klád magas statisztikai támogatottság mellett különül el, azonban a kládokon belül a fajok keverednek (10. ábra). Így az *accD-psaI* plasztid marker a *Crocus vernus* fajcsoporton belül a faj szintű azonosítást már nem teszi lehetővé. A szekvencia variabilitás hiányának hátterében a taxonok gyors evolválódása és recens eredete állhat, amelyet 6 potenciális kloroplaszt barcoding régió

alkalmazásával SEBERG & PETERSEN (2008) is megállapított a *Crocus* genus átfogó filogenetikai vizsgálata során.

Az AFLP markerek maximum parszimónia alapú filogenetikai elemzése és a főkoordináta analízis módszerével végzett fenetikai elemzés is a *Crocus vernus* fajcsoporton belül két fejlődési vonalat különböztet meg (7. ábra). A monofiletikus balkáni kládot a *C. heuffelianus* s.s. egyedek és egy *C. tommasinianus* egyed (tom3) alkotja. A *C. vernus* fajcsoportjához tartozó többi taxon a szintén monofiletikus adriai kládot alkotja, ahol a *C. scepusiensis* egyedek és a *C. neapolitanus* egyed egy különálló alkládot alkotnak, míg a *C. vernus* és *C. vittatus* egyedek egy másik alkládot képviselnek.

A faji szintű felbontóképesség tekintetében az AFLP módszer az *accD-psaI* plazmid markerrel összehasonlítva a *Crocus vernus* fajcsoporton belül árnyaltabb filogenetikai kapcsolatok megállapítását tette lehetővé. Az AFLP adatok filogenetikai és fenetikai analízisében is a *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* és *C. neapolitanus* taxonok faji szinten elkülönültek (7. és 8. ábra). A populációnkénti kettő, illetve három egyedet vizsgálva az AFLP fán ezek a csoportok monofiletikus egységet alkotnak (7. ábra). Azonban az adriai és balkáni klád elkülönülése a teljes adatsor vizsgálatakor statisztikai támogatottságot nem kap, valamint a *C. vernus* és *C. vittatus* egyedeit sem tudtuk faji szinten megkülönböztetni. Ennek hátterében az AFLP technika módszertani tulajdonságai állhatnak. Mivel a teljes genomot vizsgáló módszerről van szó, a filogenetikai kiértékelés során ez a 'filogenetikai zaj' magasabb szintjét eredményezheti, amely a statisztikai kiértékelést bizonytalanná teheti (MEUDT & CLARKE 2007). Másrésről a fajokat jellemző polimorf fragmentek száma alacsony volt (2. táblázat), amely szintén eredményezheti a bootstrap analízis statisztikai bizonytalanságát. Az AFLP adatok parszimónia alapú kiértékeléséhez Dollo parszimóniát alkalmaztunk, amely az AFLP adatok megjelenésének és elvesztésének egyenlőtlen esélye alapján a legalkalmasabbnak tűnik a kiértékelésre, ám KOOPMAN (2005) *Lactuca* fajokon végzett vizsgálata azt mutatja, hogy a módszer túl szigorú lehet a megfelelő fa felépítéséhez és az AFLP adatok filogenetikai értékeléséhez. Továbbá a statisztikai megbízhatóságot befolyásolhatja, ha gyors fajkeletkezés áll a háttérben, így ebben az esetben az eltelt idő alatt az AFLP markerek nem biztosítanak megfelelő feloldóképességet a mélyrehatóbb filogenetikai kapcsolatok megállapításához. Ezzel a problémával gyakran találkozhatunk az interspecifikus AFLP vizsgálatokban (PLEINES & BLATTNER 2008). Azonban a feltételezett hibrid eredetű minták (*C. scepusiensis* és *C. vittatus*) kizárásával az AFLP adatok MP analízise

során a balkáni és adriai kládokhoz tartozó fajok elkülönülése már statisztikailag támogatott kapott, 76 % és 84 %-os BS értékekkel.

Populációgenetikai vizsgálatainkban a Kárpát-medencei *Crocus* fajok esetén a genetikai diverzitás alacsony szintjét állapítottuk meg (2. táblázat). A populációk közötti genetikai variabilitás nagyobb mértékű volt, mint a fajok közötti. Továbbá a populációk szintjén vizsgálódva a genetikai differenciáció is magasabbnak mutatkozott (3. táblázat). Mindezekből arra követhetünk, hogy egy recens fajkeletkezési folyamat áll a Kárpát-medencei fajok diverzifikációjának hátterében.

Molekuláris genetikai és citogentikai eredményeink alapján, valamint a fajok morfológiai jellegzetességeit is figyelembe véve eredményeink összefüggésbe hozhatók a természetvédelmi genetikában alkalmazott Evolúciósan Szignifikáns Egység fogalmával. A vizsgálatainkba bevont *Crocus* fajok közül 6 faj Evolúciósan Szignifikáns Egységként különíthető el. A távolabbi kilsoportként bevont *C. banaticus* egyedei az AFLP és plasztid fán is monofiletikus egységet alkotnak, így a fajt önálló ESU-nak tekintjük (11. ábra). A *C. vernus* fajcsoport közelebbi rokona a *C. tommasinianus* a plasztid fán 63 %-os statisztikai támogatottság mellett alkot egy klasztert. Az AFLP fán a populáció két egyede elkülönül a *C. vernus* fajcsoport egyeditől, azonban egy egyed a *C. heuffelianus*-okkal klasztereződik (11. ábra). Azonban a leplek eltérő színezettsége és kromoszómaszámuk alapján a két faj egyértelműen különíthető. Továbbá HARPKE et al. (2014) a Verni sorozat molekuláris filogenetikájával foglalkozó munkájában megállapította, hogy morfológiai jelegzetességek és molekuláris markerek (ITS, *At103*) alapján a *C. tommasinianus* a nem tagja *C. vernus* fajcsoportnak, annak legközelebbi rokona. Így a *C. tommasinianus* esetén a morfológiai és genetikai jellegzetességet együttesen figyelembe véve a fajt önálló ESU-ként definiálhatjuk.

A *C. vernus* fajcsoporton belül a természetvédelmi genetikában alkalmazott fogalmaknak megfelelően csoportokat csak az AFLP eredmények alapján állapíthatunk meg. A kloroplaszt marker a fajcsoporton belül, faji szinten már nem eredményezett felbontást. Az AFLP fán a *C. heuffelianus* s.s. egyedek monofiletikus egységet alkotnak (11. ábra). Morfológiai jellegzetességeit és $2n=10$ -es kromoszómaszámát is figyelembe véve ez a faj önálló evolúciós egységnek tekinthető. Az adriai kládba tartozó taxonok közül kizárólag a *C. scepusiensis* elkülönülése kap staisztikai támogatottságot (99%), így ez a faj is önálló ESU-ként definiálható. A szintén adriai kládba tartozó *C. vernus* és *C. vittatus* fajok egyedei nem alkotnak monofiletikus egységeket. A *C. vernus* faj leplei fehérek, bibéje a porzókánál

mindíg rövidebb és $2n=8$ -as kromoszómaszám jellemzi. A *C. vitta*us lelplei lilák, bibéje a porzóknál mindíg hosszabb és $2n=18$ -as kromoszómaszám jellemzi. Így a *C. vernus* és *C. vittatus* esetén a morfológiai, kariológiai és molekuláris genetikai eredményeket együttesen figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy ezek a fajok is evolúciósan szignifikáns egységeket reprezentálnak.

A konzervációbiológiában alkalmazott másik fontos definíció a Funkcionális Konzervációs Egység, amelyeket általában az ESU-kon belül határoznak meg és ökológiailag vagy demográfiaiilag elkülönült populációkat jelölnek. Mintagyűjtéseink során csak a *C. heuffelianus* s.s. és *C. vittatus* faj esetén gyűjtöttünk eltérő ökológiájú élőhelyekről mintákat (3. ábra). A *C. heuffelianus* s.s. esetén a heu1-3, heu7-9 és heu18 minták az Észak-Alföld és Kárpátalja területéről, a síkvidéki élőhelyről származtak, míg a többi *C. heuffelianus* s.s. minta hegyvidéki élőhelyről. Az AFLP analízisben a heu 1-3, heu7-9 minták monofiletikus egységet alkottak és elkülönültek a magashegységi *C. heuffelianus* s.s. populációktól, azonban a *C. heuffelianus* s.s. populációk alkotta kládon belül az alkládok struktúrája statisztikai támogatottságot nem kapott (11. ábra). Így a *C. heuffelianus* s.s. fajon belül FCU egységeket nem jelölhetünk ki. A *C. vittatus* esetén a vit4-5, vit6-8, vit9 egyedek síkvidéki, a vit1-3 és vit10-11 egyedek pedig hegyvidéki élőhelyről származtak. Az AFLP fán az adriai kládon belül a vit1-3 egyedek a *C. vernus* egy populációjával elkülönülnek a *C. vittatus* síkvidéki mintáitól, azonban a BS analízis során ezek az alkládok sem kaptak statisztikai támogatottságot (11. ábra). Így a *C. vittatus* esetében sem jelölhetünk ki FCU egységeket. A megmintázott populációkból AFLP vizsgálatainkba nem vontunk be minden populációt és az analizált populációkból is maximum 3 egyed állt rendelkezésünkre. Mindezek alapján az ESU-kon belül a Funkcionális Konzervációs Egységek pontos meghatározásához újabb mintagyűjések szükségesek az area további területeire kiterjesztve és nagyobb egyedszámot vizsgálva.

Vizsgálataink alapján levonható taxonómiai következtetések

A *Crocus vernus* fajcsoport elterjedési területének észak-keleti részén, azaz a Kárpát-medencében és térségében előforduló fajok, nevezetesen a *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* és *C. vittatus* pontos nevezéktana és rokonsági viszonyai a mai modern molekuláris taxonómiai és filogenetikai vizsgálatok eredményeinek ismeretében sem kellően tisztázottak (PERUZZI et al. 2013, HARPKE et al. 2014).

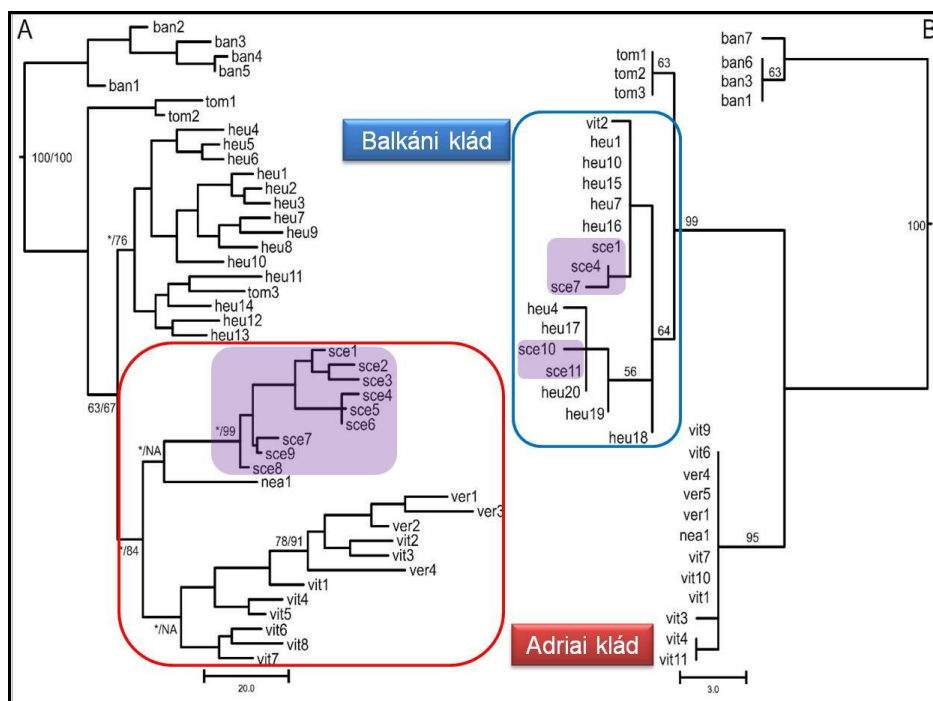
Molekuláris genetikai vizsgálatainkban a *C. heuffelianus* taxon definiálására egy szűkebb értelmezést használtunk, mivel a Kárpát-medencében és térségében (Románia, Ukrajna, Kelet-Szlovákia és Észak-Kelet Magyarország) a *C. heuffelianus* $2n=10$ kromoszómaszámú citotípusa fordul elő (BIGHTON 1976, MÁJOVSKY 1990, MIHALY & KRICSFALUSY 1997). Molekuláris taxonómiai vizsgálatunkban az AFLP eredményeink egyértelműen igazolják a *C. heuffelianus* s.s. faji szintű elkülönülését a *C. vittatus* és *C. vernus* taxonoktól (7. ábra, 8. ábra). A *C. scepusiensis* esetén is hasonlóan egyértelmű faji szintű elkülönülést állapíthatunk meg az AFLP eredményeink alapján. A két $2n=18$ -as kromoszómaszámú, morfológiailag nagyon hasonló *C. scepusiensis* és *C. vittatus* taxonok genetikai eredményeink alapján és elterjedésüket tekintve is faji szinten egyértelműen megkülönböztethető taxonok. A *C. vittatus* és *C. scepusiensis* morfológiai megjelenését tekintve a *C. heuffelianus* fajhoz is hasonlít, azonban a lepeltorokban előforduló szőrözöttség kulcsfontosságú elkülönítő bélyeg ezen fajok összehasonlítása esetén. A Kárpát-medencében előforduló *Crocus* taxonok közül csak a *C. heuffelianus* esetén hiányznak szörképletek a lepeltorokból. A többi taxonra a szőrözött lepeltorok jellemző. Ezt a morfológiai sajátosságot, a molekuláris genetikai és kariológiai eredményeinket együttesen figyelembe véve a *C. heuffelianus* s.s. ($2n=10$), a *C. vittatus* és *C. scepusiensis* taxonok egyértelműen elkülöníthetők egymástól. Továbbá a földrajzi elterjedést és a molekuláris taxonómiai eredményeinket is figyelembe véve megállapítható, hogy a *C. vittatus* faji rangú tagja a *C. vernus* fajcsoportnak és egyértelműen elkülöníthető a hasonlóan $2n=18$ -as kromoszómaszámú *C. scepusiensis* fajtól.

Allotetraploid fajkeletkezés a *Crocus vernus* fajcsoportban

A *Crocus* nemzetségben a természetes hibridek keletkezése ritka. Derganc 1897-ben szlovén sáfrány populációkat vizsgálva leírja a *C. vernus* és a *C. albiflorus* fajok hibridjét, amelynek a *C. Fritschii* nevet adja (DERGANC 1897). BRIGHTON *et al.* (1973) Törökország területéről közöl hibrid fajt a *C. vallicola* ($2n=8$) és a *C. lazicus* ($2n=8$) között. A *C. vernus* fajcsoporton belül WOLKINGER (1964) a *C. napolitanus* ($2n=16$) és *C. albiflorus* ($2n=8$) természetes hibridjét közli a Keleti-Alpokból. Továbbá részletes kariológiai vizsgálatok igazolták a *C. neglectus* allotetraploid hibrid eredetét (FRELLO & HESLOP-HARRISON 2000, PERUZZI & CARTA 2011). A Verni sorozaton belül a hibridizációs folyamatok genetikai hátteréről még keveset tudunk, mindössze az elmúlt két évben jelentek meg publikációk ezzel kapcsolatban (HARPKE *et al.* 2013, 2014). Ezekben a vizsgálatokban az ITS marker és egy nukleáris eredetű, alacsony kópiaszámú gén egy részletének (*At103*) vizsgálata bizonyult alkalmasnak a hibrid fajkeletkezés genetikai vizsgálatára a *C. vernus* fajcsoportban. Ezen szekvencia eredmények alapján a *C. neglectus* feltehetően hibrid eredetű taxon, szülőfajai a *C. ilvensis* ($2n=8$) és *C. vernus* ($2n=8$) vagy *C. neapolitanus* ($2n=8$) taxonok lehetnek (HARPKE *et al.* 2014).

A *Crocus scepusiensis* a *C. vernus* fajcsoport legészakibb elterjedésű faja. Szlovákia és Dél-Lengyelország területein fordul elő és $2n=18$ kromoszómaszám jellemzi (BRIGHTON, 1976). A *C. heuffelianus* szintén $2n=18$ kromoszómaszámú citotípusától való elkülönülését SKALIŃSKA (1968) BRIGHTON (1976) és MÁJOVSKÝ *et al.* (1990) is megállapította, azonban a faj eredete még nem tisztázott. SKALIŃSKA (1968) citológiai vizsgálatai során hasonlóságot talál a *C. albiflorus* ($2n=8$) és *C. scepusiensis* ($2n=18$) kariomorfológiájában. Ez alapján azt feltételezi a *C. scepusiensis* taxon a *C. albiflorus* taxonból származtatható autopoliploid formán keresztül. Biogeográfiai és kariológiai szempontok alapján MÁJOVSKÝ *et al.* (1990) a faj hipertetraploid eredetét feltételezi. A $2n=10$ kromoszómaszámú *C. heuffelianus* citotípusból származtatja, autopoliploid fajkeletkezés útján, amelyet aneuploidizáció követett. Ily módon a megduplázódott genom 20 kromoszómájából kettőt elveszítve állandósult a $2n=18$ kromoszómaszámú forma.

Filogenetikai vizsgálataink során az AFLP markerek alapján rekonstruált kladogram és az *accD-psaI* kloroplaszt szekvencia alapú fa a *Crocus scepusiensis* egyedeket az AFLP fán az adriai kládba, ezzel ellentétben a plasztid fán a balkáni kládba helyezi (11. ábra)



11. ábra: A filogenetikai elemzés eredményeit bemutató összehasonlító ábra.
A: AFLP markerek alapján rekonstruált Dollo parszimóna alapú filogenetikai fa.
B: kloroplaszt szekvencia adatok alapján rekonstruált MP alapú filogenetikai fa.

A biparentálisan és maternálisan öröklődő markerek ilyen fajta inkongruenciája filogenetikai vonatkozásban a hibridizációs fajkeletkezési folyamatok bizonyítéka (LINDER & RIESEBERG 2004, WAN et al. 2013). Fenetikai vizsgálatainkban a főkoordináta analízis ordinációs ábráján a *C. scepusiensis* egyedek az adriai és a balkáni klád egyedei között egy jól definiálható köztes helyzetű csoportban helyezkednek el (8. ábra), amely szintén a hibridizációra utaló jel (TOYAMA et al. 2014). További vizsgálatainkban a lehetséges szülőfajok (*C. heuffelianus* s.s., *C. vittatus*, *C. vernus*) és a *C. scepusiensis* bevonásával Bayes-féle utólagos valószínűségeen alapuló analízist végeztünk a szülői és hibrid genotípusok megállapítására. Az analízis eredményei alapján a *C. scepusiensis* egyedek és három *C. vittatus* egyed (vit 1-3) az F1 hibrid genotípust képviselik. A P1 szülői genotípus kategóriát a *C. vernus* és három *C. vittatus* egyed, míg a másik

szülői genotípust (P2) a *C. heuffelianus* s.s. egyedek képviselik (9. ábra). Ezek az eredmények szintén a *C. scepusiensis* hibrid eredetét bizonyítják. Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy molekuláris genetikai vizsgálatainkkal egy olyan hibridizációs fajkeletkezési eseményt bizonyítottunk, amelyben a *C. scepusiensis* taxon a balkáni és az adriai klád valamely tagjának hibridizációja révén jöhetett létre. Tehát a *C. scepusiensis* eredetét tekintve allopoliploid fajkeletkezési folyamatot bizonyítottunk, amely a SKALIŇSKA (1968) és MÁJOVSKÝ *et al.* (1990) által megfogalmazott autopoliploid fajkeletkezési hipotézissel ellentétben áll.

A citogenetikai vizsgálataink eredményei a korábban publikált kromoszómaszám adatokkal összhangban állnak (4. táblázat). A *C. heuffelianus* a Kárpát-medence térségében a $2n=10$ -es kromoszómaszámú citotípussal fordul elő. A *C. scepusiensis* és *C. vernus* kromoszómaszáma $2n=18$ és $2n=8$. Ezek a citológiai jellegek a molekuláris markerek alapján feltételezett hibrid eredeten túl arra engednek következtetni, hogy a $2n=18$ -as kromoszómaszámú *C. scepusiensis* a $2n=8$ -as kromoszómaszámú *C. vernus* és a $2n=10$ -es kromoszómaszámú *C. heuffelianus* s.s. hibridje. Így ez a faj az allopoliploid fajkeletkezés egy tipikus példája, amelyben két különböző faj első lépésben hibridizált egymással, majd egy poliploidizációs eseményt követően tetraploid formává alakult.

Hasonló fajkeletkezési folyamatot feltételezhetünk a *C. vittatus* ($2n=18$) taxon esetében is, amely a *C. scepusiensis* fajjal párhuzamosan a Kárpát-medence déli térségében parallel fajkeletkezési folyamat útján jöhetett létre, szintén a $2n=10$ -es *C. heuffelianus* és $2n=8$ -as kromoszómaszámú *C. vernus* allotetraploid hibridjeként. A NewHybrids analízis a horvát magashegységi populáció kivételével (vit1-3) a *C. vittatus* populációk F1 hibrid státuszát igazolta (9. ábra). A kivételt képező populáció három egyedet vizsgálva a kloroplaszt analízisben inkongruens eredményt kaptunk. A vit2 egyed a balkáni kládba klasztereződik, a *C. heuffelianus* s.s.-hoz hasonló haplotípust mutatva. A populáció másik két egyede az adriai kládhoz tartozik, hasonlóan a vizsgálatba bevont többi *C. vittatus* populációkhoz (11. ábra). Ez az eredmény szintén arra enged következtetni, hogy a *C. vittatus* hibridogén fajkeletkezési úton jöhetett létre. A NewHybrids analízis ezt a populációt a *C. vernus* fajjal együtt a P1 szülői genotípushoz sorolta. Molekuláris genetikai eredményeink azonban a *C. vittatus* pontos fajkeletkezési folyamatának megállapítására nem adnak kielégítő választ. A faj genetikai variabilitásának további vizsgálata, az esetleges introgressziós visszakereszteződések lehetőségének vizsgálatával részletesebb molekuláris genetikai vizsgálatokat igényelnek és szükségesegek lehetnek olyan további genetikai markerek

vizsgálati is mint pl. alacsony kópiaszámú nukleáris gének, mikroszatellit markerek. A *C. vittatus* faj hazánk területén éri el elterjedési területének északi határát, az area déli és keleti határaitól azonban keveset tudunk. Így az elterjedési terület ezen részeiről történő további populációk mintázása és vizsgálata világosabb képet adhatna a *C. vittatus* faj genetikai variabilitásáról és evolúciós hátteréről.

6. Összefoglalás

A *Crocus vernus* fajcsoport morfológiailag és citogenetikailag rendkívül változatos növénycsoport, amelyet a Kárpát-medencében és térségében a fehér sáfrány (*C. vernus*), a kárpáti sáfrány (*C. heuffelianus*), a szepességi sáfrány (*C. scepusiensis*), és a halvány sáfrány (*C. vittatus*) képviselnek. A fajcsoport nevezéktana és az ide tartozó taxonok rokonsági kapcsolatai nem kellően tisztázottak. A fajcsoport elterjedési területének egészére kiterjedő, átfogó molekuláris taxonómiai és filogenetikai vizsgálatok még nem készültek.

Kutatómunkám alapvető célja a *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei fajainak molekuláris taxonómiai vizsgálata volt AFLP markerek és *accD-psaI* kloroplaszt szekvencia adatok alapján. Mindemellett citogenetikai vizsgálatainkban kromoszómaszám meghatározást is végeztünk.

Dolgozatom főbb eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

- Az AFLP vizsgálataink optimalizációja során olyan reprodukálható kísérleti rendszert állítottunk fel, amelynek segítségével lehetőség nyílt a *Crocus vernus* fajcsoportoz tartozó taxonok mélyrehatóbb genetikai variabilitás vizsgálatára és filogenetikai viszonyaik pontosabb megállapítására.
- A fajcsoport rokonsági kapcsolatainak potosabb megértéséhez a filogenetikai vizsgálatokba az *accD-psaI* kloroplaszt intergénikus marker analízisét is bevontuk, amelyet a *Crocus* nemzetség molekuláris genetikai vizsgálataiban mi alkalmaztunk elsőként. A plasztid marker a Kárpát-medencei taxonokat balkáni és adriai kládba sorolta, amelyek magas staisztikai támogatottság mellett különültek el. A kládokon belül azonban a fajok keverednek. Így az *accD-psaI* plasztid marker a *Crocus vernus* fajcsoporton belül a faj szintű azonosítást már nem teszi lehetővé.
- Molekuláris vizsgálataink eredményeképpen az AFLP markerek és az *accD-psaI* kloroplaszt szekvencia adatok által feltárt filogenetikai megközelítésben a *Crocus vernus* fajcsoporton belül két fejlődési vonalat különböztetünk meg, a balkáni és adriai kládokat. A balkáni kládhoz tartozó taxonok a *C. heuffelianus*, *C. scepusiensis* (plasztid fa estén) és a *C. vernus* fajcsoport közelrokon faja a *C. tommasinianus*. Ezek a taxonok az elterjedési terület észak-keleti, keleti területeit reprezentálják. Az adriai kládhoz pedig a *C. vernus*, *C. vittatus* és *C. neapolitanus* taxonok tartoznak, amelyek az elterjedési terület nyugati, dél-nyugati részén fordulnak elő.

- Vizsgálataink során a *C. heuffelianus* taxon definiálására egy szűkebb értelmezést használtunk, mivel a Kárpát-medencében és térségében a *C. heuffelianus* $2n=10$ kromoszómaszámú citotípusa fordul elő. Molekuláris taxonómiai vizsgálatunkban az AFLP eredményeink egyértelműen igazolják a *C. heuffelianus* s.s. faji szintű elkülönülését a *C. vittatus* és *C. vernus* taxonoktól.
- Terepi megfigyeléseink alapján fontos megkülönböztető bélyegnek bizonyult a lepelkorok szőrözöttsége. Ezt a morfológiai sajátosságot, a molekuláris genetikai és kariológiai eredményeinket együttesen figyelembe véve a *C. heuffelianus* s.s., a *C. vittatus* és *C. scepusiensis* taxonok egyértelműen elkülöníthetők egymástól. Továbbá a taxonok földrajzi elterjedését is figyelembe véve megállapítható, hogy a *C. vittatus* faji rangú tagja a *C. vernus* fajcsoportnak és egyértelműen elkülöníthető a hasonlóan $2n=18$ -as kromoszómaszámú *C. scepusiensis* fajtól.
- Filogenetikai vizsgálataink során az AFLP markerek alapján rekonstruált kladogram és a kloroplaszt szekvencia alapú fa a *Crocus scepusiensis* egyedeket az AFLP fán az adriai kládba, ezzel ellentétben a plasztid fán a balkáni kládba helyezte. A biparentálisan és maternálisan öröklődő markernek ez a fajta inkongruenciája a faj hibrid eredetét bizonyítja, amelyet a NewHybrids analízis eredménye is megerősített. A citológiai eredmények alapján pedig arra a következtetésre jutottunk, hogy a $2n=18$ kromoszómaszámú *C. scepusiensis* a $2n=8$ -as kromoszómaszámú *C. vernus* és a $2n=10$ -es kromoszómaszámú *C. heuffelianus* hibridje. Így ez a faj az allopoliploid fajkeletkezés egy tipikus példája, amelyben két különböző faj első lépésben hibridizált egymással, majd egy poliploidizációs eseményt követően tetraploid formává alakult.
- Molekuláris genetikai és citológiai eredményeink alapján allotetraploid fajkeletkezési folyamatot feltételezünk a *C. vittatus* ($2n=18$) esetében is, amely a *C. scepusiensis* fajjal párhuzamosan a Kárpát-medence déli térségében parallel fajkeletkezési folyamat útján jöhetett létre, szintén a $2n=10$ -es *C. heuffelianus* és $2n=8$ -as kromoszómaszámú *C. vernus* hibridjeként.

7. Summary

The *Crocus vernus* species complex is a taxonomically and cytogenetically complicated plant group represented by four species in the Carpathian Basin: *C. vernus*, *C. heuffelianus*, *C. scepusiensis* and *C. vittatus*. The nomenclature of the species complex and the relationship of the taxa is not clearly understood. The comprehensive taxonomy and molecular phylogenetic studies of the *C. vernus* species group that covered the distribution area have not been performed.

The aim of this study was to evaluate the genetic variability of the taxa belonging to the *Crocus vernus* species complex in the Carpathian Basin based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) and chloroplast DNA sequences of the *accD-psaI* intergenic spacer combined with cytological observations. In our study two different AFLP experimental procedures were performed. In the first AFLP experiment six *Crocus* populations were analyzed and the genetic relationships were inferred by UPGMA hierarchical clustering method (Fig. 6.). In the second AFLP analysis 18 *Crocus* populations were analysed both phenetically and cladistically (fig 7., 8.). The AFLP dataset was analysed in a cladistical way using MP criterion combined with Dollo parsimony. Genetic diversity and differentiation of the seven investigated *Crocus* species were also evaluated using AFLP data. The Bayesian model based method was used to estimate hybrid genotype posterior probabilities within the *C. vernus* species complex. Furthermore genetic variability was also evaluated using chloroplast DNA sequences of the *accD-psaI* intergenic spacer. Both the AFLP and plastid phylogenetic trees separated the taxa into two groups: (1) a 'Balkan' clade and (2) an 'Adriatic' clade (Fig. 7 and 10.). The Balkan clade contained *C. heuffelianus* from Transylvania and *C. vittatus* samples from Croatia as well as *C. tommasinianus* samples from Hungary; the Adriatic clade included *C. vittatus* and *C. vernus* samples from Hungary and Croatia as well as *C. neapolitanus* from Italy. A hard incongruence was found in the placement of the Slovakian *C. scepusiensis* which was clustered into the Balkan clade based on plastid tree, while it fell into the Adriatic clade on the AFLP tree (Figure 11.). Such incongruence between phylogenies based on biparentally (e.g. AFLP) and maternally (cpDNA) inherited markers are clear indications of hybridisation. Moreover, in our PCoA analysis, samples of *C. scepusiensis* form a well-defined lineage and are placed in an intermediate position between the Adriatic and Balkan groups (Fig. 8). Our molecular results suggest that *C. scepusiensis* may be derived from a cross between a member

of the Balkan clade and the Adriatic clade; BC hybridity analysis reveals that all *C. scepusiensis* specimens and all *C. vittatus* specimens with the exception of three from the Velebit Mountains (vit1–3) are hybrids. The *C. vernus* samples and the three *C. vittatus* individuals were determined by this analysis to be the first parental species (P_1), together with all individuals of *C. heuffelianus* that were determined to be the second parental species (P_2) (Fig. 5). Our findings also demonstrate the hybrid origin of *C. scepusiensis* and are inconsistent with the earlier work of Májovský *et al.* which proposed that *C. scepusiensis* is a ‘hypotetraploid’ taxon that originated from the northern population of *C. heuffelianus* ($2n=10$) by auto-polyploidisation followed by aneuploidy (i.e. loss of two chromosomes). If the chromosome numbers we have presented here (Table 4.) as well as those in the literature are taken into account, a more probable scenario can be drawn. Given the $2n=8$ diploid number of the ‘Adriatic’ *Crocus vernus*, the $2n=10$ diploid number of *C. heuffelianus* s.s., and the tetraploid $2n=18$ of *C. scepusiensis*, it is more likely that *C. scepusiensis* originated from a cross between *C. vernus* and *C. heuffelianus* and that this was followed subsequently by tetrapolyploidisation. Therefore, this species is a classic example of allotetraploid hybridisation, where two different species were first involved in the hybridisation process and this was then followed by polyploidisation.

Our AFLP analysis shows a highly polymorphic banding pattern (85%) and thus achieved better resolution at the species level in comparison to the plastid marker. On the other hand, the number of private bands per species was low (Table 2), introducing statistical uncertainty to the bootstrap analysis due to low levels of species-specific loci. Nevertheless, deeper nodes in our AFLP tree are statistically less reliable, although omission of samples with hybrid origins resulted in increased, but still moderate, statistical support (Fig. 7). The low levels of genetic diversity measured in the AFLP data (Table 2), the fact that more genetic variability is partitioned between populations than between species, and the fact that populations display much higher genetic differentiation than species (Table 3), clearly argues for the importance of an evolutionarily recent separation that accounts for the moderate statistical support on our AFLP-tree (Fig. 7).

Our lowland samples of *Crocus vittatus* are also shown to be of hybrid origin in the BC hybridity analysis (Fig. 9.), based on the AFLP data. In combination with the same ploidy level, $2n=18$, this indicates a similar allotetraploid origin for this species in the southern part of the Carpathian Basin. Although we do not observe the same level of incongruence in the placement of these samples in the topology of the AFLP and plastid trees that

we see in the case of *C. scepusiensis* (Fig. 11), this could be the result of a stochastic molecular evolutionary process—if the maternally inherited plastid marker is descended from a member of the ‘AFLP Adriatic clade’, the samples will not be resolved incongruently on differently inherited trees. However, one sample of *C. vittatus* from the Velebit Mountains was placed incongruently in the plastid analysis. The specimen ‘vit2’ has the plastid haplotype consistent with the ‘plastid Balkan clade’. In summary, we conclude a similar evolutionary origin for *C. vittatus* on the southern arc of the Carpathian Basin, where, similar to *C. scepusiensis*, the same parental species – most probably *C. vernus* ($2n=8$) and *C. heuffelianus* ($2n=10$) – gave rise to the allotetraploid *C. vittatus* that possesses a similar morphology (Fig. 2). Given the different plastid haplotypes of the two tetraploid species, we can also exclude the possibility of taxonomically equating *C. vittatus* with *C. scepusiensis* and can safely conclude that there were two allotetraploid origins of two similar species from the same ancestors and that this represents a case of evolutionary parallelism.

Based on our study of AFLP variability and sequence data from the plastid-encoded *accD-psaI* intergenic spacer together with data on chromosome numbers we provide new insights into the evolutionary history of the *Crocus vernus* species complex. We conclude an allopolyploid hybrid origin of the Northern Carpathian taxon, *C. scepusiensis* ($2n=18$), which might well have arisen from a cross between *C. heuffelianus* s.s. ($2n=10$), a member of a clade of Balkan origin, and *C. vernus* ($2n=8$), a member of a clade of Adriatic origin. In the southern part of our study area, *C. vittatus* ($2n=18$) is most probably also an allotetraploid hybrid descendant of the same parental species, but one that arose evolutionarily independently from previous tetraploids.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Surányi Gyulának a kutatómunkám során nyújtott támogatásáért.

Köszönöm szerzőtársaimnak, különös tekintettel Sramkó Gábornak az AFLP és szekvencia analízisekhez nyújtott nélkülözhetelen szakmai segítségét.

Köszönet illeti továbbá Albert Ágnes-Júliát, Barna Erzsébetet, Czeglédi Leventét, Gonda Sándort, Gulyás Gergelyt, Horváth Orsolyát, Keszei Balázst, Lukács Balázs Andrást, Molnár V. Attilát, Óvári Miklóst, Papp Lászlót, Resetár Annát, Takács Attilát, Vasas Gábort a laboratóriumi és terepi munkákban nyújtott segítségükért.

A dolgozat elkészülését segítette az Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj (TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001), amely az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. Továbbá a vizsgálatok megvalósításához a CROCUSBANK AGRI-2006-0265 pályázat járult hozzá.

9. Irodalomjegyzék

- Abdullaev, F. I., Espinosa-Aguirre, J. J., (2004) Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention* 28: 426-432.
- Ahmad, M., Zaffar, G., Mir, S. D., Razvi, S. M., Rather, M. A., Mir, M. R. (2011) Saffron (*Crocus sativus* L.) strategies for enhancing productivity. *Res Journal of Medicinal Plant Research* 5: 630-649.
- Ajmone-Marsan, J., Gorni, C., Chittó, A., Redaelli, R., Van Wijk, R., Stam, P., Motto, M. (2001) Identification of QTL for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using of AFLP map, different tester, and cofactor analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 230- 243
- An, Z. W., Xie, L. L., Cheng, H., Zhou, Y., Zhang, Q., He, X. G., & Huang, H. S. (2009). A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391: 77-79.
- Anderson, E. C. & Thompson, E. A. (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217–1229.
- Backeljau, T., De Bruyn, L., De Wolf, H., Jordaens, K., Van Dongen, S., Verhagen, R. & Winnepenninckx, B. (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11: 119–130.
- Beiki, A. H., Keifi, F., Mozafari, J., (2010) Genetic differentiation of *Crocus* species by random amplified polymorphic DNA. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18: 1-10.
- Benner, M. S., Braunstein, M. D., Weisberg, M. U. (1995) detection of DNA poly-morphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). *Plant Molecular Reporter* 13: 147–155.
- Brighton, C. A., Mathew, B., Marchant, C. J. (1973) Chromosome counts in the genus *Crocus* (Iridaceae). *Kew Bulletin* 28: 451–464.

- Brighton, C. A. (1976) Cytological problems in the genus *Crocus* (*Iridaceae*): I. *Crocus vernus* aggregate. *Kew Bulletin* 31(1): 33–46.
- Buscon, M., Colli L. , Sánchez, R. A., Santaella, M., De-Los-Mozos, Pascual M, Santana, O., Roldán, M., Fernández, J. A. (2015) AFLP and MS-AFLP Analysis of the Variation within Saffron Crocus (*Crocus sativus* L.) Germplasm *PLoS ONE* 10: e0123434.
- Chennaoni-Kourda, H., Marghali, S., Zitouna, N. & Trifi-Farah N. (2012) Phylogenetic relationships of Mediterranean *Hedysarea* species assessed by AFLP markers. *Plant Systematics Evolution* 298: 51–58.
- Chryssanthi, D. G., Lamari, F. N., Iatrou, G., Pylara, A., Karamanos, N. K., Cordopatis, P., (2007) Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. *Anticancer Research* 27: 357-362.
- Culumber, C. M., Larson, S. R., Jensen, K. B., Jones, T. A. (2011) Genetic structure of Eurasian and North American *Leymus* (Triticeae) wildryes assessed by chloroplast DNA sequences and AFLP profiles. *Plant Systematics Evolution* 294: 207-225.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. Mace, G. M., Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 15: 290–295.
- De Riek, J., De Cock, K., Smulders, M. J., Nybom, H. (2013). AFLP-based population structure analysis as a means to validate the complex taxonomy of dogroses (*Rosa* section *Caninae*). *Molecular phylogenetics and evolution* 67: 547-559.
- Derganc, L. (1897) Ueber zwei vielverkannte *Crocus*-Arten der Krainer Flora *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 47: 17-18.
- Després, L., Gielly, L., Redoutet, B., & Taberlet, P. (2003). Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular phylogenetics and evolution* 27: 185-196.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11–15.

- Erol, O., Kaya, H. B., Azik, L., Tuna, M., Can, L., Tanyolac, M. B. (2014). The genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean islands: a genetic approach. *Turkish Journal of Biology* 38: 48–62.
- Erol, O., Sik, L., Kaya, H. B., Tanyolac, B., Kücük, O. (2011) Genetic diversity of *Crocus antalyensis* B. Mathew (Iridaceae) and a new subspecies from southern Anatolia. *Plant Systematics Evolution* 294: 281–287.
- Farris, J. S. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Systematic zoology* 83-92.
- Farris, J. S. (1977) Phylogenetic analysis under Dollo's Law. *Systematic Zoology* 26:77–88.
- Feinbrun, N. (1958) Chromosome numbers in *Crocus*. *Genetica* 29: 172-192.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernández, J. A. (2004) Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science* 2: 127–159.
- Fitch, W. M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Funk, W. C., McKay, J. K., Hohenlohe, P. A., Allendorf, F. W. (2012) Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 489–496.
- Frello, S. & Heslop-Harrison, J. S. (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Annals of Botany* 86: 317–322.
- Fraser, D. J., & Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular ecology* 10: 2741-2752.
- García-Pereira, M. J., Caballero, A., & Quesada, H. (2010). Evaluating the relationship between evolutionary divergence and phylogenetic accuracy in AFLP data sets. *Molecular Biology and Evolution* 27: 988-1000.

- Goldblatt, P., Takei, M., (1997) Chromosome cytology of *Iridaceae* – patterns of variation, determination of base number, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 285-304.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Harpke, D., Carta, A., Tomović, G., Randelović, V., Randelović, N., Blattner, F.R. & Peruzzi, L. (2014) Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* ser. *Verni* (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 309-325.
- Harpke, D., Meng, S., Rutten, T., Kerndorff, H. & Blattner, F.R. (2013) Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 617-627.
- Heinze, B. (2007). A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant methods* 3: 1.
- Hewitt, G. M. (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Hewitt, G. M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt, G. M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillation in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359: 183–195.
- Hill, J. (1765) *The Vegetable System, Vol. 10*. John Hill, London.
- Hughes, J. B., Daily, G. C., & Ehrlich, P. R. (1997) Population diversity: its extent and extinction. *Science* 278: 689-692.
- Juan, A., Fay, M. F., Pastor, J., Juan, R., Fernández, I., Crespo, M. B. (2012). Genetic structure and phylogeography in *Juniperus oxycedrus* subsp. macrocarpa around the Mediterranean and Atlantic coasts of the Iberian Peninsula, based on AFLP and plastid markers. *European Journal of Forest Research* 131:845-856.

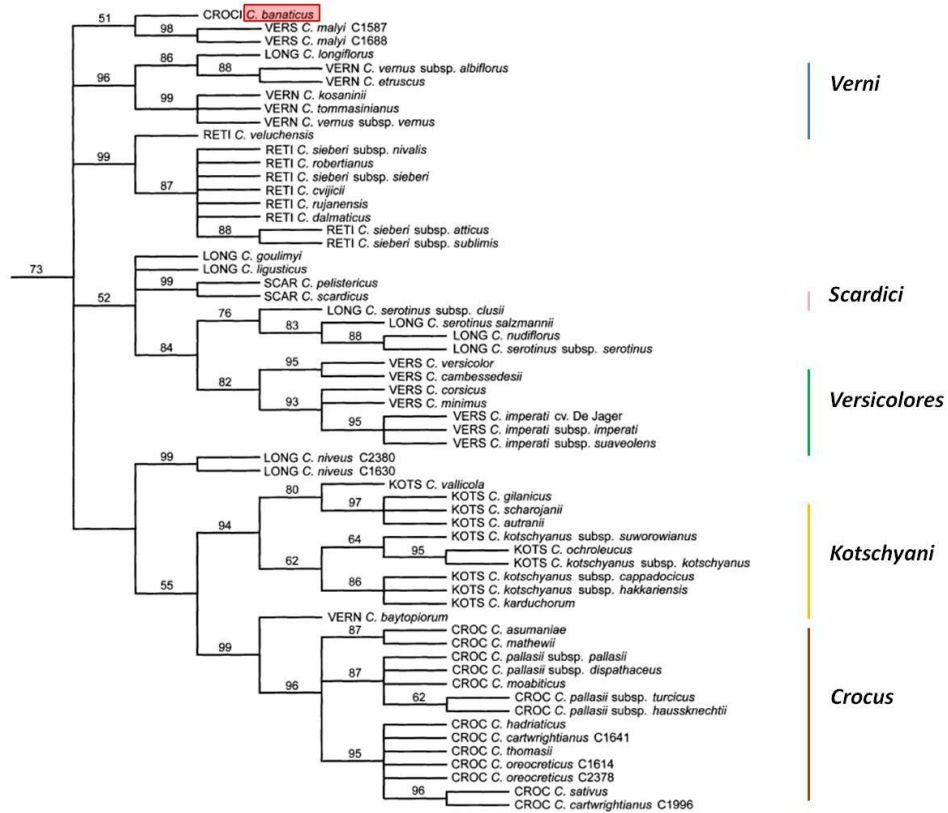
- Keszei, B. (1997) Adatok a fehér sáfrány (*Crocus albiflorus* Kit. ex Schult.) előfordulásának ismeretéhez a Kőszegi hegységben *Kitaibelia* 2 (1): 98-102.
- Kitaibel, P. (1814) *C. albiflorus*- in Schultes J. A. *Össterreich Flora* 2:100-101.
- Király, G. (szerk.) (2007): Vörös Lista. A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai. [Red list of the vascular flora of Hungary]. Sajat kiadás, Sopron
- Koopman, N, W. J. M. (2005): Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Systematic Biology* 54: 197–217.
- Linder, C. R. & Rieseberg, L. H. (2004) Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *American Journal of Botany* 91: 1700–1708.
- Májovský, J., Murín A., Hindáková M. (1990) Karyotaxonomic of Slovak populations of the genus *Crocus* *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae Botanica* 38: 49-87.
- Mathew, Brian (1982) *The Crocus: A Revision of the Genus Crocus* (Iridaceae), London: B.T. Batsford
- Meudt, H. M. & Clarke, A. C. (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses, and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106–117.
- Mihaly, A. & Kricsfalusy, V. (1997) Population biology and ecology of *Crocus heuffelianus* Herb. (Iridaceae) in Ukraine. *Linzer Biologische Beitrage* 29: 641–681.
- Moritz, C. (1994) Defining Evolutionarily-significant-Units for Conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 373–375.
- Mueller, U. G. & Wolfenbarger, L. L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389–393.
- Murín, A. & Hindáková, M. (1984) Karyotaxonómia druhu *Crocus heuffelianus* Herbert a *C. scepusiensis* (Rehm. et Wol.) Borb. na Slovensku. In: Zima, M. & Kubová, A. (1984) Zborník referátov zo IV. zjazdu Slovenskej botanickej spoločnosti SAV, Nitra, 9: 27-31. VŠP, Nitra

- Nazzal, K. W., Shibli, R. A., Makhadmeh, I. M., & Syouf, M. Q. (2011). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis in *Crocus* spp. collected from Northern Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 7:1-8.
- Negbi, M., Dagan B., Dror A., Basker D., (1989) Growth, flowering, vegetative reproduction and dormancy in the saffron *Crocus* (*C. sativus*). *Israel Journal of Botany* 38: 95-113.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Nei, M., Li, W. H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269-5273.
- Németh, F. (1989): Száras növények. [Vascular plants]. In: Rakonczay Z. (ed.): Vörös Könyv. A Magyarországon kipusztult és veszélyeztetett állat- és növényfajok. [Red Data Book. Extinct and threatened animal and plant species of Hungary]. – Akadémiai Kiadó, Budapest
- Peruzzi, L., Carta, A., Garbari, F. (2013) Lectotypification of the name *Crocus sativus* var. *vernus* L. (*Iridaceae*) and its consequences within the series *Verni*. *Taxon* 62: 1037-1040.
- Peruzzi, L. & Carta, A. (2011) *Crocus ilvensis* sp. nov. (sect. *Crocus*, Iridaceae), endemic to Elba Island (Tuscan Archipelago, Italy). *Nordic Journal of Botany* 29: 9–13.
- Petersen, G., Seberg, O., Thorsoe, S., Jorgensen, T. & Mathew, B. (2008) A phylogeny of the genus *Crocus* (*Iridaceae*) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon* 57: 487–499.
- Pleines, T. & Blattner, F. R. (2008) Phylogeographic implications of an AFLP phylogeny of the American diploid *Hordeum* species (Poaceae: Triticeae) *Taxon* 57: 875-881.
- Podani, J. (1997). Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. *Scientia Kiadó*, Budapest.
- Rafinski, J. N. & Passakas, T. (1976) A contribution to the karyology of *Crocus vernus* agg. (*Iridaceae*) from the Iserian Mts (Sudety Mts, Poland). *Plant Systematics and Evolution* 125: 9–13.

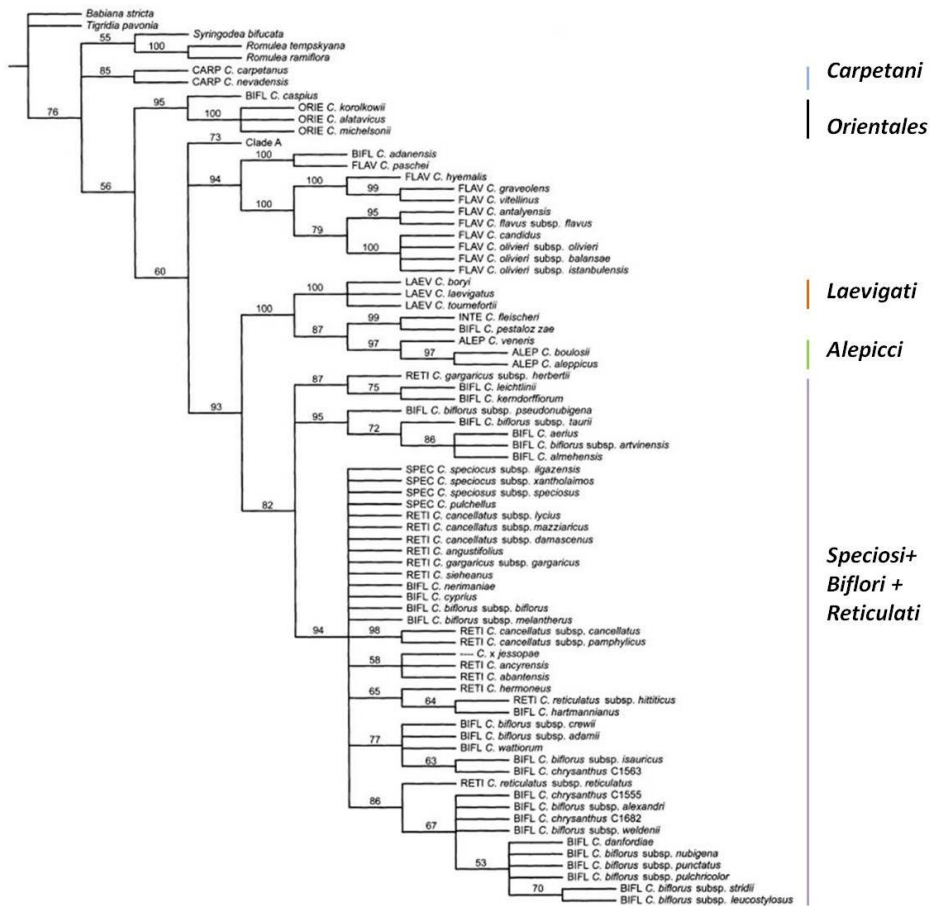
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: The dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 9-10.
- Sammons, D. W., Adams, L. P., Nishazawa, E. E. (1981) Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2: 135–141.
- Schneider, I., Kerndorff, H., & Pasche, E. (2012). Chromosome numbers of Turkish Crocus (*Liliiflorae*, Iridaceae) and their geographical distribution. *Feddes repertorium* 123: 73-79.
- Seberg, O. & Petersen, G. (2009) How many loci does it take to DNA Barcode a *Crocus*? *PLoS ONE* 4(2): e4598.
- Simmons, M. P., Zhang, L. B., Webb, C. T., & Müller, K. (2007). A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 528-542.
- Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Albertini, E., Raggi, L., Marconi, G. (2013) Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (*Crocus sativus* L.) of different origin by LC-UV–vis-DAD and AFLP analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 711–721.
- Skalińska, M. (1966) Cyto-taxonomical studies on the genus *Crocus* L., *C. albiflorus* Kit. *Acta Biologica Cracoviensia Series botanica* 9:137-152.
- Skalińska, M. (1968) Further cyto-taxonomical studies on the genus *Crocus* L., *C. albiflorus* Kit. *Acta Biologica Cracoviensia Series botanica* 1: 31–37.
- Small, R. L., Ryburn, J. A., Cronn, R. C., Seelanan, T., Wendel, J. F. (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear ADH sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* 85: 1301–1315

- Sramkó, G., Molnár V., A., Hawkins, J. A. & Bateman, R. M. (2014) Molecular phylogeny and evolutionary history of the Eurasiatic orchid genus *Himantoglossum* s.l. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 114: 1609–1626.
- Swofford, D. L. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Toyama, H., Kamiyama, T., Yahara, T. (2015). A genome-wide AFLP replacement in a hybrid population derived from two closely related *Viola* species from contrasting habitats. *Plant Systematics and Evolution* 301 :1073-1084.
- Tutin, T. O., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. (1980) *Flora Europaea* 5: 92–99.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, Th., Homes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- Wan, X. Q., Zhang, F., Zhong, Y., Ding, Y. H., Wang, C. L. & Hu, T. X (2013) Study of genetic relationships and phylogeny of the native *Populus* in Southwest China based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* and nuclear DNA. *Plant Systematics and Evolution* 299: 57–65.
- Wolking, F. (1964) *Namen und Verbreitung der Crocus-Sippen des Alpenostsaumes. Jahrbuch des Vereins zum Schutze der Alpenpflanzen und -Tiere.* Freising, Munich. 29: 1–18.
- Wulfen, F. X. (1778) Jacquin N. J. *Flora Austricae* 5:47-48.
- Zubor, Á., Surányi, G., Győri, Z., Borbély, G., Prokish, J. (2004) Molecular biological approach of the systematics of *Crocus sativus* L. and its allies. *Acta Horti* 650: 85–93.

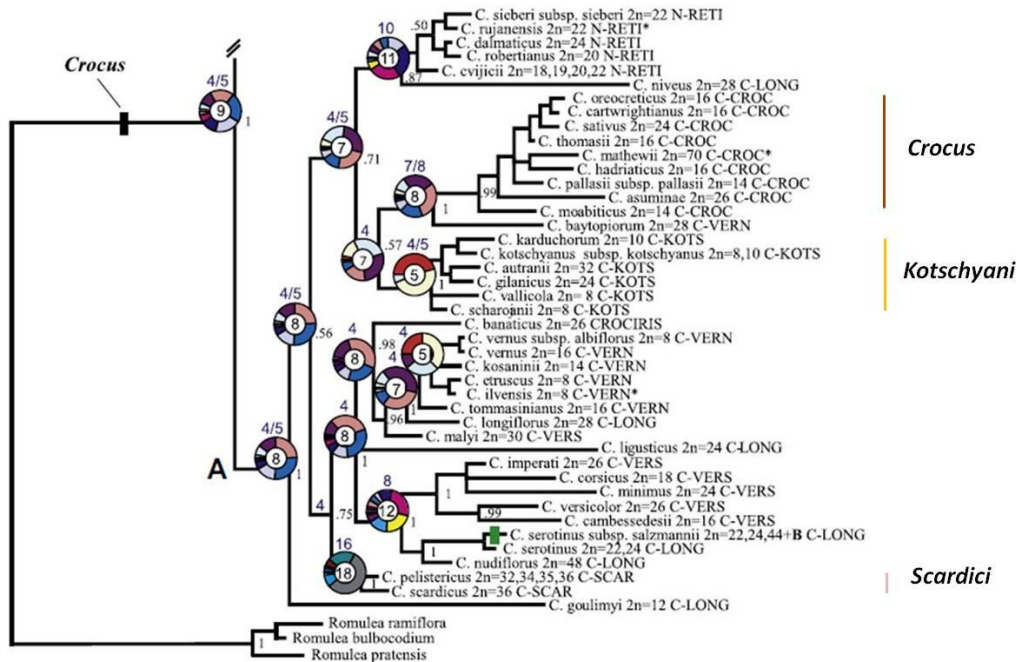
10. Függlék



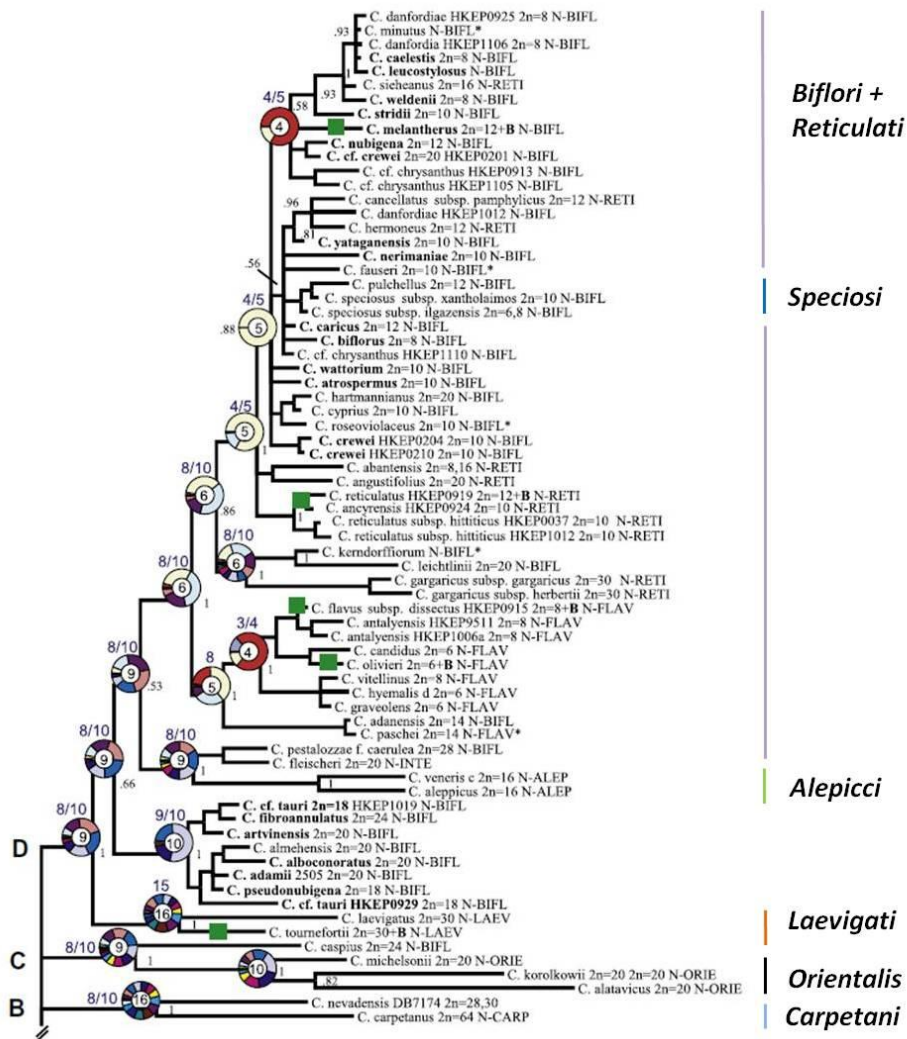
1. ábra A: A *Crocus* nemzetség filogenetikai viszonyait bemutató konszenzus kloroplaszt fa egyik fő kládja PETERSEN et al. (2008) munkája alapján. A kladogrammon megjelölt sorozatok megegyeznek Mathew (1982) morfológiai rendszerében elkülönített sorozatokkal. A *C. banaticus* a kloroplaszt szekvencia eredmények alapján azonban nem alkot önálló kládot (pirossal jelölve).



1. ábra B: A *Crocus* nemzetség filogenetikai viszonyait bemutató konszenzus kloroplaszt fa másik fő kládja PETERSEN et al. (2008) munkája alapján. A kladogrammon a *Speciosi*, *Biflori* és *Reticulati* sorozatok összehasonlítva Mathew (1982) morfológiai rendszerével nem alkotnak monofiletikus egységeket.



2. ábra A: A *Crocus* nemzetség filogenetikai viszonyait bemutató ITS és kloroplaszt DNS alapú kladoگرام első fő kládja HARPKE et al. (2013) munkájában a monofiletikus sorozatokkal feltüntetve.



2. ábra B: A *Crocus* nemzetség filogenetikai viszonyait bemutató ITS és kloroplaszt DNS alapú kladogram további fő kládjai HARPKE et al. (2013) munkájában a monofiletikus sorozatokkal feltüntetve.

Mosolygó-Lukács Ágnes Publikációi - Publications of Mosolygó-Lukács Ágnes

Az értekezés alapjául szolgáló impact faktoros közlemények - Publications with impact factor related to the dissertation

Mosolygó-L. Á.*, Sramkó, G.*, Barabás S., Czeglédi L., Jávorski A., Molnár V. A., Surányi Gy.: Molecular genetic evidence for allotetraploid hybrid speciation in the genus *Crocus* L. (*Iridaceae*) *Phytotaxa* Accepted for publications IF: 1.318

*Megosztott első szerzők-The first two authors have contributed equally to the work.

Surányi G., Máthé C., **Mosolygó Á.**, Borbély G., Vasas G. (2010) Analysis of genetic diversity in crocuses with Carpathian Basin origin using AFLP-markers *Acta Biologica Hungarica* 61:(1) pp. 149-155. IF: 0.793

Egyéb impact faktoros közlemények - Other publications with impact factors

Farkas O., Gyemant Gy., Hajdu G., Gonda S., Parizsa P., Horgos T., **Mosolygó Á.**, Vasas G. Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary (2014) *Acta Biologica Hungarica* 65:(2) pp. 227-239. IF: 0.589

Resztár A., Demeter Z., Ficsor E., Balázs A., **Mosolygó Á.**, Szőke É., Gonda S., Papp L., Surányi Gy., Máthé Cs. (2014) Growth regulator requirement for in vitro embryogenic cultures of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) suitable for germplasm preservation *Acta Biologica Hungarica* 65:(2) pp. 165-177. IF: 0.589

Máthé C., **Mosolygó Á.**, Surányi G., Beke A., Demeter Z., Tóth R.V., Beyer D., Grigorszky I., Mészáros I., M-Hamvas M. (2012) Genotype and explant-type dependent morphogenesis and silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures *Aquatic Botany* 97:(1) pp. 57-63. IF: 1.593

Egyéb közlemények - Other publications

Farkas Oszkár, **Mosolygó Ágnes**, Horgos Tamás, Vasas Gábor (2011) Toxintermelő *Planktothrix* cyanobaktérium fajok és *Prymnesium parvum* (Haptophyta) azonosítása molekuláris markerekkel. *Hidrológiai Közlöny* 91.:6 36-38.

Konferenciák - Conferences

Mosolygó-Lukács Ágnes, Sramkó Gábor, Barabás Sándor, Surányi Gyula: III. Növénybiológiai Workshop, Debrecen, 2014. 11. 06.

Mosolygó-Lukács Ágnes, Sramkó Gábor, Barabás Sándor, Surányi Gyula: A Kárpát-medencében. XV. Kolozsvári Biológus Napok, Románia, Kolozsvár 2014. 04. 04-06.

Mosolygó Ágnes, Surányi Gyula, Sramkó Gábor: A *Pulsatilla patens* filogeográfiája a Kárpát-medencében. XIV. Kolozsvári Biológus Napok, Románia, Kolozsvár 2013. 04. 12-14.

Mosolygó Ágnes, Surányi Gyula, Sramkó Gábor (2013) A *Pulsatilla patens* filogeográfiája a Kárpát-medencében. Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztályának 2013. év tavaszi félévi előadójelentése, Budapest, 2013. 04. 08.

Farkas Oszkár, **Mosolygó Ágnes**, Vasas Gábor: Toxintermelő *Planktothrix* cyanobaktérium fajok és *Prymnesium parvum* (Haptophyta) azonosítása molekuláris markerekkel. LII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2010. október 6-8. (poster)