



**1949**

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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Laczkó Levente

Témavezető  
Dr. Sramkó Gábor  
kutatócsoport vezető

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2021



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

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

Debrecen, 2021.

.....  
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Laczkó Levente** doktorjelölt **2016-2020** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biodiverzitás doktori** programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult.

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

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2021.

.....  
a témavezető aláírása



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

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

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

Írta: **Laczkó Levente** okleveles Biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**  
(**Biodiverzitás Doktori program** programja) keretében

Témavezető: Dr. Sramkó Gábor

Az értekezés bírálói:

.....  
.....

A bírálóbizottság:

elnök: .....

tagok: .....

.....

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja: ..... .



## Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	1
1. Bevezetés .....	3
1.1. Általános bevezetés.....	3
2. Esettanulmányok.....	7
2.1. A <i>Nymphaea lotus</i> var. <i>thermalis</i> harmadkori reliktum eredetének vizsgálata .....	7
2.1.1. Irodalmi előzmények .....	7
2.1.2. Anyag és módszer.....	9
2.1.3. Eredmények.....	15
2.1.4. Diszkusszió.....	18
2.2. Molekuláris filogenetikai bizonyítékok a <i>Hepatica transsilvanica</i> harmadkori, allotetraploid eredetére .....	21
2.2.1. Irodalmi előzmények .....	21
2.2.2. Anyag és módszer.....	24
2.2.3. Eredmények.....	32
2.2.4. Diszkusszió.....	44
2.3. A <i>Primula vulgaris</i> európai léptékű genetikai variabilitásának vizsgálata .....	49
2.3.1. Irodalmi előzmények .....	49
2.3.2. Anyag és módszer.....	50
2.3.3. Eredmények.....	53
2.3.4. Diszkusszió.....	59
3. Összefoglalás .....	63
4. Summary .....	66
5. Köszönetnyilvánítás .....	69
6. Irodalomjegyzék .....	70
7. Publikációk listája .....	79
8. Függelék .....	87
1. Függelék A <i>Primula vulgaris</i> filogeográfiai vizsgálata során felhasznált terepi minták és részletes adataik. ....	87



## Rövidítések

APS	additive polymorphic site / additív polimorf pozíció
BF	bayes factor / bayes faktor
bs	bootstrap / filogenetikai fák elágazásainak megbízhatóságát tesztelő módszer
ESS	effective sample size / effektív mintanagyság
HPD	highest posterior density / denzitásintervallum
NS	nested sampling / bayesiánus statisztikai módszer, ami modelltesztelésre szolgál
PCR	polymerase chain reaction / polimeráz-lánreakció
PHI	pairwise homoplasy index / páronkénti homoplázia index
s.l.	<i>sensu lato</i> / tág taxonómiai értelemben
s.s.	<i>sensu stricto</i> / szűk taxonómiai értelemben
SH-aLRT	Shimodaira–Hasegawa approximate likelihood ratio test / Shimodaira-Hasegawa közelítő valószínűségi arányteszt
SMS	Smart Model Selection, szoftver neve



# 1. Bevezetés

## 1.1. Általános bevezetés

Az elmélet, miszerint a fajok közti leszármazási viszonyok vizsgálata segíthet megérteni a múltbéli elterjedést, ezzel betekintést nyújthat evolúciós történetükbe, csaknem egyidős az evolúcióbiológia tudományával. Darwin (1859) munkássága során kiemelt figyelmet fordított a biogeográfia megismerésére, ami segített megalkotnia elméletét a fajok eredetéről. Később, a Hennig (1965) által lefektetett szisztematikai alapelvek alapján Brundin (1965) vizsgálta elsők között kifejezetten a filogenetikai viszonyok és a biogeográfia kapcsolatát. Az 1980-as években a DNS szekvenálás és a molekuláris filogenetikai módszerek használatának elterjedése forradalmasította az evolúcióbiológia tudományát (Arbogast, 2001). Ezen eszközök elérhetősége a kutatók számára nyitott utat a filogeográfia tudományának. A fogalom megalkotása Avise és mtsai. (1987) munkájához köthető. Habár szűk értelemben az evolúciós leszármazási viszonyok és biogeográfia kapcsolatának értelmezését értjük filogeográfia alatt (Hickerson és mtsai., 2010), tágabb értelmezésben az Avise és mtsai. (1987) által megalkotott koncepció segíthet megérteni a földtörténet, ökológia és a speciáció folyamatát is (Arbogast, 2001). Az evolúciós történet megismerésére irányuló kutatások gyakran kombinálják a populációgenetika, filogenetika, a molekuláris evolúció és a paleoklimatikus rekonstrukció eszközeit. Három évtized alatt a filogeográfia tudománya robbanásszerű fejlődésen ment keresztül és egy számos területet magába sűrítő, önálló tudományterületté nőtte ki magát, amely a modern evolúcióbiológia egyik szerves részét képezi és fő célja a fajok idő- és térbeli történetének megértésére.

Európa élővilágának filogeográfiája régóta tanulmányozott (Hewitt, 1996; 2000). A negyedidőszak glaciális ciklusai számos faj esetében az elterjedési terület összehúzódását, majd kiterjedését idézték elő. A rekolonizáció forrásai azok a refúgium területek, ahol adott faj megfelelő

körülményeket találhatott hosszú távú fennmaradásához (Hewitt, 2000), ami hozzájárult a jelenleg megfigyelhető genetikai változatosság kialakításához (Taberlet és mtsai., 1998). A dél-európai refúgiumok elméletét Hewitt (1996) írta le, aminek értelmében a dél-európai populációk nagy genetikai változatosságot halmoztak fel és a kedvező időszakokban a kontinens rekolonizációjának forrásai lehettek, ami általánosságban délről északra irányuló kolonizációs útvonalakat és az északi populációk kisebb genetikai diverzitását feltételezi.

Valószínűsíthető, hogy az általánosan elfogadott dél-európai refúgiumokon kívül kriptikus (vagy extramediterrán) refúgiumok is szerepet játszhattak egyes fajok jelenkori genetikai diverzitásának kialakításában (Provan & Bennett, 2008; Stewart & Lister, 2001). Ezek a refúgiumok viszonylag északabbra helyezkedhettek el Nyugat- és Közép-Európában (Magri és mtsai., 2006; Michl és mtsai., 2010; Valtueña és mtsai., 2012). Bár pontos kiterjedésük egyelőre nem ismert, a kriptikus északi refúgium elmélet értelmében (Bhagwat & Willis, 2008), a dél-európai félszigetek nem kizárólagos menedékek lehettek több mezofil faj számára. Számos faj, amely viszonylag északabbra, egy kisebb területen alkalmas feltételeket talált fennmaradására, a dél-európai refúgiumokhoz hasonló genetikai diverzitást halmozhatott fel, mi több szolgálhatott későbbi rekolonizációs hullámok forrásaként. Ilyen menedékterületek bizonyítékai ismertek Nyugat-Európából (Valtueña és mtsai., 2012), Közép-Európából (Michl és mtsai., 2010) és a Kárpátokból is (Lendvay és mtsai., 2016).

A Kárpátok hegységgláncát több filogeográfiai tanulmány is potenciális refúgium területként jelölte meg az itt található magas genetikai diverzitás fényében (Daneck és mtsai., 2011; Kramp és mtsai., 2009; Mosolygó-Lukács és mtsai., 2016; Slovák és mtsai., 2012), amely a genetikai sokféleség fontos forrásának bizonyult (pl. Ronikier és mtsai., 2008; Slovák és mtsai., 2012, Mosolygó-Lukács és mtsai., 2016, Mráz & Ronikier, 2016), azonban a régió nagyobb léptékű filogeográfiai szerepét kevesen vizsgálták. Bartha és mtsai.

(2015) az *Erythronium dens-canis* L. filogeográfiai vizsgálata során bebizonyította, hogy az Erdélyi-medencében élő populációk jól elkülönült leszármazási ágat képviselnek, amely a testvérfajtól (*Erythronium caucasicum* Woronow) és a fennmaradó *E. dens-canis* populációktól genetikailag nagyjából egyenlő távolságra helyezkedik el. Hasonlóan, Lendvay és mtsai. (2016) a *Syringa josikaea* J. Jacq. ex Rehb., egy a Kárpátokban endemikus orgona faj eredetét vizsgálta. Filogenetikai vizsgálataik alapján a faj a harmadkori flóra túlélője lehet Európában. Legközelebbi rokonától (*Syringa wolfii* CK. Schneid.) körülbelül 1,88 millió évvel ezelőtt válhatott el és a harmadkori flóra pusztulását az Ukrán-Kárpátokban és az Erdélyi-szigethegységben élhette túl (Lendvay és mtsai. 2016).

Jelenleg kevés tanulmány áll rendelkezésre a Kárpát-medence nagy léptékű biogeográfiai jelentőségének teljes megértéséhez. Dolgozatomban három olyan esettanulmányt mutatok be, amely a molekuláris filogenetika eszközeit használva segíti a régió filogeográfiai jelentőségének megítélését. Az első esettanulmány egy feltételezett harmadkori reliktum, a *Nymphaea lotus* var. *thermalis* (DC.) Tuzson eredetét vizsgálja. A második esettanulmány a Délkelet-Kárpátok egy endemizmusa, a hibrid eredetű *Hepatica transsilvanica* Fuss. és szülőfajai filogenetikai helyzete alapján vázolja fel a Kárpátok jelentőségét az endemikus leszármazási ágak megőrzésében. A harmadik esettanulmány egy széles elterjedésű faj, a *Primula vulgaris* Huds. genetikai struktúrájának elemzése alapján vázol fel hipotéziseket a faj evolúciós történetére.

Mindhárom tanulmány sejtmagi és organelláris (plasztisz) lókuszok genetikai variabilitása alapján von le filogeográfiai következtetéseket. Az első két esetben megbecsültük a vizsgált fajok divergenciájának idejét is. Napjainkban erre a célra elterjedt a bayesiánus statisztika használata. A módszer az adatsorra legjobban illeszkedő szubsztitúciós és molekuláris óra modellek alapján a filogenetika viszonyok rekonstrukcióján túl megengedi és az egyes elágazások dátumának becslését is (Drummond & Rambaut, 2007).

A molekuláris datálás vitathatatlanul fontos kiindulópontja a molekuláris óra megfelelő kalibrációja. Mivel a szubsztitúciós ráta a legtöbb esetben nem ismert, az elemzett taxonok közös ősének minimum korát fossziliák segítségével, vagy ismert geológiai események segítségével állapítják meg a molekuláris óra kalibrálásának céljából. Előbbi megközelítés hátránya, hogy számos esetben nem érhetőek el a datáláshoz megfelelő minőségű fossziliák, ide értve a lelet pontos korát és taxonómiai státuszát, utóbbié pedig erős feltételezésekre támaszkodik az egyes fajok elterjedését illetően és használata nem ajánlott biogeográfiai vizsgálatoknál (Sauquet, 2013). A dolgozatban bemutatott tanulmányok, mivel a vizsgált taxonokból nem érhető el megfelelő minőségű fosszilis lelet, másodlagos datálásra támaszkodnak, amely feltétele legalább egy elágazás reprezentációja egy másik, lehetőleg fossziliák alapján kalibrált filogenetikai elemzésben. Habár ez számos esetben növelheti a módszer bizonytalanságát, legalább két kalibrációs pont használata kielégítő lehet (Sauquet, 2013).

## 2. Esettanulmányok

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

#### 2.1.1. Irodalmi előzmények

A tündérrózsa nemzetségnek (*Nymphaea* L.) öt alnemzetsége ismert, és főként trópusi vízi növényeket foglal magába. A trópusi Óvilág területén fordul elő a *Lotos* DC. alnemzetség, amelynek két faját ismerjük Afrikában és hármat Ázsiában (Conard, 1905). A nemzetség afrikai tagja a *Nymphaea lotus* L., míg testvérfaja, a *N. pubescens* Willd. (Borsch és mtsai., 2007), Délkelet-Ázsiában fordul elő. Kiemelendő a *N. lotus* termál tavi szatellit előfordulása Európában: Románia északnyugati részén a Püspökfürdő melletti Pece-patakban, körülbelül 3000 km-re a legközelebbi Afrikai előfordulási helytől, amely az egyiptomi Nílus-delta. A növényt Kitaibel Pál fedezte fel Nagyvárad mellett 1798-ban és az Afrikából ismert *Nymphaea lotus* L. fajjal azonosította (Waldstein & Kitaibel, 1799).

Egy évszázaddal később már számos kutató fejtette ki véleményét a *N. lotus* itteni előfordulásával kapcsolatban. De Candolle (1821: 54) önálló fajként hivatkozik az állományra (*Nymphaea thermalis* DC.), ma is elfogadott taxonómiai rangját azonban Tuzson Jánosnak (1908) köszönheti, aki a levél alakja és az azon található szörképletekre hivatkozva az afrikai törzsalak egy változatának tekintette (*Nymphaea lotus* var. *thermalis*). Pax (1905) és Staub (1903) egyértelműen a populáció harmadkori eredetére következtettek, feltételezve, hogy az állomány a legutóbbi 2-2,5 millió évet a Nagyvárad közeli meleg vízű forrásoknak köszönhetően vészeltte át Európában, ide érve a negyedidőszak négy legfőbb lehülési ciklusát is. A *N. lotus* itteni populációjának Tercier reliktum eredetére bizonyítékok lehetnek a Pax (1905) által azonosított fosszilizálódott, a fajjal azonosítható levélmaradványok, valamint egy meleg édesvízi csigafaj, a maradványcsiga, *Melanopsis parreysii*

Mühlf., együttes előfordulása a területen (Brusina, 1902), amelyet szintén a püspökfürdői élőhely endemizmusaként tartanak számon (Sírbu & Sárkány-Kiss, 2002). Diaconesa és Popa (1964) pollenanalízisen alapuló tanulmánya is tovább erősítette a populáció harmadkori eredetének valószínűségét.

Egyes botanikusok azonban kétségüket fejezték ki a *Nymphaea lotus* var. *thermalis* harmadkori eredetével kapcsolatban. Borbás (1894) és Richter (1897) mindketten valószínűsítették a növény vízimadarak általi recens behurcolását, míg Tuzson (1908) a XVI-XVII. század alatti török megszállás során történt betelepítést tartja valószínűnek. Az egyetlen európai állomány autochton eredetét övező bizonytalanságok ellenére, azt napjainkban elfogadottan harmadkori reliktumként tartjuk számon (Pop, 1976), amely az európai flóra őshonos eleme (Jalas & Suominen, 1989; Tutin & Webb, 1992). A növény természetvédelmi fontosságát jól jelzi a terület bevonása a Natura 2000 programba (31A0 Erdélyi hőforrásos tündérrózsások) az ezen élőhelyen található egyedi élővilág megóvása céljából.

A molekuláris filogenetikai módszerek és a molekuláris óra hipotézis (Bromham & Penny, 2003) alkalmazása segíthet megválaszolni a botanika ezen régóta vitatott kérdését. A *Nymphaea* nemzetség filogenetikai viszonyai jól ismertek (Borsch és mtsai., 2007; Löhne és mtsai., 2008a), amely adatokra támaszkodva becsülhető a speciációs ráta. Löhne és mtsai. (2008a) munkája nyomán a nemzetség filogenetikai viszonyain túl leírták az egyes speciációs események becsült dátumait is. Elemzésükhöz Maximum Likelihood (ML) és bayesiánus statisztikát, valamint fosszília alapú kalibrációs pontokat használtak. Ezek közül az első a zárvatermők legközelebbi közös ősének kora (131,8 millió év). A *Nuphar wutuensis* fossziliái alapján a *Nymphaeaceae* korát 52 millió évvel ezelőtre tették és használták kalibrációs pontként. Elemzésük egy és két kalibrációs pont használata esetén is hasonló dátumokat valószínűsített.

Ha a speciációs ráta nagyjából egyenletes az alnemzetségben és a *N. lotus* var. *thermalis* európai jelenléte valóban harmadkori eredetű, jelentős genetikai távolságra számíthatunk az afrikai populációk és a püspökfürdői növény között. Közelmúltbeli betelepítés/betelepülés esetén kisebb genetikai távolságra számíthatunk az afrikai és európai populációk között, mint az őshonos (afrikai) elterjedési terület mintái között.

## 2.1.2. Anyag és módszer

### Mintázás és laboratóriumi munka

Terepi mintavételezésünk a *Nymphaea lotus* s.l. afrikai elterjedési területének négy, egymástól távol eső pontját, valamint az európai populációt reprezentálja (**1. táblázat**). A szövetmintákat 96%-os etanolban 4 °C-on vagy szilikagélben szobahőmérsékleten tároltuk. Az elemzett populációkból egy-egy egyedet genotipizáltunk a sejtmagi riboszomális ITS (nrITS) és a plasztisz genomban található *rpl32-trnL*, *psbM-trnD*, *trnT-trnL* lókuszokra. Megemlítendő a nyugat-afrikai populáció taxonómiai bizonytalasága, amit egyes szerzők különálló fajként írnak le (*Nymphaea zenkeri* Gilg) főként kisebb mérete és virágai alapján (Verdcourt, 1989). A *N. zenkeri* taxon elkülönítése habár nem széles körben elfogadott és a fajnév jelenleg a *Nymphaea lotus* szinonímájaként kezelt, Nyugat-Afrika területéről (főként Gabon és Kamerun) ismert több előfordulása (Verdcourt, 1989). Emiatt az Elefántcsontpartról származó mintákat provizórikusan *N. zenkeri*ként azonosítottuk és külön figyelmet fordítottunk a becsült izolációjának idejére. Az így előállított adatsorunkat kiegészítettük 12 közelrokon taxon (Löhne és mtsai. 2008a) GenBankból (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) elérhető szekvenciáival a molekuláris óra minél pontosabb kalibrációja érdekében.

**1. táblázat** A tanulmányhoz gyűjtött minták részletes adatai. A minta azonosító az analízisek során használt neveket jelenti.

<b>Taxon</b>	<b>Régió</b>	<b>Élőhely</b>	<b>Rövid név</b>
<i>Nymphaea lotus</i> var. <i>thermalis</i>	Európa	Románia: Pece-patak	thePet
<i>Nymphaea lotus</i> subsp. <i>lotus</i>	Észak-Afrika	Egyiptom: Nílus delta	lotEgy
<i>Nymphaea lotus</i> subsp. <i>lotus</i>	Kelet-Afrika	Etiópia: Ziwai-tó	lotZiw
<i>Nymphaea lotus</i> subsp. <i>lotus</i>	Dél-Afrika	Dél-Afrikai Köztársaság: Nylsvley Nemzeti Park	lotNyl
<i>Nymphaea lotus</i> ( <i>zenkeri</i> )	Nyugat-Afrika	Elefántcsontpart: Grand Bassam	zenBuss

A terepi mintákból a teljes genomi DNS-t Doyle & Doyle (1987) módosított CTAB módszerével izoláltuk. A mintákat folyékony nitrogén alatt homogenizáltuk, majd 800 µl 2% CTAB-t, 0,1 M Tris-HCl-t, 1,4 M NaCl-t és 0,02 M EDTA-t tartalmazó puffert adtunk hozzá. A mintákat egy óráig 65 °C-on inkubáltuk, majd kétszer 600 µl kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú elegyével tisztítottuk. A felülúszóban található DNS-t azonos térfogatnyi izopropanollal denaturáltuk. Erős centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk és kétszer 400 µl 70%-os etanollal tisztítottuk a pelleteket, majd azok szárítása után 1 mM Tris-HCl-t (pH=7,5) tartalmazó oldatban tároltuk a genomi DNS-t. A polimeráz lánreakciót (PCR) 25 µl-ben hajtottuk végre, amely a genomi DNS mellett 1× reakciópuffert (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA), 0,2 mM dNTP-t (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA), 25 mM MgCl<sub>2</sub>-t (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA), 0,25 mg marha szérumalbumint (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,2 µM PCR primert és 0,03 U Taq polimeráz enzimet (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) tartalmazott. Az nrITS PCR körülményei a következők voltak: kezdeti 3 perces denaturálás 94 °C-on, majd 35 ciklusban 30 másodperc denaturáció 94 °C-on, 30 másodperces primer hibridizáció 51 °C-on, 40 másodperces polimerizáció 72 °C-on és végső elongáció 7 percig 72 °C-on. Az amplifikációhoz az ITS1A és az ITS4) primereket használtuk (**2. táblázat**). A

plasztisz szakaszok amplifikálásához ún. ‘touchdown’ protokollt alkalmaztunk, amellyel növelhető a reakció specifitása (Korbie & Mattick, 2008). A kezdeti denaturáció 94 °C-on 3 percig, majd 20 ciklusban 30 másodperces denaturáció után 58 °C-ról indulva minden ciklusban 0,5 °C-al csökkentettük a primer bekötésének hőmérsékletét, majd a DNS polimerizációját 72 °C-on 50 másodpercig folytattuk. Ezután újabb 20 ciklusban megismételtük a bemutatott PCR ciklusokat, kivéve, hogy a primer bekötése minden ciklusban 48 °C-on történt. A végső elongáció ismét 72 °C-on történt 7 percig. A három lókuszhoz felhasznált primereket a **2. táblázat** tartalmazza. A sikeresen amplifikált PCR-termékeket kereskedelmi szolgáltatás segítségével (Macrogen, Inc.) szekvenáltuk. Az előállított szekvenciákat a MUSCLE v.3.8.31. (Edgar, 2004) szoftverrel illesztettük, azokat nyilvánossá tettük az NCBI nukleotid adatbázisában (**3. táblázat**).

**2. táblázat** A *Nymphaea lotus* filogeográfiai vizsgálata során használt oligonukleotid primerek és szekvenciáik.

**DNS**

<b>régió</b>	<b>Név</b>	<b>Szekvencia (5' - 3')</b>	<b>Forrás</b>
	ITS1A	GACGTCGCGAGAAGTCCA	Gulyás és mtsai., 2005
nrITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White és mtsai., 1990
<i>rpl32-trnL</i>	rpl32F	CAGTTCCAAAAAACGTA	Shaw és mtsai., 2007
	trnLR	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	
<i>psbM-trnD</i>	psbMF	AGCAATAAATGCRAGAATATTTACTTCCAT	Shaw és mtsai., 2005
	trnDR	GGGATTGTAGYTCAATTGGT	
<i>trnT-trnL</i>	TabA	CATTACAAATGCGATGCTCT	Taberlet és mtsai., 1991
	TabC	CGAAATCGGTAGACGCTACG	

## Adatelemzés

A *Lotos* alnemzetségen belüli speciációs ráta becslése érdekében először a közelrokon taxonok izolációjának idejét becsültük meg. Az elemzéshez azokat a fajokat választottuk ki, amelyek közös őse kevesebb, mint 25,4 (95% HPD = 11,1–39,7) millió évvel ezelőttre tehető (Löhne és mtsai., 2008a) (**3. táblázat**). Az azonos módszer használata miatt, a másodlagos datálásra irányuló elemzéseinkben a Löhne és mtsai. (2008a) által bayesiánus statisztikával megbecsült dátumát vettük figyelembe a közös elágazások kalibrációjához. Az első másodlagos kalibrációs pont a *Nymphaea* alnemzetség izolációját határozza meg és elemzésünkben a fa gyökerének dátumát jelöli (átlag = 25,4, szigma szórásparaméter = 7,3). Második kalibrációs pontként a *Lotos* és *Hydrocallis* alnemzetségek legközelebbi közös ősenek dátumát használtuk (Löhne és mtsai. 2008a). A két alnemzetség elválásának átlagát 11,3 millió évvel ezelőttre tettük, ebben az esetben a szórás (szigma) 4,65 volt. Mivel az általunk nem mintázott taxonokból az *rpl32-trnL* és a *psbM-trnD* szakaszok szekvenciái nem voltak elérhetőek, ez az elemzésünk az nrITS és a *trnT-trnL* szekvenciáin alapult. A filogenetikai törzsfát a \*BEAST v.2.5.0. (Bouckaert és mtsai., 2014) szoftverrel állítottuk elő, amely bayesiánus statisztikát használva képes az egyes izolációs események időpontját a több lókuszon alapuló fajfa rekonstrukciója alapján megbecsülni. A \*BEAST v.2.5.0. elemzést kétszer egymástól függetlenül futtattuk 500 millió generáció mintázásával. Az elemzés során nem korrelált molekuláris órát ('uncorrelated lognormal relaxed clock') és a speciáció Yule modelljét használtuk. Az adatsorra legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modell használatát a bmodeltest v.1.2.1 (Bouckaert & Drummond, 2017) alkalmazásával biztosítottuk. A két független futás konvergenciáját és a minimálisan elfogadható effektív mintanagyságát ('effective sample size', ESS) a Tracer v.1.7.-el (Rambaut és mtsai., 2018) ellenőriztük. Az elemzéseket csak 200-nál nagyobb ESS értékkel fogadtuk el. Mindkét futás első 10%-át figyelmen kívül hagytuk ('burn-in'), majd kombináltuk a LogCombiner v.2.5.0.-val (Bouckaert és mtsai., 2014). A

legvalószínűbb fa topológiáját a TreeAnnotator v.2.6.1-el (Bouckaert és mtai., 2019) határoztuk meg. Az így keletkezett poszterior filogramok alapján a BAMM v.2.5 és a BAMMtools v.2.1.7 programcsomagokkal (Rabosky, 2014) becsültük meg a speciációs rátát. A BAMM 10 millió mintát generált, a vizsgált leszármazási ág teljes fajokészlet mintázásának esélyét 60%-nak tekintettük ('global sampling probability'). A poszterior minták első 10%-át 'burn-in'-nek tekintettük, majd a BAMMtools v.2.1.7-el vizsgáltuk a speciációs ráta értékét és esetleges hirtelen változását.

A *Nymphaea lotus sensu lato*n belüli filogeográfiai mintázatokat haplotípus-hálózat rekonstrukció segítségével vizsgáltuk, amelyhez az nrITS-en kívül három plasztisz DNS régiót használtunk. Habár a sejtmagi és organelláris szakaszok együttes elemzése bizonyos esetekben félrevezető lehet (2.2 fejezet), ebben az esetben a felfedezhető teljes (additív) variabilitás elemzéséhez azokat összefűztük. Ebben az értelemben a minták közötti genetikai távolságot értelmeztük egy gyökértelen haplotípushálózaton, de evolúciós irányultságra vonatkozó konzekvenciákat nem vonhattunk le. Az összefűzött DNS szekvenciákat (2267 bp) a PEGAS v.0.14. (Paradis, 2010) R v.3.6. (R Core Team, 2017) csomaggal elemeztük.

**3. táblázat** A speciációs ráta számításánál felhasznált minták és NCBI GenBank azonosítószámaik.

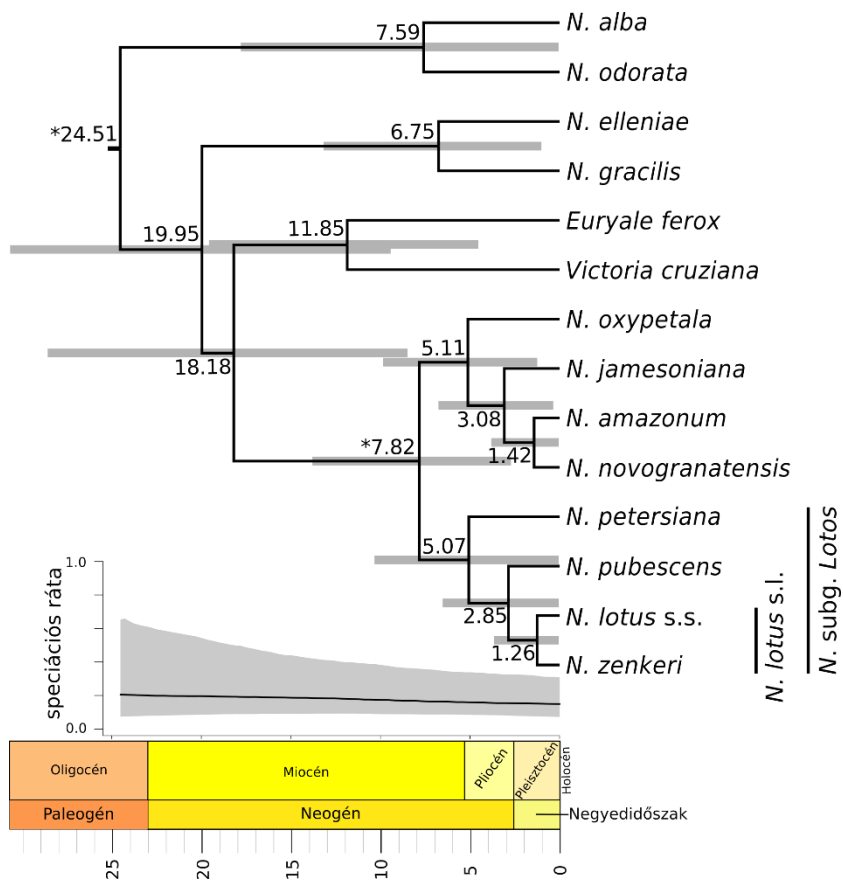
<b>Taxon</b>	<b>Azonosító nrITS</b>	<b><i>trnT-L</i></b>	<b><i>psbM-trnD</i></b>	<b><i>rpl32-trnL</i></b>	
<i>Nymphaea pubescens</i>	FJ597743*	AM422043 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea petersiana</i>	FM242156 <sup>□</sup>	AM422053 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea oxypetala</i>	FM242150 <sup>□</sup>	AM422035 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea jamesoniana</i>	FM242152 <sup>□</sup>	AM422033 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea gracilis</i>	FR717586 <sup>+</sup>	AM422050 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea alba</i>	HG518072 <sup>×</sup>	AM422067 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea elleniae</i>	FJ026562 <sup>ß</sup>	AM422057 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea odorata</i>	LN59003 <sup>§</sup>	AY771858 <sup>#</sup>	-	-	
<i>Euryale ferox</i>	FM242144 <sup>†</sup>	AM422020 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Victoria cruziana</i>	FM242157 <sup>†</sup>	AM422024 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea amazonum</i>	FM242149 <sup>†</sup>	AM422026 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea novogranatensis</i>	FM242154 <sup>†</sup>	AM422034 <sup>ä</sup>	-	-	
<i>Nymphaea lotus</i> var. <i>thermalis</i>	thePet	MK452744	MK452759	MK452749	MK452754
<i>Nymphaea lotus</i> subsp. <i>lotus</i>	lotEgy	MK452746	MK452761	MK452751	MK452756
<i>Nymphaea lotus</i> subsp. <i>lotus</i>	lotZiw	MK452745	MK452760	MK452750	MK452755
<i>Nymphaea lotus</i> subsp. <i>lotus</i>	lotNyl	MK452742	MK452757	MK452747	MK452752
<i>Nymphaea lotus</i> ( <i>zenkeri</i> )	zenBuss	MK452743	MK452758	MK452748	MK452753

\*Dkhar és mtsai (2010); <sup>□</sup>Borsch és mtsai (2008); <sup>+</sup>Borsch és mtsai (2011); <sup>×</sup>Borsch és mtsai. (2014); <sup>ß</sup>Löhne és mtsai. (2008b); <sup>§</sup>Borsch és mtsai (2014); <sup>†</sup>Borsch és mtsai. (2008); <sup>ä</sup>Borsch és mtsai. (2007); <sup>#</sup>Woods és mtsai. (2005)

### 2.1.3. Eredmények

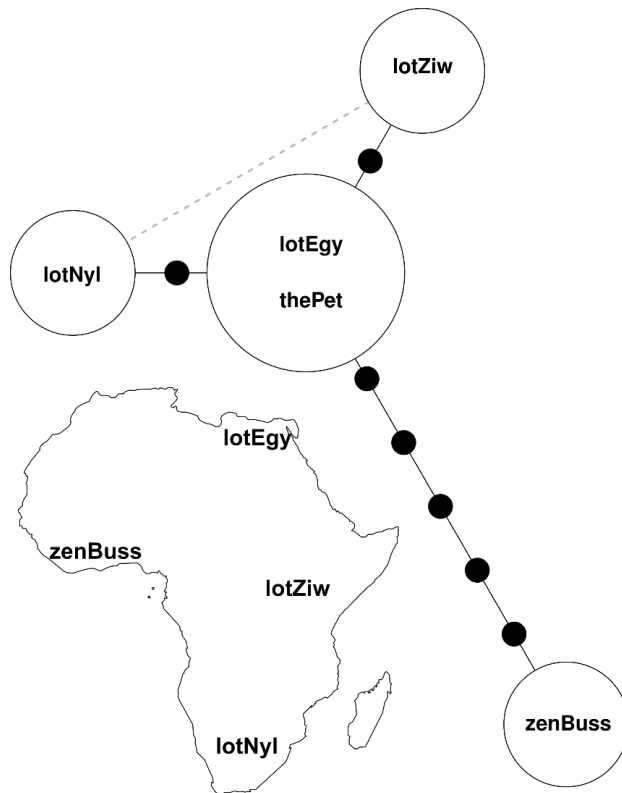
A teljes adatsor nrITS illesztése 755 nukleotid hosszúságúnak mutatkozott és 165 variábilis és 112 informatív pozíciót tartalmazott. Az 1534 bázispár hosszú *trnT-trnL* régióban 123 polimorf és 68 informatív pozíciót fedeztünk fel. Azonos régiók a *Nymphaea lotus*on belül három, illetve két polimorf, de nem informatív helyet tartalmaztak, valamint a haplotípushálózat rekonstrukciónál felhasznált *psbM-trnD* és *rpl32-trnL* intergénikus szakaszokon egy-egy egyedi mutációt fedeztünk fel.

A fő leszármazási ágak becsült izolációjának ideje (**1. ábra**) jól illeszkedik Löhne és mtsai. (2008a) eredményeihez. A *Lotos* alnemzetség 5,07 (95% HPD: 0–10,32) millió évvel ezelőtt válhatott el, míg a *Nymphaea pubescens* és *Nymphaea lotus* elválása 2,85 millió évvel ezelőttre tehető (95% HPD: 0–6,49), amely megfeleltethető a késői pliocén korszaknak. A *N. lotus* és *N. zenkeri* elválása a pleisztocén közepén történhetett meg (1,26 millió év, 95% HPD: 0-3,62). A BAMM v.2.5 eredményei szerint a speciációs ráta nagyjából konstansnak tekinthető, a speciáció sebességében hirtelen változást nem detektáltunk (**1. ábra**). A teljes kronogram speciációs rátája 0,17-0,26 faj / millió év között változott. Ugyanezen ráta a *Lotos* alnemzetségen belül 0,17-0,18 faj / millió évre tehető.



**1. ábra** A *Nymphaea Lotos* alnemzetség és közelrokon taxonjainak datált filogramja. Az izoláció ideje millió években van feltüntetve, a 95%-os poszterior denzitás intervallumot (95% HPD) szürke sáv jelöli. A kalibrációs pontok csillaggal vannak jelölve. A speciációs ráta (fekete vonal) és 95%-os poszterior denzitás intervallum (szürke terület) a filogram alatt van feltüntetve. Az ábra alján lévő skála millió években értendő.

A *Nymphaea lotus* populációk általánosságban kis genetikai távolságra voltak találhatóak egymástól (**2. ábra**), kivéve a püspökfürdői és az egyiptomi növényeket (thePus és lotEgy). Ezek haplotípusa minden vizsgált genetikai régióon megegyezett az egyiptomi minta szekvenciáival. A kelet- és dél-afrikai mintákat (lotZiw és lotNyl) egy-egy hipotetikus haplotípus választja az előbbi csoporttól. A legjelentősebb genetikai távolságra a nyugat-afrikai minta található, amelyet kulcsoportnak tekintettünk ebben az elemzésben (zenBuss).



**2. ábra** A *Nymphaea lotus* s.l. filogeográfiai struktúrája. Az üres körök különböző haplotípusokat jelölnek, míg a fekete pontok hipotetikus (nem mintázott) haplotípusok. A fehér körök mérete arányos a haplotípus gyakoriságával. A szürke szaggatott vonal egy alternatív útvonalat jelöl a hálózatban. A térkép az afrikai minták földrajzi helyét mutatja be. A mintanevek a **2. táblázat** azonosítóit jelölik.

#### 2.1.4. Diszkusszió

A *Nymphaea lotus* var. *thermalis* harmadkori reliktum státuszát filogenetikai és filogeográfiai eredményeink tekintetében értékeltük újra. A harmadkori reliktum státusz feltételezi, hogy a püspökfürdői populáció és az afrikai növények legközelebbi közös őse körülbelül kétmillió évvel ezelőtt létezett. A detektált közel állandó speciációs ráta függvényében ez jelentős genetikai távolságot feltételez az afrikai törzsalak és *N. lotus* var. *thermalis* között, körülbelül akkorát, mint a *N. lotus* és *N. pubescens* fajpárok esetében, amelyek izolációja becsléseink alapján körülbelül 2,75 millió évvel ezelőtt következett be. Habár a speciációs ráta a dolgozatban bemutatott módja vita tárgyát képezi (Moore és mtsai., 2016; Rabosky és mtsai., 2017), a végső konklúzió abban az esetben is értelmezhető, ha az esetleges alulmintázottság vagy a használt markerek viszonylagosan kis felbontása miatt nem tudtuk detektálni a speciációs ráta változásait. Ennek oka, hogy a legjelentősebb genetikai távolságot a nyugat-afrikai *Nymphaea zenkeri* és a fennmaradó *N. lotus* populációk között fedeztük fel, amelyek legközelebbi közös őse körülbelül 1,26 millió évvel ezelőtt létezhetett és izolációja eredményeink alapján megelőzi a *Nymphaea lotus* var. *thermalis* elválását. Az afrikai populációk filogeográfiai mintázata látszólag a Hewitt (2004b) által bemutatott fő refúgiumokból eredő leszármazási ágakkal lehet összefüggésben, aki több szerző munkája nyomán összegezte a kontinens filogeográfiai mintázatát. A nyugat-afrikai populációk több esetben jelentős genetikai távolságra voltak találhatóak a kelet- és dél-afrikai kládoktól. Habár jelen dolgozatban nem vizsgálható egyértelműen a nyugat-afrikai populáció taxonómiai helyzete a kis mintaszám és a markerek viszonylag kis felbontása miatt, ez az elválás ellentmondhat Verdcourt (1989) taxonómiai véleményének, aki a *Nymphaea zenkeri* egy fiatal *Nymphaea lotus*-szal azonosította és további vizsgálatokra adhat okot.

Meglepő módon, a püspökfürdői populáció mind az öt, gyorsan evolválódó DNS régiójának haplotípusa megegyezett a Nílus-deltából

származó mintáival (összesen 2267 bp). Összehasonlításképp, a *Nymphaea lotus* és *Nymphaea pubescens* nrITS szekvenciáiban 645 bázispáron 27 polimorf helyet fedeztünk fel (lotEgy és GenBank: FJ597743), valamint a *trnT-trnL* szakaszon 1504 bp hosszú szakaszon kettőt (lotEgy és GenBank: AM422043).

Eredményeink összhangban állnak Smoleń és Falniowski (2009) molekuláris filogenetika eredményeivel is, akik a püspökfürdői élőhelyen szintén előforduló, terciér reliktnak vélt maradványcsigát (*Melanopsis parreyssii*) vizsgálták. Tanulmányuk a faj legközelebbi rokonát a közép-európai meleg vízű forrásokban előforduló folyamcsigával (*Fagotia acicularis* Férussac) azonosította. Míg a *M. parreyssii* és *F. acicularis* izolációja a negyedidőszak kezdetére tehető, a *Melanopsis costata* Olivier jóval régebbi izolációja a morfológia konvergenes evolúciójára utal. Továbbá, paleontológiai bizonyítékok azt mutatják, hogy a *M. parreyssii* héjmorfológiája átalakulást mutat geológiai időskálán, így a bordázott csigaház tekinthető a meleg vízhez való alkalmazkodás eredményének (Sümegei és mtsai., 2012a). Ezenkívül, Sümegei és mtsai. (2012b) paleoökológiai rekonstrukciója alapján a terület mérsékelt-övi refúgium lehetett, mintsem szubtrópusi jellegű és a *M. parreyssii* és *F. acicularis* maradványaival rendelkező rétegek a késő negyedidőszaki rétegekben lelhetőek fel.

A fentiek fényében a *Nymphaea lotus* var. *thermalis* harmadkori eredetének hipotézise cáfolható. Habár a molekuláris filogenetikai eredményeink a populáció közelmúltbeli eredetére utalnak, a megtelepedés pontos ideje jelen adatok alapján nem határozható meg. A Negrean (2011) által idézett középkori dokumentumok szerint a tavat mesterségesen hozták létre a XIV. században, ami feltételezi a faj új keletű betelepítését. Egy lehetséges magyarázat lehet a Tuzson (1908) által említett törökök általi betelepítés a török hódoltság ideje alatt, amikor az Oszmán Birodalom Észak-Afrikától Közép-Európáig terjedt ki. Mivel az Oszmán Birodalom híres volt fürdőiről és

kertészetéről, joggal feltételezhetjük, hogy a *Nymphaea lotus* dísznövényként telepítettek Európába. Az elmélet értelmében azonban kérdéses, miért nem találhatjuk meg más, a volt Oszmán Birodalom területére eső termálvizekben a növényt, ide értve a Balkán-félszigetet és Kis-Ázsiát. Elképzelhető a vízimadarak útján történt betelepülés epizoochór és endozoochór módon is. Habár a vadrécék és vadludak jelentős szerepet játszhatnak vízinövények propagulumainak terjesztésében (Clausen és mtsai., 2002), közvetlen bizonyíték a *Nymphaea* ilyen módú terjesztésére nem áll rendelkezésre (Green és mtsai., 2002). A *Nymphaea lotus* Afrikában potenciális invazív fajként van számon tartva, ahol a rizsföldeken rendkívül gyorsan képes terjedni és képes túlélni a rövid ideig tartó vízhiányt is (Khedr és mtsai., 1998). A faj potenciális invazív jellege valószínűleg hozzájárult európai megtelepedéséhez, azonban valószínűleg a növény számára szuboptimális klimatikus viszonyok miatt nem terjedt el nagyobb léptékben. Habár eredményeink egyértelműen közelmúltbeli betelepülésre utalnak, előfordulhat, hogy soha nem találunk egyértelmű magyarzatot az *N. lotus* jelenlétére a Nagyvárad melletti termálforrásban. Bármilyen legyen a populáció pontos eredete, a *Nymphaea lotus* var. *thermalisra* továbbra is tekinthetünk „kultúrreliktumként” egyedi előfordulása miatt. Mint ritka és endemikus változat, védettsége a Natura 2000 programban (31A0 Erdélyi hőforrásos tündérrózsások) továbbra is megalapozott.

## 2.2. Molekuláris filogenetikai bizonyítékok a *Hepatica transsilvanica* harmadkori, allotetraploid eredetére

### 2.2.1. Irodalmi előzmények

A *Hepatica* nemzetség hagyományosan az Anemoninae (Ranunculaceae) egy kis nemzetségeként ismert, amely az alkalmazott taxonómiai koncepciótól függően hét-kilenc fajt foglal magába (Tamura, 1993; Weiss és mtsai., 2002). A nemzetség taxonómiai rangja vitatott; Hoot és mtsai. (2012) a *Hepatica*-t egyesítette az *Anemone*-val, míg Jiang és mtsai. (2017) bizonyította, hogy az *Anemone* s.l. (*sensu lato*, tág taxonómiai értelemben) parafiletikus csoport és különválasztotta a *Hepaticat* az *Anemonidium*, *Keiskea* és *Omalocarpus* nemzetségekkel együtt, amelyet Liu és mtsai. (2018) eredményei is megerősítettek. A *Hepatica* nemzetség részleges reprezentációja a *Pulsatilla* nemzetség rokonságát feltáró filogenetikai elemzésben (Sramkó és mtsai. 2019a) a *Hepatica* és *Pulsatilla* legközelebbi közös őst körülbelül 21,5 millió évvel ezelőttre datálta. Tamura (1993) morfológiai elemzésének és a recens filogenetikai eredmények értelmében - amelyek régmúlt beli elválást valószínűsítenek a *Hepatica* és az *Omalocarpus* + *Anemonidium* + *Keiskea* között - a szűk értelemben vett *Hepaticat* (az egyéb felsorolt csoportok nélkül) különálló nemzetséggént kezeltük.

A *Hepatica*-n belül két *sectio* ismert: a főként diploid ( $2n = 14$ ), három részre tagolt, karéjos levelű *Hepatica* és a túlnyomórészt poliploid ( $2n = 28$ ), jóval tagoltabb levelű *Angulosa* (Zonneveld, 2010). A nemzetségre jellemző, hogy inter- és intrakontinentális diszjunkt elterjedést mutat és a legtöbb fajt Északkelet-Ázsiában figyelhetjük meg (Pfosser és mtsai., 2011). Az *Angulosa* fajcsoport tagjai Közép- és Nyugat-Kínában (*Hepatica henryi* Nakai és *Hepatica yamatutai* Steward), Közép-Ázsiában (*Hepatica falconeri* Thomson) és Közép-Európában (*Hepatica transsilvanica* Fuss) fordulnak elő. A *H.*

*transsilvanica* elterjedési területe a Délkelet-Kárpátokra, valamint a Küküllői-dombvidékre korlátozódik (Kliment és mtsai., 2016; Kovács, 2019), míg a nemzetség másik Európában előforduló, *Hepatica sectio*hoz tartozó faja, a *Hepatica nobilis* Schreb. jóval szélesebb elterjedésű, Európa nagy részén megtalálható (**3. ábra**). A *Hepatica sectio* további fajai Kelet-Ázsiában és Észak-Amerikában őshonosak.

Az *Angulosa sectio*ba sorolható fajok közül egyedül a *Hepatica falconeri* rendelkezik diploid kromoszómaszereléssel. A csoport egyéb tagjainak allopoliploid hibrid eredetét Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) és Zonneveld (2010) egybehangzóan bizonyították. E fajok földrajzi elhelyezkedése, valamint egyedi citotípusaik és additív genomméretük alapján a *Hepatica transsilvanica* legvalószínűbb szülőfajai a *Hepatica nobilis* és a *H. falconeri* lehettek (Weiss-Schneeweiss és mtsai., 2007; Zonneveld, 2010). Bartha és mtsai. (2014) a faj eredetét a sejtmagi genomban található additív polimorf helyek (additive polymorphic site - APS) alapján vizsgálta. Az *At103* gén szekvenciáiban felfedeztek olyan polimorf pozíciókat, ahol mindkét valószínűsített szülőre jellemző nukleotid egyformán megtalálható. Eredményeik megerősítették a korábbi szerzők megfigyeléseit a *H. transsilvanica* legvalószínűbb szülőfajaival kapcsolatban.

Habár a *Hepatica transsilvanica* izolációjának időpontja segíthet feltárni a Délkelet-Kárpátok biogeográfiai jelentőségét egyes endemikus leszármazási ágak hosszú távú megőrzésében, ez a dátum nem ismert. Az *Angulosa sectio* a harmadkori reliktum *Syringa josikaea* (Lendvay és mtsai., 2016) és közelrokonai elterjedési mintázatához rendkívül hasonló, diszjunkt elterjedést mutat, ami felveti az egyes taxonok viszonylag régi izolációjának lehetőségét. A *Hepatica transsilvanica* hosszú távú európai túlélésére bizonyítékot szolgáltathat a modern filogenetikai módszerek alkalmazása. Tanulmányunk során molekuláris filogenetikai megközelítést alkalmazva vizsgáltuk a *H. transsilvanica* eredetét, két sejtmagi és két organelláris (plasztisz) lókuszt elemzésével. A fajok filogenetikai viszonyain túl figyelembe vettük az egyes

génfák alapján becsült koaleszcenciaidőt is a *H. transsilvanica* eredetének megítélése érdekében. A molekuláris óra kalibrálásához, fosszilis leletek hiányában, itt is másodlagos datálást alkalmaztunk és más, datált filogenetikai elemzésekkel közös elágazásokat keresve határoztuk meg a kalibrációs pontokat. A Ranunculaceae eddigi legátfogóbb filogenetikai elemzése (Wang és mtsai. 2016) három fosszilis kalibrációs ponton és bayesiánus statisztikán alapul. Wang és mtsai. (2016) a Ranunculaceae és Berberidaceae legközelebbi közös őst a *Leefructus mirus* fosszília alapján 122,6 millió évesre valószínűsítették. A *Paleoactaea nagelii* korát, amely az *Actaea* és *Eranthis* közös őseinek feleltethető meg, 56 millió évvel ezelőttre tették. A *Myosurus* nemzetség korát legkorábbi maradványai alapján legalább 23,03 millió évvel ezelőttre datálták. Elemzéseinkben a kulcsoport bevonása nem csak a filogenetikai törzsfá polarizációját szolgálja, hanem a *Hepatica* és az Anemoneae tribusz fennmaradó fajainak közös őse másodlagos kalibrációs pontként szolgál a datáláshoz, amely közös elágazás a Wang és mtsai. (2016) által bemutatott filogenetikai törzsfával. Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) munkája alapján a *Hepatica*-n belüli speciációs események viszonylag fiatalok, jó részük körülbelül három millió évvel ezelőttre, a pliocén idejére datálható. Elemzésük azonban általános mutációs rátán és egy geológiai (külső) kalibrációs ponton alapult, ezért - a szerzők által elismerten - az izolációs események ideje óvatosan értelmezendő (ld. Diskusszió), így azt nagyobb hibahatárral vettük figyelembe. Az egyes gének koaleszcenciaideje eltérő molekuláris evolúciójuk miatt különböző lehet, ami nem feltétlenül esik a fajok elválásának idejével, de ezek együttes értelmezése segíthet felderíteni a hibrid speciáció időbeli aspektusát.

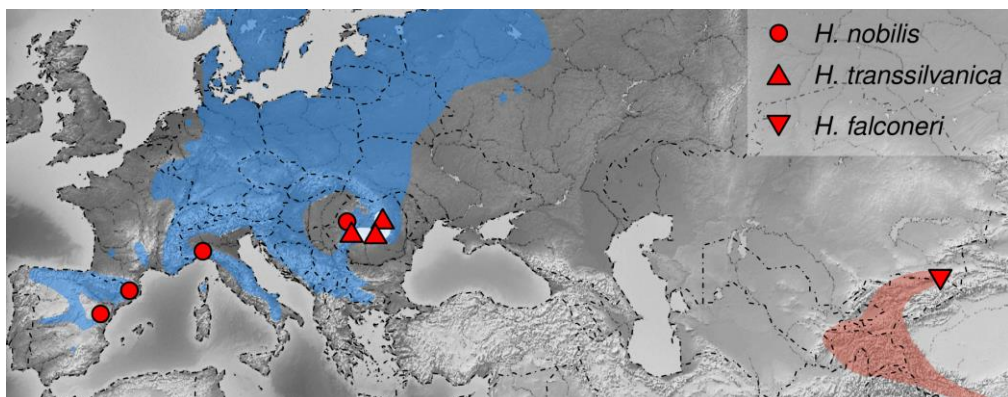
Hipotézisünk értelmében, ha az egyes lókuszok alapján rekonstruált filogenetikai kapcsolatok ellentmondanak egymásnak, a faj allopoliploid eredetét valószínűsíthetjük, amely esetben azonosíthatóak a szülőfajok (Wendel & Doyle, 1998). A *H. transsilvanica* autopoliploid eredete esetében - mivel a poliploid allélok ugyanazon fajból származnak - arra számítottunk, hogy a génfák ugyanazon pozícióba, a legközelebbi fennmaradt testvérfaj

mellé helyezik a *H. transsilvanicat*. Az izoláció időpontja mindkét esetben hozzájárulhat a Kárpátok biogeográfiai relevanciájának feltárásához és rávilágíthat a földrajzi régió szerepére a genetikai változatosság megőrzésében.

## 2.2.2. Anyag és módszer

### Mintázás és laboratóriumi munka

Terepi mintázásunk a *Hepatica transsilvanica* elterjedési területére és két legvalószínűbb szülőfajára (Weiss-Schneeweiss és mtsai., 2007; Bartha és mtsai., 2014), a *Hepatica nobilis*-re és *Hepatica falconeri*-re összpontosított (**4. táblázat, 3. ábra**). Minden populáció egy-egy egyedét elemeztük, kivéve a *H. falconeri* esetében, amely faj egy populációjából két mintát vontunk be a nukleáris DNS régiók elemzésébe. A mintákat szilikagélben tartósítottuk és szobahőmérsékleten tároltuk (15-25 °C) a DNS kivonás előtt. Az ázsiai taxonokat egyes elemzésekben a *Hepatica asiatica* Nakai és *Hepatica henryi* (Oliv.) Steward GenBanken elérhető szekvenciái alapján reprezentáltuk (**4. táblázat**). Külcsoportként az *Anemone multifida* Poir. és az *Anemone sylvestris* L. fajokat vontuk be.



**3. ábra** A *Hepatica transsilvanica* eredetének vizsgálata során használt minták. Az egyes fajok elterjedési területe Meusel és mtsai. (1965) alapján van feltüntetve. A kék szín a *Hepatica nobilis*, a fehér szín a *Hepatica transsilvanica* és a bordó szín a *Hepatica falconeri* elterjedési területét jelzi.

**4. táblázat.** A *Hepatica transsilvanica* eredetének vizsgálata során felhasznált minták és részletes adataik.

Faj	Minta azonosító	Élıhely	mITS	MLH1	accD-psaI	trnL intron	trnL-trnF
<i>Hepatica nobilis</i>	1	RO: Bihar, Diófás	MKS550972 <sup>□</sup>	MT276401	MKS51080 <sup>□</sup>	MKS64172 <sup>□</sup>	MT276421
	2	ES: Barcelona, Alps	MT276393	MT276400	MT276408	MT276414	MT276420
	3	IT: Genova, Vobbia	MT276394	MT276402	MT276409	MT276415	MT276422
	4	ES: Teruel, Pitarque	MT276395	MT276403	MT276410	MT276416	MT276423
<i>Hepatica transsilvanica</i>	1	RO: Harghita, Csikszépvíz	MKS550971 <sup>□</sup>	MKS64173 <sup>□</sup>	MT276413	MKS64171 <sup>□</sup>	MT276426
	2	RO: Vajdahunyad, Hárszeg	MT276399	MT276407	-	MT276419	MT276427
<i>Hepatica falconeri</i>	3	RO: Brassó, Királykő	MT276398	MT276406	MT276412	MT276418	MT276425
	1	KZ: Raimbek, Saty	MT276396	MT276404	MT276411	MT276417	MT276424
	2		MT276397	MT276405	-	-	-
<i>Hepatica asiatica</i>		-	FJ597993*	-	-	-	-
<i>Hepatica henryi</i>		-	AM267290 <sup>+</sup>	-	-	-	-
<i>Anemone multifida</i>		DE: Chemnitz (Botanikus kert)	MKS551023 <sup>□</sup>	MKS64174 <sup>□</sup>	MKS550918 <sup>□</sup>	MKS551026 <sup>□</sup>	-
<i>Anemone sylvestris</i>		HU: Budapest, Sváb-hegy	MKS551024 <sup>□</sup>	MKS64175 <sup>□</sup>	MKS550919 <sup>□</sup>	MKS551027 <sup>□</sup>	-

\*Kim és mtsai. (2009); <sup>+</sup>Pfösser és mtsai (2011); <sup>□</sup>Sramkó és mtsai. (2019a)

Az nrITS régiót széles körben alkalmazzák növényi filogenetikai kutatásokban (Baldwin és mtsai., 1995) és a hibridizáció, valamint poliploid speciáció vizsgálatára alkalmas szakaszként tartják számon (Wendel, 2000). Az nrITS elemzésénél azonban fontos figyelembe venni, hogy mivel akár több száz kópiát találhatunk belőle a sejtmagi genomban, az összehangolt evolúció ('concerted evolution') idővel homogenizálja az egyes kópiákat (Álvarez & Wendel, 2003; Bailey és mtsai., 2003).

Mivel az összehangolt evolúció torzíthatja a filogenetikai szignált és nem bizonyosodhatunk meg teljességéről (Álvarez & Wendel, 2003, Feliner & Rosselló, 2017), feltételezett ősi poliploidizáció esetén az nrITS kiegészítendő más, lehetőleg kis kópiaszámú sejtmagi markerekkel, amelyek kevésbé érzékenyek az összehangolt evolúcióra (Sang, 2002). A MutL1 homológ gén (*MLH1*), amely egy DNS hibajavító enzimet kódol, dokumentáltan egy kópiában fordul elő számos zárwatermő sejtmagi genomjában (Zhang és mtsai., 2012). A *Pulsatilla* nemzetség filogenetikai vizsgálata során (Sramkó és mtsai., 2019a) bebizonyosodott, hogy alkalmas a leszármazási viszonyok feltárására ebben a rokon nemzetségben, így ezt a nukleáris régiót használtuk az nrITS mellett a *Hepatica transsilvanica* eredetének rekonstrukciójára.

Az anyai leszármazási vonal azonosításához a szakirodalomban gyakran használt plasztisz intergénikus szakaszokat és intronokat vizsgáltunk. A célcsoport egy-egy egyedének vizsgálatával ('H. nobilis 4', 'H. transsilvanica 2', 'H. falconeri 1') polimorf helyeket kerestünk a *trnL-trnF* nem kódoló intergénikus szakaszon beleértve a *trnL<sup>UAA</sup>* intront, valamint a *trnH-psbA*, *petA-psbJ*, *psbM-trnD* és *accD-psaI* régiókban. Az előzetes eredmények után a *trnL-trnF* és az *accD-psaI* szakaszok szekvenciáit elemeztük a teljes adatsoron, mivel a többi említett régió nem tartalmazott polimorf pozíciókat.

A genomi DNS-t az E.Z.N.A. Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) használatával izoláltuk a gyártó utasításait követve. A PCR-eket az előzőekben bemutatott módon hajtottuk végre az nrITS és a

plasztisz lókuszek esetében, amelyhez a primer információkat az **5. táblázat** tartalmazza. Az *MLH1* esetében a Phusion, úgynevezett 'proofreading' polimeráz enzimet használtuk a nagyobb pontosság érdekében. Ez a reakció 1× Phusion High Fidelity Hot Start II reakciópuffert (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA), 0,2 mM dNTP-t (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA), 25 mM MgCl<sub>2</sub>-t (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,25 mg szarvasmarha-szérumalbumint (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,2 μM primert és 0,03 U Phusion High Fidelity Hot Start II DNS-polimeráz enzimet (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) és 25 ng DNS templátot tartalmazott. A reakció körülményei megegyeztek a korábban nrITS-nél használtakkal, kivéve, hogy a primer bekötési hőmérséklete 57 °C-ra és a denaturáció hőmérséklete 98 °C-ra volt állítva. A sikeresen amplifikált PCR-termékeket kereskedelmi szolgáltatás segítségével (Macrogen, Inc., Szöul, Dél-Korea) szekvenáltuk. Az előállított szekvenciákat nyilvánossá tettük az NCBI nukleotid adatbázisában (**4. táblázat**).

**5. táblázat** A *Hepatica transsilvanica* eredetének vizsgálatánál felhasznált PCR primerek.

DNS régió	Név	Szekvencia (5' – 3')	Forrás
nrITS	ITS1A	GACGTCGGGAGAAGTCCA	Gulyás és mtsai., 2005
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White és mtsai., 1990
MLH1	MLH_520f <sup>w</sup>	TTAGAGGAGAAGCAITGGC	Sramkó és mtsai., 2019
	MLH_900 <sup>tv</sup>	GTCCTTCCTCCGAGCCCGTC	Sramkó és mtsai., 2019
<i>trnH-psbA</i>	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang és mtsai., 1997
	trnHR	CGCGCATGGTGGATTCAACAATC	Sang és mtsai., 1997
<i>psbM-trnD</i>	psbMF	AGCAATAAATGCRAGAATATTTACTTCCAT	Shaw és mtsai., 2005
	trnDR	GGGATTGTAGYTCAATTGGT	Shaw és mtsai., 2005
<i>trnL intron</i>	TabC	CGAAATCGGTAGACCGCTACG	Taberlet és mtsai., 1991
	TabD	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet és mtsai., 1991
	TabE	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet és mtsai., 1991
<i>trnL-trnF</i>	TabF	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet és mtsai., 1991
	petA	AACARTTYGARAAGGTTCAATT	Shaw és mtsai., 2007
petA-psbJ	psbJ	ATAGGTACTGTARCYGGTATT	Shaw és mtsai., 2007
	accD_769F	GGAAAGTTTGAGCTTTATGCCAAATG	Small és mtsai., 1998
accD-psal	psal_75R	AGAAAGCCATTGCCAATTGCCGGAAA	Small és mtsai., 1998

## Adatelemzés

Mivel valószínűsíthető a célfajunk hibrid eredete, a nyers szekvenciákban nem csak egyértelmű szekvenálási hibákat kerestünk, de kiemelt hangsúlyt fordítottunk az additív polimorf helyekre is a nukleáris markerekben. A szekvenciákat a MUSCLE v.3.8.31-el (Edgar, 2004) illesztettük, majd a sejtmagi szekvenciák legvalószínűbb haplotípusait a PHASE v.2.1.1 (Stephens, 2001; Stephens & Scheet, 2005) alkalmazásával állapítottuk meg, amely bementi és kimeneti formátumát a SeqPHASE webserveren (<https://eeg-ebc.github.io/SeqPHASE/>, Flot, 2010) alakítottuk át. A PHASE v.2.1.1 bayesiánus statisztikát használ a legvalószínűbb haplotípusok becslésére. Az elemzést három független ismétléssel futtattuk alapértelmezett paraméterekkel, kivéve az ismétlések között eltérő random seedeket (-S paraméter) és ismétlésenként öt futásból (-x 5) a legvalószínűbbet vettük figyelembe, valamint minden futásnál 10000 iterációt vettünk alapul (-X 100). Minden olyan esetben, ahol dupla csúcsot figyeltünk meg, két különböző haplotípus volt azonosítható az egyedeken belül, amelyeket a későbbiekben 'a' és 'b' jelöléssel különböztettük meg. Az nrITS és *MLH1* esetleges rekombinációs eseményeit PHI teszttel ('Pairwise Homoplasy Index' - Bruen és mtsai., 2006) derítettük fel a SplitsTree v.4.14.4 (Huson & Bryant, 2006) programban. A SplitsTree v.4.14.4 segítségével a sejtmagi szakaszok alapján rekonstruáltuk a minták 'NeighborNet' hálózatát. A NeighborNet olyan filogenetikai hálózat, amely nem kényszeríti dichotómiába az egyes elágazásokat és felderíthetőek vele az egyes retikulációs események (Bryant & Moulton, 2004). Mivel a retikuláció és a filogenetikai bizonytalanság hasonló képet mutathat, a feltételezett retikulációs események vizsgálata ajánlott egyéb módszerekkel is (Bryant & Moulton, 2004). A SplitsTree v.4.14.4 elemzéshez az 'uncorrected p' genetikai távolságot használtuk, ami a szekvenciaillesztés eltérő pozíciónak aránya alapján számítja a páronkénti genetikai távolságot.

A vizsgált genetikai régiók molekuláris evolúciója nagyban eltérő lehet, hibrid speciáció esetében azok összefűzése és egyidejű elemzése a

feltételezhető retikuláció miatt nem célszerű. A különböző eredetű lókuszokon felfedezhető ellentmondásos szignál eredményezheti a rekonstruált filogenetikai törzsfá felbontásának hiányát. A filogenetikai kapcsolatok pontosabb értelmezése érdekében az egyes génfák alapján külön vizsgáltuk a filogenetikai mintázatokat és a fellépő topológiai konfliktust értelmeztük a hibrid speciáció függvényében. Ez alól a plasztisz szekvenciák képeztek kivételt, amelyek szorosan kapcsolatosan öröklődnek és egy egységként evolválódnak (Mogensen, 1996), így a *trnL-trnF* és az *accD-psaI* lókuszokat egy egységként kezeltük a továbbiakban (plasztisz adatsor).

A célfajok közötti filogenetikai viszonyt 'Maximum Likelihood' (ML) és bayesiánus statisztikai alapokon rekonstruáltuk. A ML elemzéshez a PhyML 3.0 (Guindon és mtsai., 2010) webszervert (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml-sms/>) használtuk, amely képes a legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modell automatikus kiválasztására ('Smart Model Selection' – SMS v.1.8.4) (Lefort és mtsai., 2017). Az elágazások támogatottságát a nem parametrikus Shimodaira-Hasegawa teszt (SH-aLRT) és bootstrap (bs) módszer mellett a parametrikus aBayes módszerrel is megbecsültük. Habár a nem parametrikus tesztek konzervatívabbak, robosztusabbak lehetnek (különösen az aLRT), ha nem teljesül a ML minden előzetes feltétele (Anisimova és mtsai., 2011). A bootstrap támogatottsági értékeket 1000 ismétlés után állapítottuk meg. Csak azokat az ágakat értelmeztük, amelyeket legalább két statisztikai módszer alapján támogatottak voltak (SH-aLRT vagy aBayes > 0,95% és bs > 70% = 700 ismétlés).

Az egyes génfák koaleszcenciaidejét a BEAST v.2.6.1 segítségével becsültük meg (Bouckaert és mtsai., 2019) külön az nrITS, *MLH1* és plasztisz adatsorokra vonatkozóan. A molekuláris óra állandóságának valószínűségét ('strict clock') úgynevezett 'nested sampling' (NS) módszerrel (Russel és mtsai., 2018) teszteltük a korrelálatlan molekuláris óra ('uncorrelated relaxed clock') valószínűsége ellenében. A módszer nagy statisztikai erővel képes megbecsülni az optimális paramétereket Bayes faktorok (BF) összehasonlítása

segítségével. A NS 10 aktív mintázási pontot használt a poszterior eloszlás felderítésére. Egy újabb aktív pont létrehozása legalább 10 millió generációt igényelt, a maximális generációk száma 100 millió volt. Az optimális szubsztitúciós modell használatát a BEAST v.2.6.1 automatikus modellszelekciójával (bmodeltest v.1.2.1, Bouckaert & Drummond, 2017) biztosítottuk az összes analízisben. A bayes faktort a logaritmikusan transzformált valószínűségi értékek különbségéből számítottuk és 0 - 0,5 közötti BF esetén nem támogatottnak, 0,5 - 1,3 között támogatottnak, 1,3 - 2,2 között erősen támogatottnak, efelett pedig feltétlenül támogatottnak fogadtuk el a magasabb valószínűségű modell alkalmazását.

A másodlagos datáláshoz Wang és mtsai. (2016) eredményei alapján a filogram gyökerére normál eloszlású priort helyeztünk, amelynek átlaga 27,6 millió év volt (szigma szórásparaméter = 1,4). Ez az időpont és a *Hepatica* és az Anemoneae tribusz fennmaradó fajaink legközelebbi közös ősenek feleltethető meg (Wang és mtsai., 2016). A Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) által bemutatott becsléseket a leírtaknál nagyobb hibahatárral alkalmaztuk és a *Hepatica* nemzetség közös őst 10,4 millió évvel ezelőtől a jelenig valószínűsítettük egy normál eloszlású prior paraméter segítségével (átlag = 3,0, szigma = 4,0). A ML által rekonstruált törzsfákat kiindulási topológiaként használtuk, de az ott feltárt viszonyok fixálása nélkül. A BEAST v.2.6.1-et kétszer futtatuk 500 millió generáción át, amelyből minden ötvenezrediket vettünk figyelembe. A plasztisz régiókra külön szubsztitúciós modellt valószínűsítettünk, de a két régió molekuláris órájának sebességét és a törzsfa topológiáját kapcsoltan becsültük. A BEAST v.2.6.1 elemzéseket két független futás után a korábban bemutatott módon értékeltük, azonban a módszer előnyeit kihasználva ebben az esetben vizsgáltuk a törzsfatopológiák 95%-os denzitás intervallumát is (95% HPD). Ehhez a TreeLogAnalyser v.1.10.4 (Suchard és mtsai., 2018) szoftvert használtuk, amely a különböző, de hasonlóan valószínű törzsfatopológiákat hivatott bemutatni. Tesztelendő, hogy az *MLH1* adatsorban felfedezett 'a' és 'b' kópiák együttes elemzésének hatását a topológiára és koaleszcenciaidőkre, két újabb BEAST v.2.6.1 elemzésben

külön elemeztük csak az 'a' és 'b' kópiák filogenetikai pozícióját és koaleszcenciaidejét. A plaztisz adatsor esetében, mivel a törzsfá gerincének két hasonlóan valószínű topológiáját azonosítottuk, a két eltérő topológiát fixáltuk és a fent bemutatott módon NS és bayes faktorok segítségével becsültük meg a valószínűbb leszármazást. Az első topológia a *Hepatica nobilis* és *Hepatica transsilvanica* monofiletikusságát valószínűsítette, a második pedig a *Hepatica falconerit* tételezte fel a *Hepatica transsilvanica* testvérfajának.

### 2.2.3. Eredmények

Az nrITS illesztése 568 nukleotidból álló adatsort eredményezett, amiből 90 pozíció bizonyult polimorfnek és 58 informatívnak. A belcsoporton belül (*Hepatica*) 19 variábilis és 10 informatív pozíció azonosítottunk. Az nrITS szekvenciákban dupla csúcsot (ahol két, különböző nukleotid azonos eséllyel fordulhat elő) csak a 'H. transsilvanica 2' mintában figyeltünk meg (**6. táblázat**), ami nem bizonyult additív polimorfizmusnak, viszont 1.0 (maximális) valószínűséggel azonosítható volt a haplotípusa. A PHI statisztika nem valószínűsített rekombinációs eseményt sem a teljes adatsoron ( $p = 0,888$ ), sem a belcsoporton belül ( $p = 0,96$ ).

Az *MLH1* mátrix 318 bp hosszú volt, ebből 47 polimorf és 24 informatív nukleotidot azonosítottunk a teljes adatsorra nézve. A *Hepatica*-n belül kilenc polimorfizmusból nyolc bizonyult informatívnak. Az *MLH1* szekvenciák esetében négy dupla csúcsot figyeltünk meg a nyers szekvenciákban, ezek mindegyike *Hepatica transsilvania* mintákban volt felfedezhető (**6. táblázat**). A PHASE független ismétlései ugyanazokat a haplotípusokat azonosították, legalább 0,96, legfeljebb 1,0 valószínűséggel, kivéve egy egyedi polimorfizmust a 'H. transsilvanica 3' mintában, amelynek haplotípusait 0.50 valószínűséggel sikerült megállapítani, ezt a továbbiakban IUPAC kóddal láttuk el. Két pozíció mutatott additív polimorf jelleget, itt a *Hepatica nobilis*-ra és *Hepatica falconerire* jellemző polimorfizmust figyeltük meg. Az additív

csúcsok közül egy következetesen előfordult az összes *H. transsilvanica* mintában, míg a másikat a 'H. transsilvaica 2' és 'H. transsilvanica 3' mintában figyeltük meg. A PHI teszt itt sem utalt rekombinációra sem a teljes adatsoron ( $p = 0,055$ ), sem a belcsoporton belül ( $p = 1.0$ ).

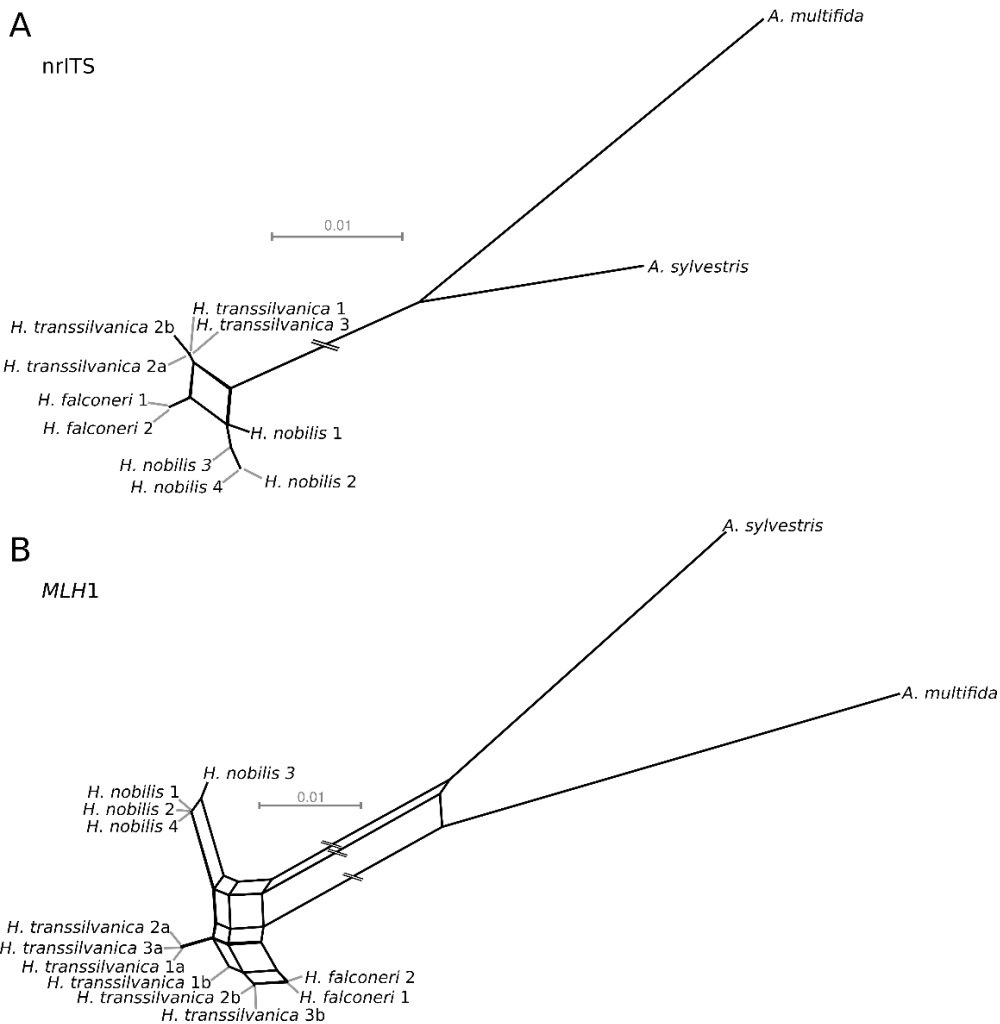
**6. táblázat** A megfigyelt polimorfizmusok a sejtmagi szekvenciákban a *Hepatica transsilvanica* eredetének vizsgálata során. A félkövérrel szedett oszlopok additív polimorfizmust mutatnak.

<b>DNS régió</b>	<b>nrITS</b>	<b>MLH1</b>			
pozíció	35	41	<b>170</b>	213	<b>216</b>
<i>H. nobilis 1</i>	G	C	<b>A</b>	G	<b>C</b>
<i>H. nobilis 2</i>	G	C	<b>A</b>	G	<b>C</b>
<i>H. nobilis 3</i>	G	C	<b>A</b>	G	<b>C</b>
<i>H. nobilis 4</i>	G	C	<b>A</b>	G	<b>C</b>
<i>H. transsilvanica 1</i>	G	C	<b>R</b>	R	<b>C</b>
<i>H. transsilvanica 2</i>	R	C	<b>R</b>	R	<b>Y</b>
<i>H. transsilvanica 3</i>	G	Y	<b>R</b>	R	<b>Y</b>
<i>H. falconeri 1</i>	G	C	<b>G</b>	G	<b>T</b>
<i>H. falconeri 2</i>	G	C	<b>G</b>	G	<b>T</b>
<i>H. asiatica</i>	G	-	-	-	-
<i>H. henryi</i>	G	-	-	-	-

A plazsztisz (*trnL-trnF* + *accD-psaI*) adatsor illesztett hossza 1275 bp volt. A teljes adatsor 33 variábilis és 30 informatív pozíciót tartalmazott, míg a belcsoportban felfedezett nyolc polimorfizmusból négy bizonyult informatívnak.

A NeighborNet elemzés mindkét sejtmagi lókuszt alapján nagy genetikai távolságra helyezte a külcsoportot (**4. ábra**). Az nrITS esetében (**4.A ábra**) a belcsoporton belül egy központi „doboz-szerű” (Bryant & Moulton, 2004) hurkot figyeltünk meg. A belcsoport mindhárom faja elkülönülő egységet alkotott, habár a genetikai távolság viszonylag alacsonynak mutatkozott. A 'H. transsilvanica 2' haplotípusai (az egyetlen minta, amely nrITS szekvenciájában

dupla csúcsot figyeltünk meg) látszólag a *Hepatica falconeri*hez áll legközelebb. Az *MLH1* illesztés jóval nagyobb számú retikulációra utaló struktúrát tárt fel (**4.B ábra**), mind a külcsoport és belcsoport, mind a belcsoport mintái között. A *Hepatica transsilvanica* 'a' kópiái egy csoportot alkotnak, amelyek a 'b' kópiákhoz állnak legközelebb. A 'H. transsilvanica 1b' kópia körülbelül egyenlő genetikai távolságra található az 'a' kópiák a és a 'H. transsilvanica 2b' / 'H. transsilvanica 2b' haplotípusai között, utóbbiak a *Hepatica falconeri*hez állnak legközelebb. A *Hepatica nobilis* látszólag nagy genetikai távolságra található a másik két elemzett faj mintáitól, azonban számos retikulációra utaló él fedezhető fel az egyes minták között.



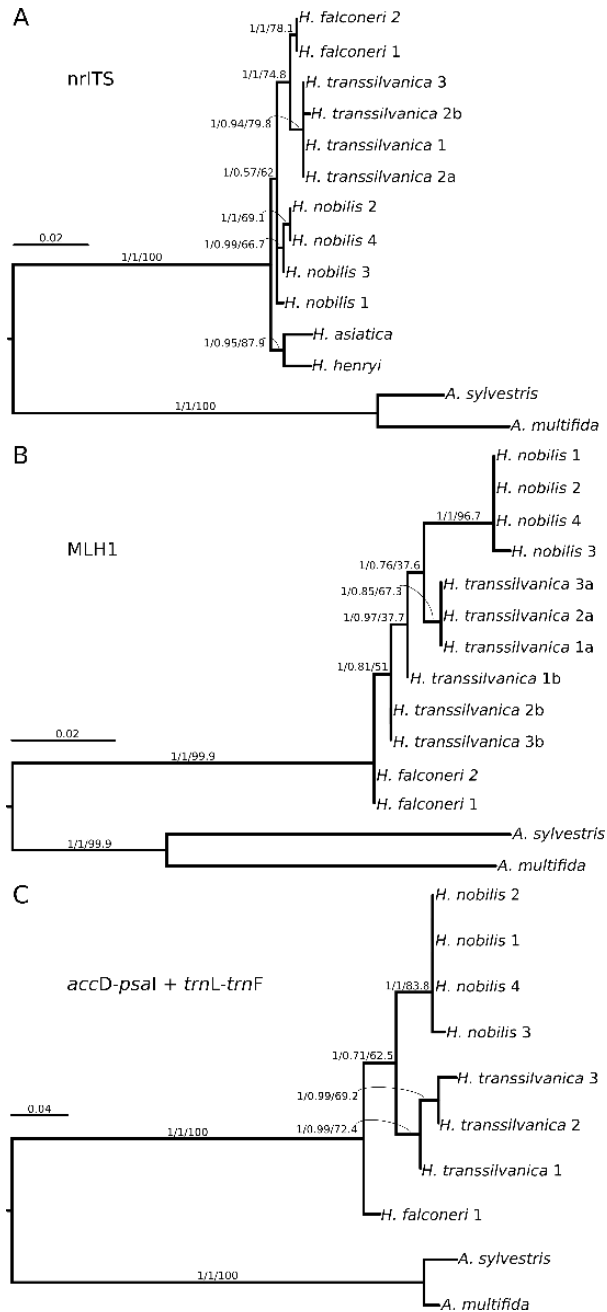
**4. ábra** A *Hepatica transsilvanica* eredetének feltárásánál használt sejtmagi lókuszok filogenetikai hálózata ('NeighborNet'). Az egyes minták közti genetikai távolság arányos az eltérő pozíciók számával az illesztésben, a „doboz-szerű” (Bryant & Moulton, 2004) hurkok retikulációs eseményekre vagy filogenetikai bizonytalanságra utalhatnak.

A PhyML által rekonstruált génfák mindegyike nagy bizonyossággal különítette el a külcsoportot, de a *Hepatica transsilvanica* pozíciója ellentmondásosnak bizonyult (**5. ábra**).

A modellszelekció (SMS v.1.8.4) a GTR szubsztitúciós modellt azonosította, mint az nrITS evolúciójának legjobban illeszkedő modelljét. Ebben az elemzésben elsőként a *Hepatica asiatica* és *Hepatica henryi* volt elkülöníthető nagy támogatottsággal testvérfajokként. A *Hepatica nobilis* mintái egymástól kis genetikai távolságra helyezkedtek el, metafiletikus csoportot alkottak, amely elválását csak az SH-aLRT támogatta. A *Hepatica falconeri* és *Hepatica transsilvanica* nagy támogatottsággal különült el az előbbi taxonoktól (**5.A ábra**).

Az *MLH1* adatsoron a HKY85 + G szubsztitúciós modell tűnt a legvalószínűbbnek. A *Hepatica transsilvanica* két haplotípusát (*H. transsilvanica* '2b' és '3b') genetikailag a *Hepatica falconeri*hez találtuk legközelebb. A törzsfá vége felé haladva átmeneti csoportot alkot a *H. transsilvanica* négy haplotípusa ('H. transsilvanica 1b', 'H. transsilvanica 1a – 3a'), elválásukat az SH-aLRT és az aBayes statisztika is támogatta. A *Hepatica nobilis* viszonylag hosszabb ágon találjuk magas statisztikai támogatottsággal. Összegezve, az *MLH1* szekvenciák alapján a *H. transsilvanica* összes haplotípusa értelmezhető a feltételezhető szülőfajok között elhelyezkedő közbenső csoportként, bár egyes ágaknak viszonylag alacsonyabb a statisztikai támogatottsága (**5.B ábra**).

A plasztisz adatsor legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modellje a GTR + G volt. Minden fajhoz vezető ág magas statisztikai támogatást kapott. Bár a *Hepatica transsilvanica* és a *Hepatica nobilis* fajok testvér taxonokként azonosíthatóak, e klád monofiletikusságát kizárólag az SH-aLRT teszt támogatta (**5.C ábra**).



**5. ábra** A 'Maximum Likelihood' (ML) módszer alapján rekonstruált (A) nrITS, (B) *MLH1* és (C) plasztisz génfák. A statisztikai támogatottság SH-aLRT/aBayes/bs sorrendben van feltüntetve az ágak fölött.

Az nrITS esetében az állandó molekuláris óra modellje jól illeszkedett az adatsorra, míg az *MLH1* adatsor esetében ennek meglétét elvetettük és a korrelálatlan molekuláris órát használtuk (7. táblázat). Mindkét adatsor esetében a valószínűség szórása jóval kisebb volt, mint az állandó és korrelálatlan molekuláris órát használó modellek valószínűségét összehasonlító bayes faktor (BF) értékénél. A plasztisz adatsor esetében nem tudtuk egyértelműen megállapítani, melyik molekuláris óra modell illeszkedik jobban az adatsorra, mivel a valószínűségi értékek szórása nagyobb volt, mint a két modellt összehasonlító BF fele (7. táblázat). Ebben az esetben a jobb valószínűséggel rendelkező korrelálatlan molekuláris óra használata mellett döntöttünk.

**7. táblázat** Egyes molekuláris óra modellek illeszkedésének valószínűsége a három független lókuszból származó adatsorokra.

DNS régió	Molekuláris óra modell	Valószínűség ('log marginal likelihood')	SD	Bayes Faktor
ITS	korrelálatlan ('uncorrelated relaxed')	-2769,613	0,968	1070,209
	állandó	-1699,404	6,059	
<i>MLH1</i>	korrelálatlan ('uncorrelated relaxed')	-755,216	3,086	72,309
	állandó	-827,525	1,806	
plastid (accD-psaI + trnL-trnF)	korrelálatlan ('uncorrelated relaxed')	-1881,764	1,305	2,434
	állandó	-1884,198	1,298	

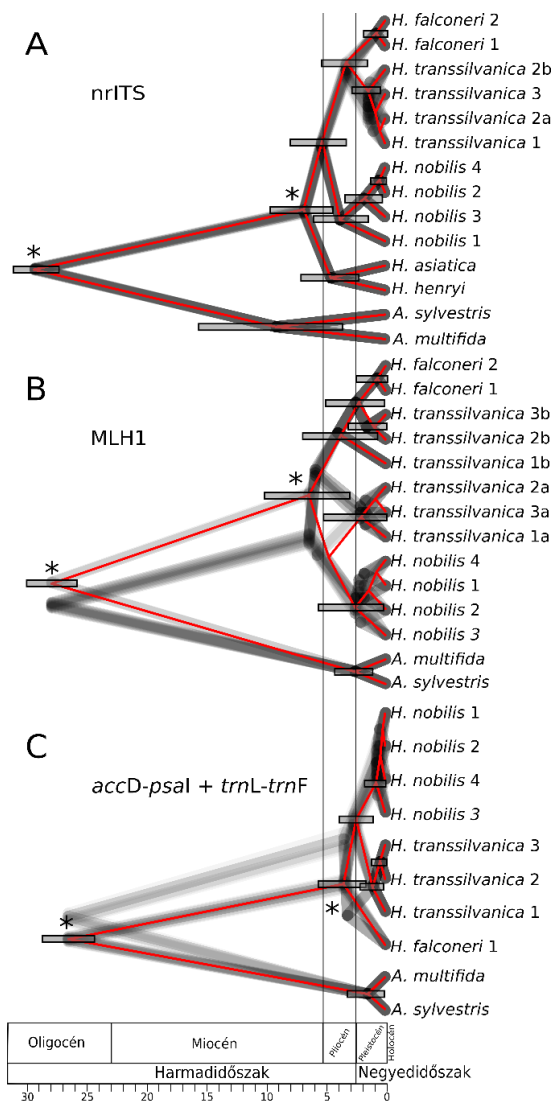
Az nrITS szekvenciák alapján rekonstruált törzsfá topológiák 95% poszterior denzitásintervalluma összesen 24 különböző topológiát reprezentált, a törzsfák gerincének struktúrája minden esetben megegyezett (6.A ábra). A külső csoport elválásának időpontját 29,4 millió évvel ezelőttre

(95% HPD = 27,5–31,4) becsültük. A *Hepatica*-n belül az első elágazás a *Hepatica asiaticat* és *Hepatica henryit* különíti el, amelyek koaleszcenciaideje a nemzetség fennmaradó fajaival 6,7 millió év (95% HPD = 4,3–9,7), ami a miocénre tehető. A következő izolációs esemény 5,2 millió évvel ezelőtt (95% HPD = 4,3–9,7) a *Hepatica nobilist* választja el. Az elemzés egy viszonylag mély elválást tárt fel a *H. nobilis*-en belül, mivel az nrITS kópiák közös őse a 3,8 millió évvel ezelőtt, a pliocénben létezhetett (95% HPD = 1,4–6,2). A *Hepatica transsilvanica* testvérfajként kerül a *Hepatica falconerivel* egy ágra, a kópiák közös őse körülbelül 3,2 millió évvel ezelőttre datálható (95% HPD = 3,0–7,8). A hasonlóan valószínű topológiák csak a *H. transsilvanican* belül nem mutattak egységes struktúrát.

Az *MLH1* szekvenciák ugyanazon elemzése 15 egyedi törzsfát tartalmazott, és két különböző gerinc topológiát tárt fel (**6.B ábra**). A gyökér becsült kora 27,8 millió év volt (95% HPD = 25,9–29,8), a *Hepatica* kópiáinak divergenciája körülbelül 6,4 millió évvel ezelőttre volt tehető (95% HPD = 3,1–10,0). A legvalószínűbb fát a 95% HPD topológiák 78%-a támogatta és helyezte el a különböző *Hepatica transsilvanica* minták 'a' kópiáit a *Hepatica nobilis* testvéreként, ezek közös őse 4,7 millió évvel ezelőttre datálható (95% HPD = 2,1– 8,6). A fennmaradó törzsfák a *H. nobilist* testvércsoportként azonosították a belcsoport többi mintájához képest és a közös ős időpontját 5,7 millió évvel ezelőttre (95% HPD = 2,4–8,6) datálták. A *H. transsilvanica* 'b'-vel jelölt haplotípusai egyértelműen a *Hepatica falconeri*hez kerültek közelebb. Ezek közül két kópia ('H. transsilvanica 2b' és 'H. transsilvanica 3b') monofiletikus egységet alkotott. A 'b' kópiák közös őse körülbelül 3,5 millió évvel ezelőtt létezhetett (95% HPD = 0,8–6,8), míg a 'H. transsilvanica 2b'/'H. transsilvanica 3b' és a *H. falconeri* haplotípusai a pliocén/pleisztocén átmenet közelében, körülbelül 2,4 millió éve válhattak el egymástól (95% HPD = 0,2–4,8).

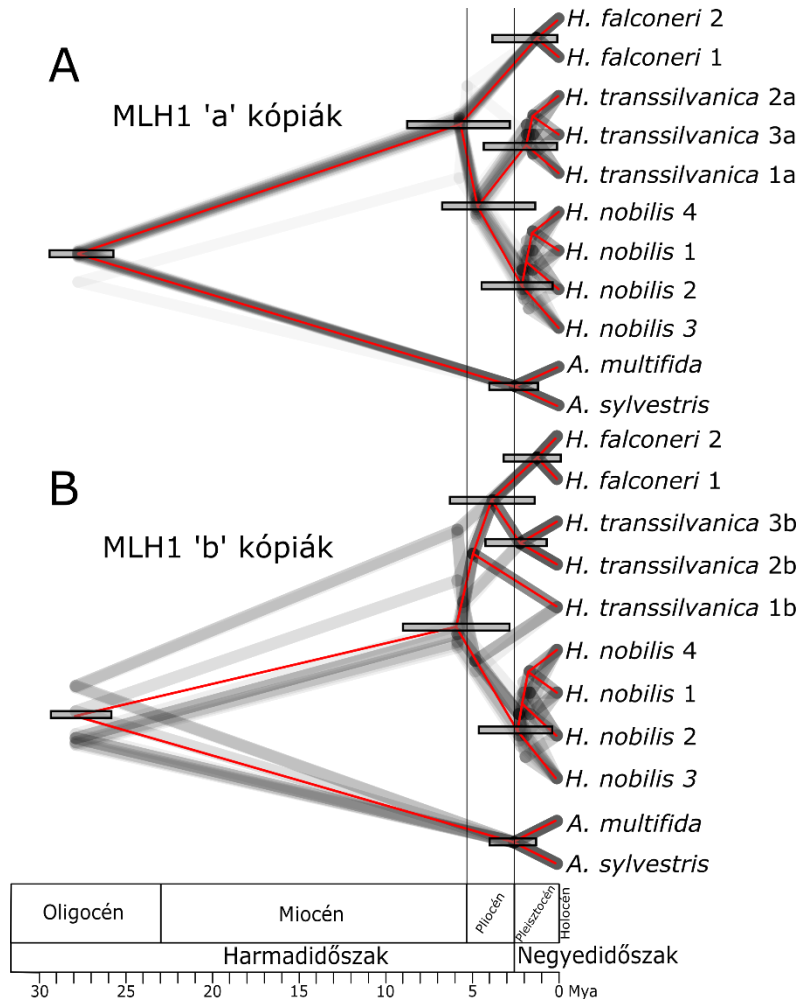
A plasztiszszekvenciák elemzése összesen 24 egyedi törzsfát eredményezett és a törzsfa gerincének két eltérő topológiáját fedte fel. A

fennmaradó egyedi topológiákért felelős törzsfák a *Hepatica nobilis*-en belül tartalmaztak feloldatlan ágakat (**6.C ábra**). A külcsoport haplotípusainak izolációja 26,5 millió évvel ezelőtt következhetett be (95% HPD = 24,5–28,40). A legvalószínűbb törzsfa és az egyedi topológiák 63%-a *Hepatica falconeri*t a *Hepatica nobilis* / *Hepatica transsilvanica* testvéreként helyezte el, a kópiák legközelebbi közös őse a pliocénben létezhetett 3,5 millió évvel ezelőtt (95% HPD = 1,8–5,4). Ebben az esetben a *H. transsilvanica* a pliocén / pleisztocén átmeneténél válhatott el a *H. nobilis*-től, körülbelül 2,4 millió évvel ezelőtt (95% HPD = 1,2–3,7), míg az alternatív topológia a *H. falconeri*-t és *H. transsilvanica*-t helyezi egy viszonylag rövid ágra és 3,2 millió évvel ezelőttre datálja közös őzüket (95% HPD = 1,5–4,9). A NS elemzés értelmében a *H. nobilis* és *H. transsilvanica* monofiletikusságának valószínűsége -1889,698 (SD = 1,534), míg a *H. falconeri* és *H. transsilvanica* testvérfajként való azonosításának valószínűsége -1896,294 (SD = 1,580). A két modellt összehasonlító Bayes faktor értéke 6,595, ami a *H. nobilis* és *H. transsilvanica* monofiletikusságát támogatja.



**6. ábra** A BEAST v.2.6.1 által rekonstruált génfák és az izolációs események időpontja az (A) nrITS, (B) *MLH1* és (C) *plasztisz* adatsor alapján. A legvalószínűbb törzsfá piros színnel van jelölve, az egyéb valószínű törzsfák pedig vastag szürke vonalakkal. A kalibrációs pontok csillaggal vannak jelölve. Az izoláció ideje millió években van feltüntetve, az elválás idejének 95%-os valószínűségét szürke vízszintes sáv jelzi, amely csak minimum 50%-os poszterior valószínűség esetén van feltüntetve. Az ábra alatti időskála millió években értendő.

Az *MLH1* 'a' és 'b' kópiáinak külön történő elemzése a *Hepatica transsilvanica* 'a' kópiáit minden esetben a *Hepatica nobilis* testvéreként azonosította (**7.A ábra**), míg az 'a' és 'b' kópiák együttes elemzése esetében ez a törzsfatopológiák 95% denzitás intervallumának 78%-ában volt igaz. A 'b' kópiák elemzésénél a '2b' és '3b' haplotípusok továbbra is minden esetben a *Hepatica falconeri* testvéreként voltak azonosíthatóak (**7.B ábra**), közös őstük, igaz, korábbra datálható (átlag 2,4 millió év az összes minta elemzésének esetén és 3,7 millió év csak a 'b' kópiák bevonása esetén). A 'H. transsilvanica 2b' és 'H. transsilvanica 3b' kópiák koaleszcenciaidejének 95% poszterior denzitásintervalluma átfed, 0,2—4,8 millió év az összes minta elemzésének esetén és 0,2—5,6 millió év csak a 'b' kópiák bevonása esetén. Utóbbi eltérés összefüggésben állhat a 'H. transsilvanica 1b' haplotípus bizonytalan helyzetével (**7.B ábra**), amely a törzsfák 95% denzitás intervallumában 60%-ban azonosítható az első leágazásként a *Hepatica falconeri* ágán, a fennmaradó 40%-ban pedig a *Hepatica nobilis* testvéreinek tűnik.



**7. ábra** A BEAST v.2.6.1 által rekonstruált *MLH1* génfák csak az 'a', illetve 'b' kópiák elemzése esetén. A legvalószínűbb törzsfák piros színnel van jelölve, az egyéb valószínű törzsfák pedig vastag szürke vonalakkal. A kalibrációs pontok csillaggal vannak jelölve. Az izoláció ideje millió években van feltüntetve, az elválás idejének 95%-os valószínűségét szürke vízszintes sáv jelzi, amely csak minimum 50%-os poszterior valószínűség esetén van feltüntetve. Az ábra alatti időskála millió években értendő.

## 2.2.4. Diszkusszió

Ezen tanulmányunkban a *Hepatica transsilvanica* eredetét vizsgáltuk. Nagyobb számú DNS régió alapuló eredményeink egybevágóan korábbi szerzők (Weiss-Schneeweiss és mtsai., 2007) eredményeivel az itt vizsgált fajok filogenetikai helyzetét illetően. Az nrITS adatsor alapján a Közép- és Kelet-Kínában őshonos fajok (*Hepatica asiatica* és *Hepatica henryi*) különálló, korai leszármazási ágat képviselnek. Ebben az elemzésben az európai taxonok (*Hepatica nobilis* és *Hepatica transsilvanica*) a közép-ázsiai *Hepatica falconeri*vel monofiletikus egységet alkottak. Az nrITS szekvenciák alapján a *H. transsilvanica* és *H. falconeri* testvérfajoknak tekinthetők. Ezzel ellentétben, a plasztisz adatsor elemzése arra utal, hogy a *H. transsilvanica* a *H. nobilis*-hez áll legközelebb és a *H. falconeri* az európai fajok testvértaxonja. Bár Zonneveld (2010) kis genommérete miatt a *H. falconeri*t feltételezte a nemzetség legősibb fajának, a mi elemzésünk a Kelet-Ázsiai fajok nrITS kópiáinak korábbi izolációja miatt nem támogatja ezt a hipotézist.

Az nrITS datált filogenetikai elemzése alátámasztotta Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) eredményeit, miszerint a pliocén fontos szerepet játszott a *Hepatica* nemzetség divergenciájában, azonban a mi elemzéseink régebbi koaleszcenciaidőt valószínűsítettek. A *Hepatica* izolációjának korábban leírt időpontja szélesebb taxonómiai mintázás alapján, módszertől függően (4,3–) 2,5 (–0,8) és (0,9–) 0,5 (–0,2) millió évvel ezelőtre datálható, míg becslésünk szerint ez a dátum szűkebb mintázás alapján körülbelül 6,7 millió évvel ezelőtre tehető (95% HPD = 4,23–9,7). Hasonló becslést értünk el az *MLH1* szekvenciák alapján, de a kelet-ázsiai fajok bevonása nélkül. Tanulmányunk és a korábban publikált adatok közötti eltérést az izolációs események időzítésében nemcsak a különböző alkalmazott DNS régiók okozhatják, hanem a különböző stratégia és kalibrációs pontok használata is. Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) nrITS és *matK* szekvenciák alapuló adatsorukon általános mutációs ráta és az Ullung-sziget (a *Hepatica maxima* Nakai kizárólagos elterjedési területe) kora segítségével kalibrálta a

molekuláris órát. Az Ullung-sziget kora egyaránt értelmezhető minimum és maximum korként is, ami potenciálisan bizonytalanságot eredményezhet. Ezenkívül az NPRS ('non-parametric rate smoothing') és PL ('penalized likelihood') módszerek helyett bayesianus statisztikát használtunk a BEAST v.2.6.1 segítségével és kalibrációs pontként Wang és mtsai. (2016) fossziliák által kalibrált filogenetikai törzsfáján valószínűsített dátumokat vettük figyelembe. Mindazonáltal, a Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) által alkalmazott datálásra irányuló módszerek nem vethetőek össze közvetlenül az itt bemutatottakkal. A becslések pontatlansága és a viszonylag kevés DNS régió alapuló elemzésekből eredő bizonytalanság hatással lehet az egyes fajok feltételezett izolációjának idejére. Fontos megemlíteni, hogy elemzéseink nem direkt módon a fajok izolációjának idejét tárták fel, hanem egy-egy lókuszt koaleszcenciaidejének becslésére irányultak. Ezzel együtt, a vizsgálatunkban becsült dátumok átfednek más, hasonló elterjedési mintázatot mutató fajok speciációs eseményeinek idejével. Fosszilis bizonyítékok alapján egyes eurázsiai léptékben feltűnően diszjunkt elterjedést mutató taxonok sokkal szélesebb elterjedési területtel rendelkeztek a negyedidőszak előtt (Yokoyama és mtsai., 2000; Lendvay és mtsai., 2016). Ezen eredmények a nemzetség evolúciós történetének, beleértve a hibridizációt is, és a speciáció lehetséges hajtóerőinek újraértékelését sürgetik.

Érdemes megemlíteni a *Hepatica nobilis*-en belül az nrITS szekvenciák alapján felfedezett viszonylag mély elválást (3,8 millió év, 95% HPD = 1,4–6,2), amely a középső pliocénnek felel meg. A *H. nobilis*, mint modellfaj, filogeográfiai vizsgálata az európai mérsékelt éghajlatú flóra fontos evolúciótörténeti aspektusait tárhatja fel, mivel a negyedidőszak kezdetétől folyamatosan jelen lehet Európában.

Fentiek fényében, a filogenetikai kapcsolatokat a nemzetség és egyes fajok szintjén is érdemes lehet filogenomikai módszerekkel vizsgálni, amelyek csekély genetikai differenciáció esetén is nagy biztonsággal tárhatják fel az evolúciós kapcsolatokat (pl. Sramkó és mtsai., 2019b; Twyford & Ennos, 2012,

Andrews és mtsai., 2016) és mivel rendszerint sok, rekombinálandó lókuszon alapulnak, nagyobb pontossággal becsülhető a taxonok izolációjának ideje és térképezhetőek fel a retikulációs események is.

Eredményeink a *Hepatica transsilvanica* allopoliploid eredetéről tanúskodnak. A Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) és Bartha és mtsai. (2014) által valószínűsített hibrid eredetet alátámasztja a faj mintáinak inkongruens filogenetikai pozíciója az nrITS és plasztisz adatsor alapján (Wendel & Doyle, 1998). A filogenetikai hálózaton retikuláció bayesiánus statisztika segítségével feloldható volt. Az nrITS-ben megfigyelt struktúrára valószínűleg hatással volt az összehangolt evolúció (Álvarez & Wendel, 2003; Bailey és mtsai., 2003), amely a *H. transsilvanica* nrITS kópiáit valószínűleg a *Hepatica falconeritől* örökölt kópiákkal igyekszik egyezővé tenni. Az *MLH1* sejtmagi, alacsony kópiaszámú gén analízise lehetővé tette a hibrid speciáció közvetlen tanulmányozását, mivel a két valószínűsített ősi genomból származó 'a' és 'b' kópiák két, a szülőfajokkal asszociálható leszármazási ágon helyezkedtek el. Az 'a' és 'b' kópiák külön történő elemzése a legvalószínűbb törzsfa topológiájára nem volt jelentős befolyással. A 'b' kópiák parafiliája és az 'a' kópiák inkongruens topológiai helyzete a nem szignifikáns PHI teszttel együtt ( $p = 0,055$  a teljes adatsoron,  $p = 1,0$  a belcsoporton belül) retikulációs eseményre is utalhat. Az 'a' kópiák bizonytalan elhelyezése akár olyan molekuláris evolúciós folyamatokból is következhet (például génkonverzió), amelyek az anyai génkópiák szekvenciáját az apai allélok felé tolják el. Az elképzelést támogatja a filogenetikai hálózat topológiája is a feltételezhető retikulációs események feltérképezésével, különös tekintettel a 'H. transsilvanica 2b' kópia helyzetének figyelembe vételével. Megjegyzendő azonban, hogy a hálózat egyes éleinek hátterét, ahol „doboz-szerű” struktúrát figyelhetünk meg, nehéz azonosítani. Az ilyen élek önmagukban utalhatnak retikulációra és filogenetikai bizonytalanságra is. Elképzelhető, hogy az *MLH1* haplotípusok parafiliája egy három millió éves génkonverziós esemény hű ábrázolása egy allotetraploid fajban, de ennek egyértelmű bizonyítása további kísérleteket igényel, aminek biztosabb alapja lehet a teljes gén szekvenciája az

itt felhasznált intron szakasz helyett. A topológiai inkongruencia másik magyarázata lehet a viszonylag kis mennyiségű polimorfizmuson alapuló elemzés, amelyek esetleges ellentmondása, vagy a leszármazási sorok nem teljes leválogatódása esetén egyes haplotípusok filogenetikai helyzete nem határozható meg egyértelműen.

A plaztisz adatsor elemzése alátámasztotta Weiss-Schneeweiss és mtsai. (2007) hipotézisét, miszerint a *Hepatica transsilvanica* anyai szülője a *Hepatica nobilis* lehet. Az nrITS elemzése alapján valószínűtlennek tűnik, hogy egy másik ázsiai taxon szerepet játszott volna a *H. transsilvanica* speciációjában, mivel célfajunk izolációja sokkal fiatalabbnak tűnik, mint a *Hepatica asiatica* és *H. nobilis*, két hasonló morfológiájú faj, közös ősenek elválása.

A *Hepatica transsilvanica* hosszú távú jelenlétét a Délkelet-Kárpátokban eredményeink támogatják. A sejtmagi genetikai régiók független elemzése alapján a *H. transsilvanica* és a pollendonor szülőfajára (*H. falconeri*) jellemző génkópiák koaleszcenciaideje körülbelül 3,5–3,2 millió év. A *H. transsilvanica* és *Hepatica nobilis* kizárólag anyai ágon öröklődő plaztisz haplotípusainak koaleszcenciaideje körülbelül 2,4 millió évvel ezelőttre tehető. A plaztisz genom jóval kisebb effektív populációmérete a tetraploid sejtmagi genomhoz viszonyítva (Schaal és mtsai., 2000), a rekombináció hiányával együtt, lehetővé teszik, hogy ezen lókuszokon az izoláció genetikai lenyomata jóval hamarabb megnyilvánuljon, pontosabb becslést adva annak idejéről. Ezek alapján a hibrid *H. transsilvanica* izolációjának ideje körülbelül egybeeshet a negyedkori eljegesedési ciklusok kezdetével. Végül, a molekuláris órát használó elemzéseink egymástól függetlenül arra következtettek, hogy a *H. transsilvanica* és szülőfajai legközelebbi közös őse a pleisztocén előtt létezhetett, amely időszakban Európa harmadkori flórájának nagy része kipusztult (Svenning, 2003, Willis & Niklas, 2004).

Fentiek fényében kijelenthető, hogy a *Hepatica transsilvanica* a harmadkori európai flóra reliktum faja, amely képes volt túlélni a negyedidőszaki klíma változásait a Délkelet-Kárpátokban. Ezen biogeográfiai régióknak a jelentősége ismert (Mráz & Ronikier, 2016; Ronikier és mtsai., 2008; Bartha és mtsai., 2015), azonban a filogeográfiai mintázatok időbeli aspektusát viszonylag kevés szerző rekonstruálta. A *Syringa josikaea* esetéhez (Lendvay és mtsai., 2016) hasonlóan eredményeink nem csak a Kárpátok negyedidőszakban belöltött biogeográfiai szerepét emelik ki, hanem harmadkori reliktumok túléléséről tanúskodnak a régióban. Habár a *H. transsilvanica* belüli pontos filogeográfiai mintázatok nem derítettük fel, a faj refúgiuma valószínűleg összefüggésbe hozható meszes alapkőzetű területekkel. A Kárpátok hosszú távú klimatikus stabilitása heterogén élőhelytípusokban tette lehetővé számos endemikus faj túlélését (Hurdu és mtsai., 2016). A Kárpátok izolációs hatásának köszönhetően számos további, mezofil lombdökhöz köthető faj refúgiuma is valószínűsíthető a területen, mint például *Aconitum moldavicum* Hacq. ex Rechb., *Dentaria glandulosa* Waldst. & Kit., *Symphytum cordatum* Willd., and *Pulmonaria rubra* Schott (Hendrych, 1981).

## 2.3. A *Primula vulgaris* európai léptékű genetikai variabilitásának vizsgálata

### 2.3.1. Irodalmi előzmények

Habár a dél-európai félszigetek (Ibériai, Appenin és Balkán) refugiális szerepe, mint Európa biodiverzitásának fontos forrásai, jól ismert (Hewitt, 1996, 2004a; Taberlet és mtsai., 1998), Korzhinskiï (1899) és Kamelin és mtsai. (1999) munkája alapján fontos szerepet játszhattak keleti refúgiumok is az európai flóra kialakításában. Ide érthetjük a Nyugat-Kaukázus, a Dél-Ural és az Altáj-hegység területét, amely földrajzi régiók biogeográfiai jelentőségével, recens filogenetikai eszközöket használva, rendkívül kevés tanulmány foglalkozott. Habár néhány tanulmány vizsgálta mezofil fajok filogeográfiai mintázatát (Jia és mtsai., 2012, Manafzadeh és mtsai., 2014; Treier & Müller-Schärer, 2011), a legtöbb kapcsolódó tanulmány hidegtűrő fajokra koncentrált (Palme és mtsai., 2003, Pyhäjärvi és mtsai., 2008; Tollefsrud és mtsai., 2009; Volkova és mtsai., 2020), amelyek alátámasztják a vizsgált fajok kelet-nyugati irányú posztglaciális előrenyomulását. A paleobotanikai és paleoklimatikus rekonstrukciók rámutattak a Ponto-Kaszpi térség, különösen a Fekete-tenger északkeleti partjánál fekvő Kolhisz régió lehetséges refugiális szerepére (Tarkhnishvili és mtsai., 2012). Taberlet és mtsai. (1998), valamint Hewitt (2000) előrevetítették a régió biogeográfiai szerepét, amelyet később Grimm & Denk (2014) egyedi, endemikus genotípusokban és fajokban gazdag területként ír le, megerősítve a feltételezeten nagy biológiai változatosságot. A mai napig azonban hiányoznak olyan kontinentális léptékű filogeográfiai vizsgálatok, amelyek célzottan a potenciális keleti refúgiumok Európa flórájának kialakítására gyakorolt szerepét vizsgálják.

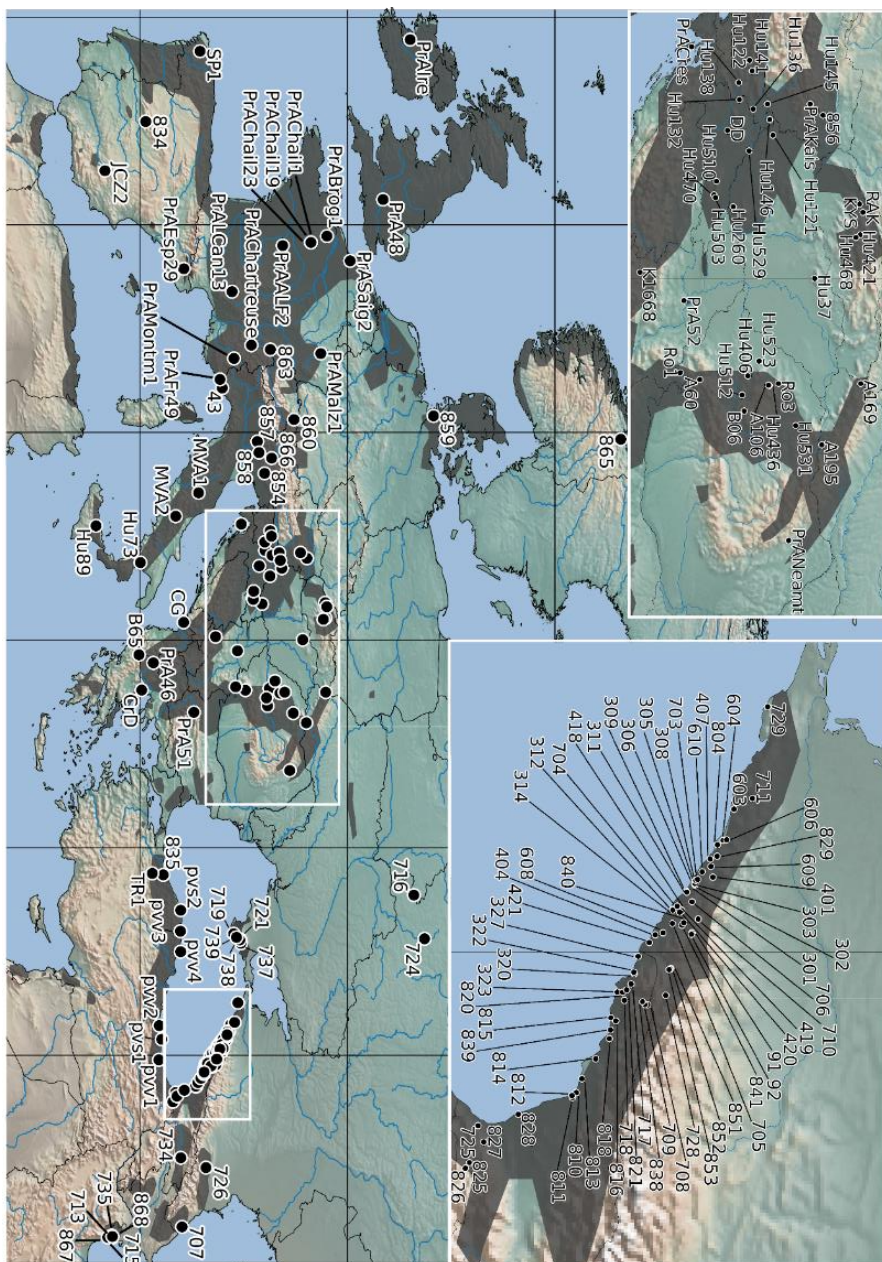
Tanulmányunkban a *Primula vulgaris* genetikai struktúráját vizsgáltuk európai léptékben. A faj Európa-szerte elterjedt és a szubatantikus klímájú lombdők tisztásainak karakterisztikus faja (Jacquemyn és mtsai., 2009). Volkova és mtsai. (2013) magas genetikai diverzitást figyeltek meg a növény

Kolhisz régióban található populációban, de mivel mintázásuk a Fekete-tenger környékére koncentrált, a teljes áréáról származó összehasonlító minták nélkül a felfedezett genetikai diverzitás jelentőségét európai léptékben jelentőségét nem tudták vizsgálni.

### 2.3.2. Anyag és módszer

#### Mintázás és laboratóriumi munka

Volkova és mtsai. (2013) a Fekete-tenger észak-keleti partvidékén gyűjtött mintáit (57 populáció) további, 103 populáció mintáival egészítették ki, ezáltal a teljes európai elterjedési területen összesen 160 populációból származó egyedek segítségével folytattuk vizsgálatainkat (**1. Függelék, 8. ábra**). A mintákat szilikagélben szobahőmérsékleten (15-25 °C) vagy 96%-os etanolban 4 °C-on tároltuk. Volkova és mtsai. (2013) tesztelte a sejtmagi nrITS, valamint a *trnL-trnF* és *rpl32-trnL* plasztisz szakaszok variabilitását. Az ezen régiókon megfigyelt variabilitás miatt jelen tanulmányban a Volkova és mtsai. (2013) által használt lókuszokat alkalmaztuk a filogeográfiai elemzéseinkhez. Az ehhez felhasznált primerek megegyeznek az **5. táblázat**ban felsoroltakkal és a lókuszok amplifikációjához felhasznált protokoll a korábban bemutatottakkal. Két populáció három-három egyedén végzett előzetes vizsgálataink alapján (Hu121, PraChail) nem fedeztünk fel populáción belüli variabilitást egyik lókuszon sem, amely egybevág Volkova és mtsai. (2013) eredményeivel, aki nagyobb mintaszámmal is csak populációk között találta variábilisnak a felsorolt lókuszokat.



**8. ábra** A *Primula vulgaris* filogeográfiai vizsgálata során elemzett minták földrajzi elhelyezkedése. A faj szürkével jelölt elterjedési területe Meusel és mtsai. (1965) alapján van feltüntetve.

## Adatelemzés

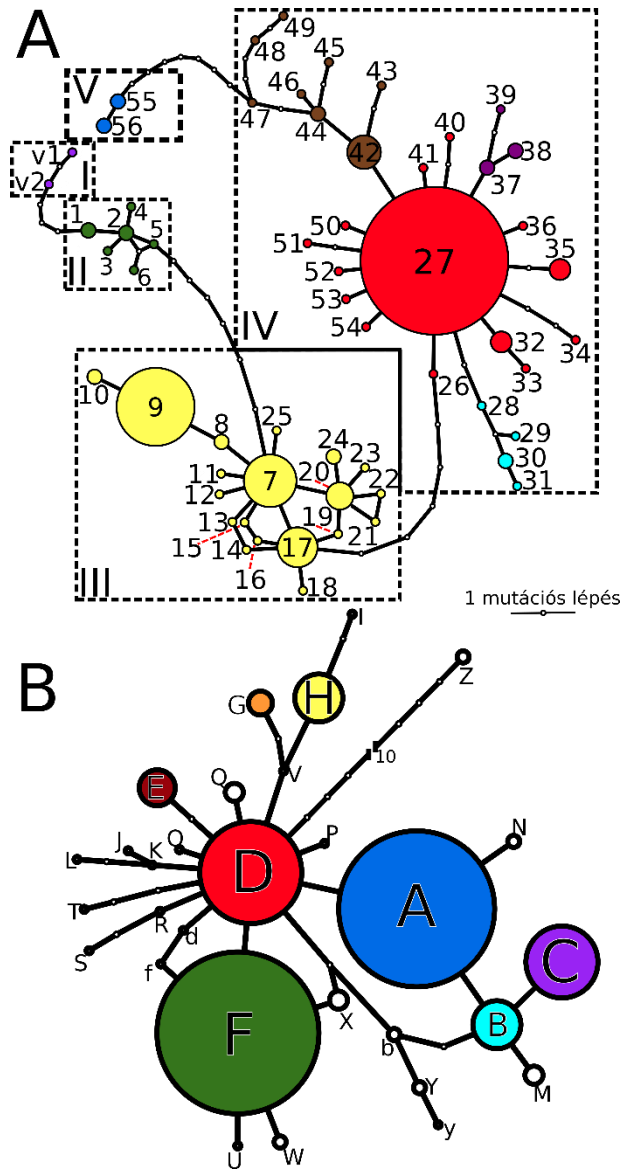
A nyers szekvenciákat, kiszűrendő az egyértelmű szekvenálási hibákat, egyesével ellenőriztük, majd manuálisan illesztettük a BioEdit v.0.7.5.3. (Hall, 1999) szoftverrel. Az nrITS esetében nem figyeltünk meg paralógiára utaló dupla csúcsokat, így a haplotípusok szétválogatásától ebben az esetben eltekintettünk. A plasztisz lókuszokat (*trnL-trnF* és *rpl32-trnL*), mivel kapcsolatosan öröklődnek (Mogensen, 1996), a nagyobb számú, egy elemzésbe bevonható polimorf karakterek érdekében összefűztük. A kis genetikai különbségek miatt a nukleotid szubsztitúciós modelleken alapuló rekonstrukció megbízhatatlan lehet, mivel az egyes paraméterek becsléséhez kevés adatt áll rendelkezésre. Ezért a részletes struktúra feltárása érdekében parszimónia alapú haplotípushálózatot (Templeton, 1992) rekonstruáltunk a TCS v.1.21 (Clement és mtsai., 2000) szoftver segítségével, amely egy gyökértelen hálózatot eredményez és megengedi a haplotípusok közti retikulációt. A TCS képes az inzerciókat és deléciókat (indel karakterek vagy "gap") hiányzó adatként és ötödik karakter állapotként (5<sup>th</sup> state) kezelni. Az indelek jelenléte/hiánya filogenetikai információt hordozhat magában, azonban ötödik karakter állapotként történő figyelembe vételük csökkentheti az elemzések megbízhatóságát (Marquínez és mtsai., 2009). A Simmons és Ochoterena (2000) által bemutatott kódolásuk viszont növelheti a filogenetikai felbontást (Marquínez és mtsai., 2009). Ebben az esetben az indelek kódolását Simmons és Ochoterena (2000) irányelvei alapján SeqState v.1.4.1 (Müller, 2005) szoftverrel végeztük és a TCS v.1.21 elemzések során tranzíciókként vettük figyelembe. Külcsoportként a közelrokon (Mast és mtsai., 2001, Schmidt-Lebuhn és mtsai., 2012) *Primula veris* L. két mintáját használtuk fel. Az nrITS-ben felmerülő rekombináció lehetőségét a SplitsTree v.4.14.4 (Huson & Bryant, 2006) programban elérhető PHI teszttel (Bruen és mtsai., 2006) ellenőriztük. Az egyes nrITS ribotípusok filogenetikai hálózatát („NeighborNet”) szintén a SplitsTree v.4.14.4 segítségével rekonstruáltuk az 'uncorrected p' genetikai távolság alapján.

### 2.3.3 Eredmények

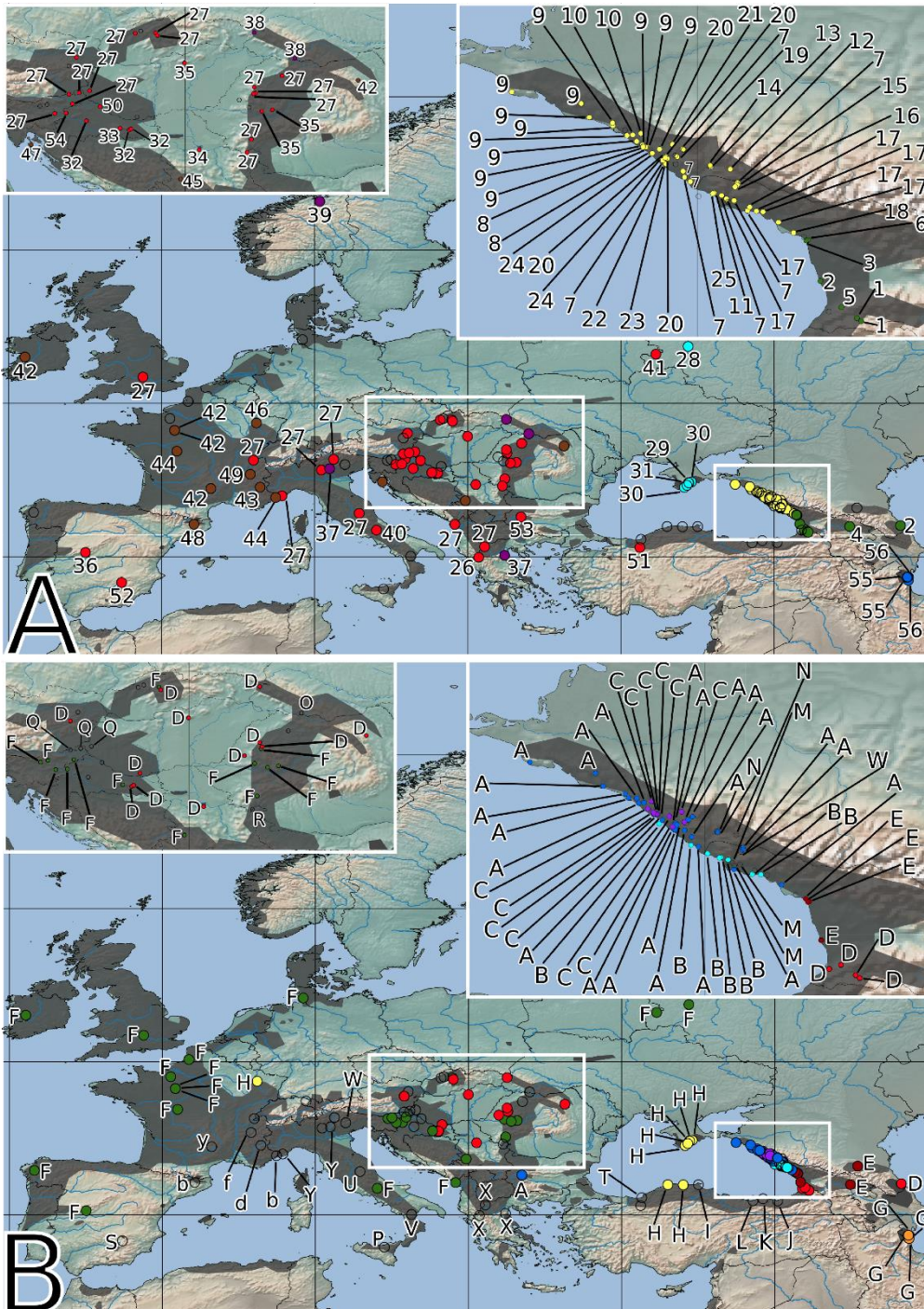
Az illesztett plasztisz adatsor (*trnL-trnF* + *rpl32-trnL*) 1380 bázispárból állt és 49 polimorf pozíciót tartalmazott, amiből 25 bizonyult informatívnak. Az összesen 14 azonosított indel karakter közül valamennyi informatívnak mutatkozott. Elemzésünk összesen 58 haplotípust azonosított, amelyet öt haplocsoportba soroltunk (**9.A ábra**, **10.A ábra**). A haplocsoportok között legalább három hipotetikus (nem mintázott) haplotípus helyezkedett el. Két haplotípus a külcsoport *Primula veris*hez tartozott és az egyes haplocsoportba soroltuk. A kettes haplocsoportba a Kolhisz régió és a Kaukázus mintái tartoztak. A hármas haplocsoport viszonylag komplexebb struktúrát alkotott és a Fekete-tenger partvidékéről származó minták voltak ide sorolhatóak. A négyes haplocsoport csillag alakú struktúrát mutatott és Európa-szerte felfedezhetőek az ide tartozó minták. A legnagyobb frekvenciájú 27-es haplotípus Közép- és Dél-Európában elterjedt, számos ebből leágazó haplotípus Nyugat- és Dél-Európa térségére jellemző. A 28-31-es haplotípusok mintái, amelyek a Krím-félszigetről származnak egy különálló csoportot alkottak. A 42-49-es haplotípusok hasonló módon különültek el és főként nyugat-európai populációkra jellemzőek, kivéve egy horvátországi és egy Kelet-Kárpátokból származó mintát. Az ötös haplocsoport két haplotípusból állt és kizárólag a Hirkán-erdők populációira volt jellemző.

Az nrITS szekvencia mátrix 647 illesztett pozíciót tartalmazott, amiből 47 volt variábilis és 29 informatív. A lókuszon összesen négy egyedi indel karaktert fedeztünk fel. A PHI teszt nem valószínűsített múltbeli rekombinációs eseményt ( $p = 0,84$ ). A TCS elemzés összesen 30 ribotípust azonosított, amelyből egy tartozott a külcsoport *Primula veris*-hez (**9.B ábra**, **10.B ábra**). A hálózat csillagszerű struktúrát mutatott, a legtöbb ribotípus néhány hipotetikus haplotípuson át kapcsolódott, vagy közvetlenül csatlakozott a központi D ribotípushoz, amelyet csak Kolhisz és Kaukázus térségében, valamint a Kárpát-medencén belül fedeztünk fel. A legelterjedtebb F ribotípus Európa nagy részén megtalálható, az ebből hipotetikus

haplotípusok közbeiktatása nélkül levezethető ribotípusok (b, f, y, X, Y, U, W) az Appeninek és a Balkán-félsziget populációban voltak fellelhetőek. A D ribotípusból leágazó V ribotípus csak egyetlen olaszországi populációban volt megtalálható, amelyből levezethető volt a kizárólag a Hirkán-erdőkre jellemző G ribotípus, valamint a főleg a Krím-félszigetre és Törökországra jellemző H és I ribotípusok. Öt ribotípus (A, B, C, M, N) a Fekete-tenger északkeleti partján volt azonosítható, míg egy másik csoport (K, J, L) Kelet-Törökországban volt felfedezhető. A H ribotípus a Krím-félsziget és Törökország térségén kívül Kelet-Franciaországban volt megtalálható, míg az A ribotípus a Fekete-tenger partvidékétől eltekintve egy bulgáriai populációban fordult elő. A központi D ribotípus további szatellit ribotípusai szétszórtan voltak fellelhetőek az elterjedési területen: a Nyugat-Kárpátokból származó R ribotípus egy ibériai S-ribotípushoz kapcsolódott, a T ribotípust Törökország északnyugati részén, a Q ribotípust a keleti Alpokban, a P ribotípust egyetlen szicíliai populációban, az O ribotípust a Keleti-Kárpátokban, az E ribotípust a Közép-Kaukázusban és a Fekete-tenger keleti partvidékén azonosítottuk.

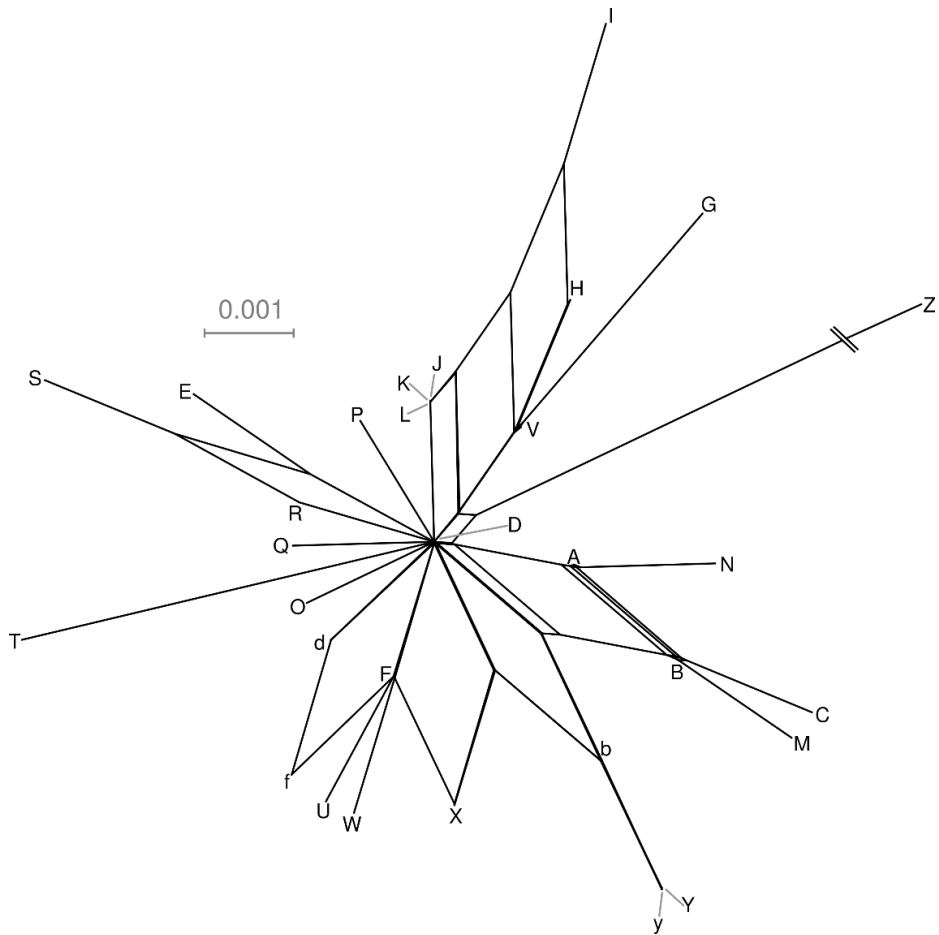


**9. ábra** A haplotípushálózat rekonstrukció által feltárt viszony a *Primula vulgaris* plasztisz haplotípusai (A) és nrITS (B) ribotípusai között. Az eltérő színnel felüntetett haplocsoportok és ribotípusok megfelelnek a **10. ábrán** alkalmazott színezésnek.



**10. ábra** A *Primula vulgaris* feltárt plaztisz haplotípusainak (A) és nrITS ribotípusainak (B) földrajzi eloszlása. Az eltérő haplocsoportokat és ribotípusokat jelölő színek megfelelnek a 9. ábrán feltüntetett színeknek.

A ribotípusok elhelyezése a „NeighborNet” hálózaton (**11. ábra**) jól átfed a TCS v.1.21 ribotípushálózat topológiájával (**9.B ábra**), kivéve az E ribotípus helyzetét. A D ribotípust a *Primula vulgaris* központi ribotípusaként azonosítottuk. A külcsoport *Primula veris* (Z ribotípus) jelentősebb genetikai távolságra található a belcsoporttól. A hálózat általánosságban csillag alakú struktúrát mutatott. A Krímből és Nyugat-Törökországból származó ribotípusok (H, I) hurkokon keresztül kapcsolódnak más, a Fekete-tenger délnyugati partvidékén azonosított ribotípusokhoz (J, K, L). Ugyanez a jelenség figyelhető meg a Fekete-tenger keleti partvidékén is, mivel az A, B, C, M, N ribotípusok hasonló módon kapcsolódnak egymáshoz. Az Appennineken, a Balkánon és az Alpokban azonosított ribotípusok (b, f, y, X, Y, U, W, d) szintén hurkokon keresztül kapcsolódnak, amelyek közül néhány a TCS-hálózaton is megfigyelhető (**9.B ábra**). A TCS v.1.21 ribotípushálózattal ellentétben az E ribotípus valószínű retikulációt mutat az S és R ribotípusokkal, valamint a J, K, L ribotípusok a Fekete-tenger partvidékére jellemző egyéb ribotípusokkal.



**11. ábra** A *Primula vulgaris* nrITS szekvenciái alapján feltárt filogenetikai hálózat („NeighborNet”). Az egyes minták közti genetikai távolság arányos az eltérő pozíciók számával az illesztésben, a „doboz-szerű” (Bryant & Moulton, 2004) struktúrák retikulációs eseményekre és filogenetikai bizonytalanságra utalhatnak.

#### 2.3.4. Diszkusszió

A *Primula vulgaris* filogeográfiai struktúráját egy sejtmagi és két plasztisz lókuszt alapján vizsgáltuk. A tapasztalt alacsony diverzitás miatt eredményeink nem teszik lehetővé a kisebb léptékű diverzitás feltárását, ami összhangban van más szerzők eredményeivel, akik szintén alacsony genetikai differenciációt figyeltek meg a nemzetségben (Schmidt-Lebuhn és mtsai., 2012). Ennek ellenére, a hipotetikus evolúciós történet leírható a két adatsor független elemzése után. A csekély genetikai differenciáció miatti bizonytalanságot a jövőben feloldhatja a genomi módszerek, mint például a RADSeq, használata (Sramkó és mtsai., 2019b; Twyford & Ennos, 2012; Andrews és mtsai., 2016). A „NeighborNet” elemzés által feltárt csillagszerű struktúra utalhat gyors expanzióra, amely esetben szintén célszerű a genomi módszerek használata a jóval nagyobb számú rekombinálódó egység feltárása miatt. A genomi megközelítésű módszerek használata képes lehet megerősíteni, illetve árnyalni a következőkben, az nrITS és a plasztisz (*rpl32-trnL* + *trnL-trnF*) lókusztok alapján, felvetett hipotetikus kolonizációs útvonalakat és a refúgiális területek pontos elhelyezkedését. Habár mind az anyai öröklődésű plasztisz haplotípusok és a biparentálisan öröklődő nrITS ribotípusok társíthatóak voltak adott genetikai klaszterre jellemző földrajzi régiókkal, azok független elemzése nem mutatott teljes mértékben egybehangzó képet. Az nrITS elemzése felfedett két olyan populációt, amely a régióra nem jellemző ribotípust hordozott (a H ribotípus Franciaországban és az A ribotípus Bulgáriában). Mindkét populáció lakott terület közelében található, ahol a különböző *Primula* fajok kertészeti fajtáit dísznövényként ültetik, amelyek pontos eredete nem ismert. A *Primula vulgaris* rovarok által beporzott faj és a heterosztília segítségével törekszik a keresztbeporzásra (Jacquemyn és mtsai. 2009). Mivel nem kizárható, hogy ezen ribotípusok eredete a területen egy dísznövényként ültetett növényre, mint pollendonorra vezethető vissza, az eredmények értelmezésénél ezeket nem vettük figyelembe. A diszkordancia a két adatsor független elemzése közt magyarázható a sejtmag és az organelláris genom eltérő molekuláris

evolúciójával is. A diploid nrITS effektív populációmérete négyszerese a plasztisz genoménak, ami növeli az ősi allélok differenciációjához szükséges időt ('coalescent time'), így növelve az esélyt a közös ősi polimorfizmusok felfedezésére (Schaal és mtsai., 2000). Másképpen a leszármazási sorok leválogatódásához több idő kell a sejtmagi lókuszok esetében, így habár valószínűsíthető a közös ősi polimorfizmus, ennek megerősítése célszerű lehet más sejtmagi markerek által is. Az értelmezést tovább nehezítheti, hogy valószínűleg több, egymástól független kolonizációs hullám lenyomatát is felfedezhetjük adatsorunkban, amelyeket lehetetlen elkülöníteni egymástól.

A Kolhisz régióra jellemző D ribotípus és II-es haplocsoport összekapcsolása a külcsoporttal a ribotípushálózaton utalhat arra, hogy ez lehetett a faj ősi elterjedési területe, ahonnan a növény képes lehetett a nyugati elterjedési kezdeti kolonizációjára. Ez a feltételezés összhangban van a korábbi tanulmányokkal, amelyek kiemelik a Kolhisz szerepét az endemikus leszármazási ágak megőrzésében (Christe és mtsai., 2014; Grimm & Denk, 2014). A Hirkán-erdők mintáinak elkülönülése támogatja Tarkhnishvili és mtsai. (2012) és Christe és mtsai. (2014) megfigyeléseit, akik a régió endemikus leszármazási ágainak eredetét Kaszpi-medence déli területével azonosították. A III-as haplocsoport és az A,B,C,M,N ribotípusok kizárólagos jelenléte a Fekete-tenger északi partvidékén a Kolhisz régióból nyugat felé irányuló kolonizációra utalhat, ahogy azt Volkova és mtsai. (2013) is valószínűsítette. A haplotípushálózat komplex szerkezete ezen a területen hosszú *in situ* fennmaradásra utal, valószínűleg átvészelve legalább az utolsó glaciális maximumot (LGM), összhangban a korábbi éghajlati rekonstrukciókkal (Tarkhnishvili és mtsai., 2012). Európa kezdeti kolonizációja valószínűleg e keleti területek egyikéből következett be, bár a pontos forráspopulációt nem tudtuk azonosítani. A IV-es haplocsoport csillagszerű struktúrája evolúciós léptékben közelmúltbeli expanzióra utal, itt a részletesebb mintázatok a felbontás hiánya és a valószínű nem teljes leválogatódás ('incomplete lineage sorting') miatt nem értelmezhetőek pontosan. Az F ribotípus széles elterjedése hasonló folyamatokról árulkodik.

Azonban a dél-európai félszigetek mindegyike rendelkezik endemikus ribo-, és haplotípusokkal, ami az általánosan elfogadott dél-európai refúgiumok elméletének megfelel (Hewitt, 2000) és lehettek olyan leszármazási ágak, amelyek helyi adaptációjuk miatt nem voltak képesek északi irányba történő kolonizációra (Hampe & Petit, 2005). Amennyiben elfogadjuk, hogy a D lehet a *Primula vulgaris* ősi ribotípusa, jelenléte a Kárpát-medencében a faj hosszabb távú fennmaradását jelentheti a régióban. Ebben az esetben a keleti ária plasztisz haplotípusaitól jól elkülönülő haplotípusok a Kárpát-medencében a kisebb effektív populációméret miatt akár egy fiatalabb kolonizációról is tanúskodhatnak. Az összehangolt evolúció miatt (Álvarez & Wendel, 2003; Bailey és mtsai., 2003) az is elképzelhető azonban, hogy az nrITS nem tükrözi teljes mértékben a filogeográfiai történetet, így a D ribotípus jelenléte a régióban és az F ribotípus széles elterjedése lehet csupán a marker molekuláris evolúciójának következménye is. Mindkét esetben feltűnő, hogy a D ribotípus a Kaukázus térségén kívül csak a Kárpát-medencében van jelen, amely eredetének pontos feltárása fontos információkkal szolgálhat a *P. vulgaris* evolúciós története és a Kárpát-medence biogeográfiai jelentősége szempontjából.

Általánosságban ezt a mintázatot értelmezhetjük egy kelet-nyugati irányú kezdeti kolonizáció bizonyítakaként, aminek valószínű forrása a Kolhisz régió vagy a Fekete-tenger északi partvidéke lehetett. Habár a faj európai refúgiumainak elhelyezkedésére csak indirekt módon tudunk következtetni, a felvázolt filogeográfiai történet összhangban van a korábbi tanulmányokkal, amelyek a Kárpátokat mezofil igényű növények fontos refúgiumának találták (pl. Trewick és mtsai., 2002; Gömöry és mtsai., 2003; Magri és mtsai., 2006; Feurdean és mtsai., 2007 ; Bartha és mtsai., 2015; Mráz & Roniker, 2016). A *Cervus capreolus* filogeográfiai viszonyait feldolgozó tanulmány az itt felvázoltakhoz nagyon hasonló kolonizációs útvonalakat írt le és a refugiális területek közel azonos helyzetét valószínűsíti (Sommer és mtsai., 2009), ami azt jelzi, az itt felvázolt filogeográfiai történet akár

szélesebb taxonómiai spektrumon is valószínűsíthető és nem csak mezofil növényfajokra lehet érvényes.

### 3. Összefoglalás

Dolgozatomban molekuláris filogenetikai eszközök használatával három esettanulmányon keresztül tettem kísérletet a Kárpát-medence filogeográfiai történetének és nagyobb léptékű jelentőségének megértésére. Két esettanulmány szűk elterjedésű, endemikus taxonok és közelpopulációk filogenetikai viszonyát és a leszármazási ágak izolációjának idejét vizsgálta elterjedési területük elhelyezkedése fényében. A harmadik esettanulmány egy jóval szélesebb elterjedésű, Európa-szerte előforduló faj filogeográfiai egységeit tárta fel.

A *Nymphaea lotus* afrikai elterjedésű trópusi és szubtrópusi tündérrózsa faj. Egyedüli előfordulása Európában a Püspökfürdő melletti meleg vízű forrásoknak köszönhető. A populáció *Nymphaea lotus* var. *thermalis*ként ismert és behurcolt illetve őshonos eredete a botanika csaknem 200 éve vitatott kérdése. A taxon eredetét molekuláris filogenetikai módszerekkel vizsgáltuk. Megbecsültük az egyes leszármazási ágak izolációjának idejét és a közelpopuláció taxonokra jellemző speciációs rátát. A *Nymphaea lotus* var. *thermalis*-t filogeográfiai kontextusba helyeztük összehasonlítva a *Nymphaea lotus* s.s. afrikai elterjedési területéről származó mintákkal. A sejtmagi (nrITS) és plazmid szekvenciák vizsgálata Afrika nyugati részén feltárt egy különálló leszármazási ágot, amelyet a *Nymphaea zenkeri*vel azonosítottunk. A *Lotos* alnemzetségben belül a *Nymphaea lotus* és testvérfaja, a *Nymphaea zenkeri* elválását fiatalabbnak találtuk, mint a földtörténeti harmadkor végét. Az összes vizsgált minta elkülöníthető volt genetikailag, kivéve a *N. lotus* var. *thermalis* és az egyiptomi populáció. Habár a püspökfürdői populáció pontos eredetét az alkalmazott módszerek nem képesek feltárni, eredményeink egyértelműen cáfolják a *N. lotus* var. *thermalis* harmadkori reliktum státuszát. A növényre továbbra is tekinthetünk „kultúrreliktumként” ritka és egyedi előfordulása miatt, mint Európa flórájának érdekes színfoltja.

A második esettanulmány a Délkelet-Kárpátok endemikus fájának, a *Hepatica transsilvanica*nak az eredetét vizsgálta. A korábbi kariológiai eredmények a faj hibrid eredetére utalnak, legvalószínűbb szülőfajai a Közép-Ázsiában őshonos *Hepatica falconeri* és az Európa-szerte elterjedt *Hepatica nobilis* lehettek. Bár a *H. falconeri* hibrid eredete ismert, a hibridizáció időpontját nem ismerjük. Két sejtmagi és két plaztisz marker szekvenciái alapján rekonstruáltuk a lókuszon koaleszcenciaidejét. A feltételezett szülőfajok kiléte megerősíthető volt a különböző öröklődésű DNS szakaszok alapján rekonstruált génfák ellentmondó topológiája alapján. Továbbá, egy a sejtmagban kis kópiaszámban jelen lévő gén szekvenciáiban felfedeztünk mindkét szülőfajra jellemző kópiákat. A leszármazási ágak koaleszcenciaidejének becslése támogatta a *H. transsilvanica* hosszú távú túlélését a Kárpátokban, mivel a hibrid és a szülőfajok közös őse a pliocén / pleisztocén átmenet környékén létezhetett. A faj refúgiuma valószínűleg a meszes alapkőzettel és heterogén élőhelytípusok hosszú távú meglétével függ össze. Eredményeink kiemelik a Délkelet-Kárpátok biogeográfiai jelentőségét egyes leszármazási ágak hosszú távú megőrzésében.

A harmadik esettanulmány egy Európa-szerte elterjedt mezofil faj, a *Primula vulgaris* filogeográfiai struktúráját mutatja be. A dél-európai refúgiumok jelentősége a kontinens posztglaciális rekolonizációjában jól ismert. Korábbi eredmények alapján nagy genetikai változatosság fedezhető fel a Kolhisz és a Fekete-tenger partvidékének populációiban, ami felveti a régió esetleges refugiális szerepét. Molekuláris filogenetikai módszerekkel a *P. vulgaris* teljes elterjedési területéről származó minták alapján vizsgáltuk a faj filogeográfiai struktúráját európai léptékben. A sejtmagi és plaztisz DNS lókuszon is alacsony genetikai differenciációt detektáltunk, amiből kizárólag indirekt módon következtettünk a faj filogeográfiai történetére. Mivel a kulcsoport ( *Primula veris* ) legközelebb a Kolhisz régió populáció állnak genetikailag, ez a régió valószínűsíthető a faj ősi elterjedési területének, ami potenciálisan lehetett Európa kezdeti kolonizációjának forrása. A Kárpát-medencei populációk közös polimorfizmusa a Kolhisz régióval utalhat arra,

hogy a *P. vulgaris* a dél-európai refúgiumokon kívül fennmaradhatott a Kárpát-medencében, ami kriptikus északi (extramediterrán) refúgiumként szolgálhatott a faj számára, azonban a hipotézist csupán a feltételezett ősi nrITS ribotípusok jelenléte támogatja a régióban.

Az itt bemutatott eredmények habár cáfolják a (szub)trópusi elterjedésű *Nymphaea lotus* harmadkori reliktum eredetét Európában, a *Hepatica transsilvanica* bizonyítható harmadkori eredete és a *Primula vulgaris* valószínűsíthető hosszú távú fennmaradása a Kárpát-medencében a régió nagy jelentőségére engednek következtetni a mezofil fajok endemikus leszármazási ágainak megőrzésében.

## 4. Summary

In my dissertation, I used a molecular phylogenetic approach to study the phylogeographic history and larger-scale significance of the Carpathian Basin through three case studies. Two case studies examined the divergence time of narrowly distributed, endemic taxa to the Carpathian Basin. The third case study explored the phylogeographic units of a much more widespread species occurring across Europe.

*Nymphaea lotus* is a (sub)tropical species of waterlilies distributed throughout Africa. There is a unique occurrence in Europe that is associated with the hot springs near the Püspökfürdő. The population is known as *Nymphaea lotus* var. *thermalis*, which' introduced or native Tertiary origin has been a subject of debate among botanist for almost 200 years. The origin of this taxon was investigated by molecular phylogenetic methods. We estimated the divergence time of lineages and the speciation rate characteristic to subgenus *Lotos*. *Nymphaea lotus* var. *thermalis* was placed in a phylogeographic context by comparing to *Nymphaea lotus* s.s. with samples from the entire distribution range. The nrITS and plastid sequences revealed a distinct lineage in W Africa that we associated with *Nymphaea zenkeri*. Within the subgenus *Lotos*, the separation of *Nymphaea lotus* and its sister species, *Nymphaea zenkeri*, was found to be younger than the end of Tertiary. All population could be separated by haplotype network reconstruction except *N. lotus* var. *thermalis* and the Egyptian population. Although the exact origin of the only European population could not be revealed, our results unequivocally refute the Tertiary relict nature of *N. lotus* var. *thermalis*. The plant can be considered a „cultural relict” due to its rare and unique occurrence in Europe.

The second case study examined the origin of *Hepatica transsilvanica*, an endemic species to the South-Eastern Carpathians. Previous cariological results suggest the hybrid origin of the species. The most likely parental species of *H. transsilvanica* are *Hepatica falconeri*, that is native to central Asia and a

European species with wide distribution area, *Hepatica nobilis*. Although the hybrid origin of *H. falconeri* is well studied, the time of hybridization was never investigated. We reconstructed the divergence time between *H. transsilvanica* and its parental species by the independent analysis of both nuclear and plastid genome sequences. The identity of the putative parent species could be confirmed by the conflicting topology of gene trees reconstructed from differently inherited DNA regions. Furthermore, copies of both parental species could be identified in the sequences of a low copy nuclear gene. Coalescent time estimation of the lineages supported the long-term survival of *H. transsilvanica* in the Carpathians, as the most recent common ancestor of the hybrid and its parental species may have existed around the Pliocene / Pleistocene transition. The refugium of the species could be associated with calcareous bedrock and the long-term existence of heterogeneous habitat types in the area. Our results highlight the biogeographic significance of the Southeastern Carpathians in the long-term conservation of certain mesophilous lineages.

The third case study presents the phylogeographic structure of *Primula vulgaris*, a mesophilous species distributed throughout Europe. The importance of Southern European refugia in the postglacial recolonization of the continent is well known. Based on previous results, high genetic diversity can be found in the populations of the Colchis and the Black Sea coast area, raising the potential refugial role of the region. We used a molecular phylogenetic approach to examine the phylogeographic structure of this species. Evaluation of the independent analyses of the nuclear and plastid DNA loci helped us to draw some conclusions on the phylogeography of a species. As the populations of the Colchis region are genetically the closest to the outgroup (*Primula veris*), this region could be considered to be the ancient area of the species, which served as a source of the initial colonization of Europe. Based on the presumably shared ancestral polymorphism of the Colchis region and the Carpathian Basin, *P. vulgaris* may have survived the Quaternary

glaciations in the Carpathians, although this is supported only by the presence of the presumably ancient ribotype of *P. vulgaris* in the Carpathian Basin.

Although the results presented here refute the Tertiary origin of the (sub)tropical *Nymphaea lotus* in Europe, the Tertiary origin of *Hepatica transsilvanica* and the potential long-term survival of *Primula vulgaris* in the Carpathian Basin confirm the role of the region in the preservation of endemic lineages of mesophilic species.

## **5. Köszönetnyilvánítás**

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

## 6. Irodalomjegyzék

- Álvarez, I. J. F. W., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417-434.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81.
- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J. F., Dessimoz, C., & Gascuel, O. (2011). Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology*, 60(5), 685-699.
- Arbogast, B. S. (2001). Phylogeography: the history and formation of species. *American Zoologist*, 41(1), 134-135.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489-522.
- Bailey, C. D., Carr, T. G., Harris, S. A., & Hughes, C. E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 435-455.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., & Donoghue, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82, 247-277.
- Bartha, L., Macalik, K., & Keresztes, L. (2014). Molecular evidence for the hybrid origin of *Hepatica transsilvanica* (Ranunculaceae) based on nuclear gene sequences. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia*, 59(1), 55-62.
- Bartha, L., Sramkó, G., Volkova, P. A., Surina, B., Ivanov, A. L., & Banciu, H. L. (2015). Patterns of plastid DNA differentiation in *Erythronium* (Liliaceae) are consistent with allopatric lineage divergence in Europe across longitude and latitude. *Plant Systematics and Evolution*, 301(6), 1747-1758.
- Bhagwat, S. A., & Willis, K. J. (2008). Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits?. *Journal of Biogeography*, 35(3), 464-482.
- Borbás, V., 1894. A hévízi tündérrózsa keletkezésének analogonja. *Természettudományi Közlöny* 26, 146-152.
- Borsch, T., Hilu, K. W., Wiersema, J. H., Löhne, C., Barthlott, W., & Wilde, V. (2007). Phylogeny of *Nymphaea* (Nymphaeaceae): evidence from substitutions and microstructural changes in the chloroplast *trnT-trnF* region. *International Journal of Plant Sciences*, 168(5), 639-671.
- Borsch, T., Löhne, C., & Wiersema, J. (2008). Phylogeny and evolutionary patterns in Nymphaeales: integrating genes, genomes and morphology. *Taxon*, 57(4), 1052-4E.
- Borsch, T., Löhne, C., Mbaye, M. S., & Wiersema, J. (2011). Towards a complete species tree of *Nymphaea*: shedding further light on subg. *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. *Telopea*, 13(1/2), 193-217.
- Borsch, T., Wiersema, J. H., Hellquist, C. B., Löhne, C., & Govers, K. (2014). Speciation in North American water lilies: evidence for the hybrid origin of the newly discovered Canadian endemic *Nymphaea loriana* sp. nov. (Nymphaeaceae) in a past contact zone. *Botany*, 92(12), 867-882.
- Bouckaert, R. R., & Drummond, A. J. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1-11.

- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, *10*(4), e1003537.
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., Maio, N. D., Matschner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., ... Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, *15*(4), e1006650.
- Bromham, L., & Penny, D. (2003). The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics*, *4*(3), 216-224.
- Bruen, T. C., Philippe, H., & Bryant, D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics*, *172*(4), 2665-2681.
- Brundin, L. (1965). On the real nature of transantarctic relationships. *Evolution*, *19*, 496-505.
- Brusina, S., 1902. Eine subtropische Oasis in Ungarn. *Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark* *28*, 101-121.
- Bryant, D., & Moulton, V. (2004). Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(2), 255-265.
- Christe, C., Kozłowski, G., Frey, D., Bétrisey, S., Maharramova, E., Garfi, G., ... & Naciri, Y. (2014). Footprints of past intensive diversification and structuring in the genus *Zelkova* (Ulmaceae) in south-western Eurasia. *Journal of Biogeography*, *41*(6), 1081-1093.
- Clausen, P., Nolet, B. A., Fox, A. D., & Klaassen, M. (2002). Long-distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe—a critical review of possibilities and limitations. *Acta Oecologica*, *23*(3), 191-203.
- Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, *9*(10), 1657-1659.
- Conard, H. S., 1905. The waterlilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. Washington, Carnegie Institution of Washington
- Daneck, H., Abraham, V., Fer, T., & Marhold, K. (2011). Phylogeography of *Lonicera nigra* in Central Europe inferred from molecular and pollen evidence. *Preslia*, *83*(2), 237-257.
- Darwin, C. (1859). On the Origin of Species: By Means of Natural Selection Or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, London, John Murray
- Diaconeasa, B., Popa, D. (1964). Problema relictră a Lotusului [*Nymphaea lotus* L. var. *thermalis* (DC.) Tuzs.] și a lacului termal de la Băile 1 Mai, in lumina analizelor microstratigrafice. *Contribuții Botanice* 135-140.
- Dkhar, J., Kumaria, S., Rao, S. R., & Tandon, P. (2010). Molecular phylogenetics and taxonomic reassessment of four Indian representatives of the genus *Nymphaea*. *Aquatic Botany*, *93*(2), 135-139.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, *7*(1), 1-8.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792-1797.
- Feliner, G. N., & Rosselló, J. A. (2007). Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *44*(2), 911-919.
- Feurdean, A., Wohlfarth, B., Björkman, L., Tantau, I., Bennike, O., Willis, K. J., ... & Robertsson, A. M. (2007). The influence of refugial population on Lateglacial and early Holocene vegetational changes in

Romania. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 145(3-4), 305-320.

Flot, J. F. (2010). SeqPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments. *Molecular Ecology Resources*, 10(1), 162-166.

Gömöry, D., Paule, L., Shvadchak, I. M., Popescu, F., Sulkowska, M., Hynek, V., & Longauer, R. (2003). Spatial patterns of the genetic differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) at allozyme loci in the Carpathians and the adjacent regions. *Silvae Genetica*, 52(2), 78-83.

Green, A. J., Figuerola, J., & Sánchez, M. I. (2002). Implications of waterbird ecology for the dispersal of aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23(3), 177-189.

Grimm, G. W., & Denk, T. (2014). The Colchic region as refuge for relict tree lineages: cryptic speciation in field maples. *Turkish Journal of Botany*, 38(6), 1050-1066.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.

Gulyás, G., Sramkó, G., Molnár, V. A., Rudnóy, S., Illyés, Z., Balázs, T., & Bratek, Z. (2005). Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(2), 61-67.

Gültepe, M., Uzuner, U., Coşkunçelebi, K., Beldüz, A. O., & Terzioğlu, S. (2010). Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild *Primula* (Primulaceae) taxa of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 34(3), 147-157.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41) 95-98.

Hampe, A., & Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8(5), 461-467.

Hendrych, R. (1981). Bemerkungen zum Endemismus in der Flora der Tschechoslowakei *Preslia*, 53(2), 97-120.

Hennig, W. (1965). Phylogenetic systematics. *Annual Review of Entomology*, 10(1), 97-116.

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

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

Hewitt, G. M. (2004a). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.

Hewitt, G. M. (2004b). The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1(1), 1-16.

Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., ... & Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 291-301.

Hoot, S. B., Meyer, K. M., & Manning, J. C. (2012). Phylogeny and reclassification of *Anemone* (Ranunculaceae), with an emphasis on austral species. *Systematic Botany*, 37(1), 139-152.

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

Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in

- evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267.
- Jacquemyn, H., Endels, P., Brys, R., Hermy, M., & Woodell, S. R. J. (2009). Biological flora of the British Isles: *Primula vulgaris* Huds. [*P. acaulis* (L.) Hill]. *Journal of Ecology*, 97(4), 812-833.
- Jalas, J., Suominen, J., (Szerk.) (1989). Atlas Flora Europaeae. Vol. 8. Nymphaeaceae to Ranunculaceae. Vanamo, Biological Society of Finland
- Jia, D. R., Abbott, R. J., Liu, T. L., Mao, K. S., Bartish, I. V., & Liu, J. Q. (2012). Out of the Qinghai-Tibet Plateau: Evidence for the origin and dispersal of Eurasian temperate plants from a phylogeographic study of *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae). *New Phytologist*, 194(4), 1123-1133.
- Jiang, N., Zhou, Z., Yang, J. B., Zhang, S. D., Guan, K. Y., Tan, Y. H., & Yu, W. B. (2017). Phylogenetic reassessment of tribe *Anemoneae* (Ranunculaceae): Non-monophyly of *Anemone* s. l. revealed by plastid datasets. *PLoS One*, 12(3), e0174792.
- Камелин [Kamelin], П. В. [R. V.], Овеснов [Ovesnov], С. А. [S. A.], Шилова [Shilova], С. И. [S. I.]. (1999). Неморальные элементы во флорах Урала и Сибири [Nemoral elements in floras of Urals and Siberia]. Издательство Пермского университета [Perm University Press].
- Khedr, A. H. A., & Hegazy, A. K. (1998). Ecology of the rampant weed *Nymphaea lotus* L. Willdenow in natural and ricefield habitats of the Nile delta, Egypt. *Hydrobiologia*, 386(1), 119-129.
- Kim, Y. K., Park, C. W., & Kim, K. J. (2009). Complete chloroplast DNA sequence from a Korean endemic genus, *Megaleranthis saniculifolia*, and its evolutionary implications. *Molecules and Cells*, 27(3), 365.
- Kliment, J., Turis, P., & Janisova, M. (2016). Taxa of vascular plants endemic to the Carpathian Mts. *Preslia*, 88(1), 19-76.
- Коржинский [Korzhinskiĭ], С. И. [S. I.]. (1899). Растительность [Vegetation]. In Энциклопедия Брокгауза и Эфрона [Encyclopaedia of Brokgauz and Efron]. Ф. А. Брокгауз – И. А. Эфрон [F. A. Brokgauz – I. A. Efron].
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452.
- Kovács J. A. (2019) Székelykeresztúr vidékének növényzeti öröksége, Barót, Tortoma Könyvkiadó
- Kramp, K., Huck, S., Niketić, M., Tomović, G., & Schmitt, T. (2009). Multiple glacial refugia and complex postglacial range shifts of the obligatory woodland plant *Polygonatum verticillatum* (Convallariaceae). *Plant Biology*, 11(3), 392-404.
- Lefort, V., Longueville, J. E., & Gascuel, O. (2017). SMS: Smart model selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), 2422-2424.
- Lendvay, B., Kadereit, J. W., Westberg, E., Cornejo, C., Pedryc, A., & Höhn, M. (2016). Phylogeography of *Syringa josikaea* (Oleaceae): Early Pleistocene divergence from east Asian relatives and survival in small populations in the Carpathians. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 689-703.
- Liu, H., He, J., Ding, C., Lyu, R., Pei, L., Cheng, J., & Xie, L. (2018). Comparative analysis of complete chloroplast genomes of *Anemoclema*, *Anemone*, *Pulsatilla*, and *Hepatica* revealing structural variations among genera in tribe *Anemoneae* (Ranunculaceae). *Frontiers in Plant Science*, 9, 1097.
- Löhne, C., Yoo, M.J., Borsch, T., Wiersema, J., Wilde, V., Bell, C.D., Barthlott, W., Soltis, D.E., Soltis, P.S., (2008a). Biogeography of Nymphaeales: Extant patterns and historical events. *Taxon*, 57(4), 1123-1146.
- Löhne, C., Borsch, T., Jacobs, S. W., Hellquist, C. B., & Wiersema, J. H. (2008b). Nuclear and plastid DNA sequences reveal complex reticulate patterns in Australian water-lilies (*Nymphaea* subgenus *Anecphyra*,

- Nymphaeaceae). *Australian Systematic Botany*, 21(4), 229-250.
- Magri, D., Vendramin, G. G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D., Latałowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J. M., Tantau, I., Knaap, W. O., Petit, R. J., & Beaulieu, J. L. (2006). A new scenario for the quaternary history of European beech populations: Palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist*, 171(1), 199-221.
- Manafzadeh, S., Salvo, G., & Conti, E. (2014). A tale of migrations from east to west: The Irano-Turanian floristic region as a source of Mediterranean xerophytes. *Journal of Biogeography*, 41(2), 366-379.
- Marquinez, X., Lohmann, L. G., Salatino, M. L. F., Salatino, A., & González, F. (2009). Generic relationships and dating of lineages in Winteraceae based on nuclear (ITS) and plastid (*rpS16* and *psbA-trnH*) sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(2), 435-449.
- Mast, A. R., Kelso, S., Richards, A. J., Lang, D. J., Feller, D. M., & Conti, E. (2001). Phylogenetic relationships in *Primula* L. and related genera (Primulaceae) based on noncoding chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences*, 162(6), 1381-1400.
- Meusel, W., Jäger, E., & Weinert, E. (1965). Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora, Jena, Gustav Fischer.
- Michl, T., Huck, S., Schmitt, T., Liebrich, A., Haase, P., & Büdel, B. (2010). The molecular population structure of the tall forb *Cicerbita alpina* (Asteraceae) supports the idea of cryptic glacial refugia in Central Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(2), 142-154.
- Mogensen, H. L. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*, 83(3), 383-404.
- Moore, B. R., Höhna, S., May, M. R., Rannala, B. & Huelsenbeck, J. (2016). Critically evaluating the theory and performance of Bayesian analysis of macroevolutionary mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(34), 9569-9574.
- Mosolygó-Lukács, A., Sramkó, G., Barabás, S., Czeglédi, L., Jávör, A., Molnár V., A., & Surányi, G. (2016). Molecular genetic evidence for allotetraploid hybrid speciation in the genus *Crocus* L. (Iridaceae). *Phytotaxa*, 258(2), 121-136.
- Mráz, P., & Ronikier, M. (2016). Biogeography of the Carpathians: Evolutionary and spatial facets of biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 528-559.
- Müller, K. (2005). SeqState – Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics*, 4, 65-69.
- Negrean, G. (2011). Addenda to „Flora Romaniæ” volumes 1–12. Newly published plants, nomenclature, taxonomy, chorology and commentaries. *Kanitzia* 18, 89-194.
- Palme, A. E., Su, Q., Rautenberg, A., Manni, F., & Lascoux, M. (2003). Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. *Molecular Ecology*, 12(1), 201-212.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420.
- Pax, F. (1905). Die fossile Flora von Gánócz bei Poprád. *Növénytani Közlemények*, 4, 19-59.
- Pfossor, M., Sun, B. Y., Stuessy, T. F., Jang, C. G., Guo, Y. P., Taejin, K., Hwan, K. C., Kato, H., & Sugawara, T. (2011). Phylogeny of *Hepatica* (Ranunculaceae) and origin of *Hepatica maxima* Nakai endemic to Ullung Island, Korea. *Stapfia*, 95, 16-27.
- Pop, E. (1976). Specii relictive în flora României. In: Beldie, A., Morariu, I. (szerk.): Flora Republicae Socialisticae României, Vol. 13. Editio *Academiae Republicae Socialisticae Romania*, 106-111.
- Provan, J., & Bennett, K. D. (2008). Phylogeographic insights into cryptic

glacial refugia. *Trends in Ecology Evolution*, 23(10), 564-571.

Pyhäjärvi, T., Salmela, M. J., & Savolainen, O. (2008). Colonization routes of *Pinus sylvestris* inferred from distribution of mitochondrial DNA variation. *Tree Genetics and Genomes*, 4(2), 247-254.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria, <https://www.R-project.org>

Rabosky, D. L. (2014). Automatic detection of key innovations, rate shifts, and diversity-dependence on phylogenetic trees. *PloS One*, 9(2), e89543.

Rabosky, D. L., Grudler, M., Anderson, C., Title, P., Shi, J. J., Brown, J. W., ... & Larson, J. G. (2014). BAMM tools: an R package for the analysis of evolutionary dynamics on phylogenetic trees. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 701-707.

Rabosky, D. L., Mitchell, J. S., & Chang, J. (2017). Is BAMM flawed? Theoretical and practical concerns in the analysis of multi-rate diversification models. *Systematic Biology*, 66(4), 477-498.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901.

Richter, A. (1897). A nílusi tündérrózsa, avagy ál-lótusz a Magyar flórában. *Természetrázi Füzetek*, 20, 204-221.

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

Russel, P. M., Brewer, B. J., Klaere, S., & Bouckaert, R. (2018). Model selection and parameter inference in phylogenetics using nested sampling. *Systematic Biology*, 68(2), 219-233.

Sang, T. (2002). Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), 121-147.

Sang, T., Crawford, D. J., & Stuessy, T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84(8), 1120-1136.

Sauquet, H. (2013). A practical guide to molecular dating. *Comptes Rendus Palevol*, 12(6), 355-367.

Schaal B. A, Olsen K. M. (2000). Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(13), 7024-7029

Schmidt-Lebuhn, A. N., Vos, J. M., Keller, B., & Conti, E. (2012). Phylogenetic analysis of *Primula* section *Primula* reveals rampant non-monophyly among morphologically distinct species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 23-34.

Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., ... & Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1), 142-166.

Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275-288.

Simmons, M. P., & Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 49(2), 369-381.

Sírbu, I., & Sárkány-Kiss, A. (2002). Endangered freshwater mollusc species from the eastern tributaries of the Tisa river (Romanian territory). *Tiscia. Monograph Series*, 6, 71-80.

Slovák, M., Kučera, J., Turis, P., & Zozomova-Lihova, J. (2012). Multiple glacial refugia and postglacial

colonization routes inferred for a woodland geophyte, *Cyclamen purpurascens*: Patterns concordant with the Pleistocene history of broadleaved and coniferous tree species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(4), 741-760.

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(9), 1301-1315.

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

Sommer, R. S., Fahlke, J. M., Schmölecke, U., Benecke, N., & Zachos, F. E. (2009). Quaternary history of the European roe deer *Capreolus capreolus*. *Mammal Review*, 39(1), 1-16.

Sramkó, G., Laczkó, L., Volkova, P. A., Bateman, R. M., & Mlinarec, J. (2019a). Evolutionary history of the Pasque-flowers (*Pulsatilla*, Ranunculaceae): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 135, 45-61.

Sramkó, G., Paun, O., Brandrud, M. K., Laczkó, L., Molnár V., A., & Bateman, R. M. (2019b). Iterative allogamy–autogamy transitions drive actual and incipient speciation during the ongoing evolutionary radiation within the orchid genus *Epipactis* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 124(3), 481-497.

Staub, M. (1903). Új bizonyíték a *Nymphaea Lotus* L. magyar honossága mellett. *Növénytani Közlemények*, 2, 1-8.

Stephens, M., & Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *The American Journal of Human Genetics*, 76(3), 449-462.

Stephens, M., Smith, N., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68(4), 978-989.

Stewart, J. R., & Lister, A. M. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(11), 608-613.

Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), vey016.

Sümeği, P., Molnár, D., Sávai, S., & Gulyás, S. (2012a). Malacofauna evolution of the Lake Peța (Püspökfürdő), Oradea region, Romania. *Folia Naturae Bihariae Oradea*, 5, 29.

Sümeği, P., Molnár, D., Sávai, S., & Töviskes, R. J. (2012b). Preliminary radiocarbon dated paleontological and geological data for the Quaternary malacofauna at Püspökfürdő, Baile 1 Mai, Oradea Region, Romania. *Malakológiai Tájékoztató*, 30, 31-37.

Svenning, J. C. (2003). Deterministic Plio-Pleistocene extinctions in the European cool-temperate tree flora. *Ecology Letters*, 6(7), 646-653.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., & Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4), 453-464.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17(5), 1105-1109.

Tamura, M. (1993). Ranunculaceae. In K. Kubitzki (szerk.), *The families and genera of vascular plant*, Berlin, Springer.

Tarkhishvili, D., Gavashelishvili, A., & Mumladze, L. (2012). Palaeoclimatic models help to understand current distribution of Caucasian forest species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(1), 231-248.

- Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2), 619-633.
- Tollefsrud, M. M., Sønstebo, J. H., Brochmann, C., Johnsen, Ø., Skrøppa, T., & Vendramin, G. G. (2009). Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*, 102(6), 549-562.
- Treier, U., & Müller-Schärer, H. (2011). Differential effects of historical migration, glaciations and human impact on the genetic structure and diversity of the montane pasture weed *Veratrum album* L. *Journal of Biogeography*, 38(9), 1776-1791.
- Trewick, S. A., Morgan-Richards, M., Russell, S. J., Henderson, S., Rumsey, F. J., Pinter, I., Barrett, J. A., Gibby, M., & Vogel, J. C. (2002). Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of rockfern *Asplenium ceterah*: Evidence from chloroplast DNA. *Molecular Ecology*, 11(10), 2003-2012.
- Tutin, T.G., Webb, D.A. (1992). *Nymphaea* L. In: Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O., Edmondson, J.R., Heywood, V.H., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Szerk.), *Flora Europaea*. Volume 1: Psilotaceae to Platanaceae. 2. kizadás. Cambridge, Cambridge University Press, 246-247.
- Tuzson, J., (1908). A *Nymphaea lotus* csoport morfológiája és rendszertani tagolódása. *Mathematikai és Természettudományi Értesítő*, 26, 101-137.
- Twyford, A. D., & Ennos, R. A. (2012). Next-generation hybridization and introgression. *Heredity*, 108(3), 179-189.
- Valtueña, F. J., Preston, C. D., & Kadereit, J. W. (2012). Phylogeography of a Tertiary relict plant, *Meconopsis cambrica* (Papaveraceae), implies the existence of northern refugia for a temperate herb. *Molecular Ecology*, 21(6), 1423-1437.
- Verdcourt, B. (1989). A note on *Nymphaea zenkeri* Gilg (Nymphaeaceae). *Kew Bulletin*, 44, 484.
- Volkova, P. A., Burlakov, Y. A., & Schanzer, I. A. (2020). Genetic variability of *Prunus padus* L. (Rosaceae) elaborates “a new Eurasian phylogeographical paradigm”. *Plant Systematics and Evolution*, 306(1), 1-9.
- Volkova, P. A., Schanzer, I. A., & Meschersky, I. V. (2013). Colour polymorphism in common primrose (*Primula vulgaris* Huds.): Many colours – many species? *Plant Systematics and Evolution*, 299(6), 1075-1087.
- Waldstein, F. A., & Kitaibel, P. (1799). *Descriptiones et icones plantarum rariorum Hungariae*. I-III. Bécs, Matthiaea Andreae Schmitt, Vindobonae
- Wang, W., Lin, L., Xiang, X. G., del C. Ortiz, R., Liu, Y., Xiang, K. L., Yu, S. X., Xing, Y. W., & Chen, Z. D. (2016). The rise of angiosperm-dominated herbaceous floras: Insights from Ranunculaceae. *Scientific Reports*, 6, Article 27259.
- Weiss, H., Sun, B. Y., Stuessy, T. F., Kim, C. H., Kato, H., & Wakabayashi, M. (2002). Karyology of plant species endemic to Ullung Island (Korea) and selected relatives in peninsular Korea and Japan. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 138(1), 93-105.
- Weiss-Schneeweiss, H., Schneeweiss, G. M., Stuessy, T. F., Mabuchi, T., Park, J. M., Jang, C. G., & Sun, B. Y. (2007). Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytologist*, 174(3), 669-682.
- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, 42, 225-249.
- Wendel, J. F., & Doyle, J. J. (1998). Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution. In D. E. Soltis, P. S. Soltis, & J. J. Doyle (szerk.), *Molecular systematics of plants II*. New York, Springer.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315-322.

Willis, K. J., & Niklas, K. J. (2004). The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1442), 159-172.

Woods, K., Hilu, K. W., Borsch, T., & Wiersema, J. H. (2005). Pattern of variation and systematics of *Nymphaea odorata*: II. Sequence information from ITS and *trnL-trnF*. *Systematic Botany*, 30(3), 481-493.

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

Zhang, N., Zeng, L., Shan, H., & Ma, H. (2012). Highly conserved low-copy nuclear genes as effective markers for phylogenetic analyses in angiosperms. *New Phytologist*, 195(4), 923-937.

Zonneveld, B. J. M. (2010). Genome sizes in *Hepatica* Mill. (Ranunculaceae): Show a loss of DNA, not a gain, in polyploids. *Journal of Botany*, 758260.

## 7. Publikációk listája



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

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

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

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

### További közlemények

#### Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

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





Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (11)

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





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





Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (3)

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

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,572**

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

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

Debrecen, 2021.03.02.





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

Candidate: Levente Laczkó

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

MTMT ID: 10058659

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (3)

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

### List of other publications

#### Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

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





Foreign language scientific articles in international journals (11)

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





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





Hungarian abstracts (3)

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

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

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

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

02 March, 2021



## 8. Függelék

1. Függelék A *Primula vulgaris* filogeográfiai vizsgálata során felhasznált terepi minták és részletes adataik.

Faj	Név	Élőhely	nrITS ribotípus	plasztisz haplotípus
<i>Primula veris</i>	723*	Közép- Oroszország	Z	v2
	731*	Közép- Oroszország	Z	v1
<i>Primula vulgari</i> *s	92*	Kaukázus	A	-
	Hu122	Észak-Szlovénia	F	27
	Hu141	Észak-Szlovénia	F	-
	43	Monakó	Y	27
	91*	Kaukázus	A	7
	301*	Kaukázus	C	9
	302*	Kaukázus	C	9
	303*	Kaukázus	C	9
	305*	Kaukázus	C	8
	306*	Kaukázus	-	8
	308*	Kaukázus	C	10
	309*	Kaukázus	B	24
	311*	Kaukázus	A	24
	312*	Kaukázus	A	20
	314*	Kaukázus	A	20
	320*	Kaukázus	B	25
	322*	Kaukázus	B	11
	323*	Kaukázus	A	-
	327*	Kaukázus	B	-
401*	Kaukázus	C	10	
404*	Kaukázus	B	7	
407*	Kaukázus	A	9	
418*	Kaukázus	A	22	
419*	Kaukázus	A	7	

420*	Kaukázus	A	20
421*	Kaukázus	A	7
603*	Kaukázus	A	9
604*	Kaukázus	A	9
606*	Kaukázus	A	9
608*	Kaukázus	A	7
609*	Kaukázus	A	9
610*	Kaukázus	C	9
703*	Kaukázus	C	9
704*	Kaukázus	C	23
705*	Kaukázus	A	-
706*	Kaukázus	C	20
707*	Kaukázus	D	2
708*	Kaukázus	A	7
709*	Kaukázus	A	15
710*	Kaukázus	C	21
711*	Kaukázus	A	9
713*	Azerbajdzsán	-	55
715*	Azerbajdzsán	G	55
716*	Közép- Oroszország	F	41
717*	Kaukázus	B	7
718*	Kaukázus	M	7
719*	Krím-félsziget	H	30
721*	Krím-félsziget	H	29
724*	Közép- Oroszország	F	28
725*	Kaukázus	D	-
726*	Kaukázus	E	-
728*	Kaukázus	N	12
729*	Kaukázus	A	9
734*	Kaukázus	E	4
735*	Azerbajdzsán	G	-
737*	Krím-félsziget	H	30
738*	Krím-félsziget	H	-
739*	Krím-félsziget	H	31
810	Kaukázus	E	-
811	Kaukázus	E	3

812	Kaukázus	E	6
813	Kaukázus	-	18
814	Kaukázus	A	17
815	Kaukázus	B	17
816	Kaukázus	-	17
818	Kaukázus	-	17
820	Kaukázus	M	-
821	Kaukázus	M	17
825	Kaukázus	D	1
826	Kaukázus	D	1
827	Kaukázus	D	5
828	Kaukázus	E	2
834	Ibériai-félsziget	F	36
835	Nyugat-Törökország	T	-
838	Kaukázus	W	16
839	Kaukázus	B	17
840	Kaukázus	-	19
841	Kaukázus	C	-
851	Kaukázus	-	14
852	Kaukázus	A	-
853	Kaukázus	N	13
854	Appenin-félsziget	W	-
856	Alpok, Ausztria	-	27
857	Appenin-félsziget	-	27
858	Appenin-félsziget	Y	37
859	Németország	F	-
863	Franciaország	-	27
865	Norvégia	-	39
866	Appenin-félsziget	-	27
867	Azerbajdzsán	G	56
868	Azerbajdzsán	G	-
804/1	Kaukázus	A	-
804/2	Kaukázus	A	-
804/3	Kaukázus	A	-
804/4	Kaukázus	A	-
829/1	Kaukázus	A	-

829/2	Kaukázus	A	-
829/3	Kaukázus	A	-
829/4	Kaukázus	A	-
829/5	Kaukázus	A	-
829/6	Kaukázus	A	-
829/7	Kaukázus	A	-
829/8	Kaukázus	A	-
A106	Erdélyi-szigethegység	F	27
A169	Északi-Kárpátok	D	38
A195	Északi-Kárpátok	O	38
A60	Déli-Kárpátok	F	27
B06	Erdélyi-szigethegység	F	35
B65	Görögország	X	26
CG	Montenegró	F	27
CrD	Görögország	X	37
DD	Horvátország	-	32
Hu121/1	Nyugat-Magyarország	Q	27
Hu121/11	Nyugat-Magyarország	Q	27
Hu121/6	Nyugat-Magyarország	Q	27
Hu132	Kelet-Szlovénia	F	54
Hu136	Kelet-Szlovénia	F	27
Hu138	Alpok, Szlovénia	F	27
Hu145	Alpok, Dél-Ausztria	Q	27
Hu146	Kelet-Szlovénia	Q	27
Hu260	Dél-Magyarország	D	-
Hu37	Észak-Magyarország	D	35
Hu406	Erdélyi-szigethegység	F	-
Hu421	Alpok, Szlovákia	F	27
Hu436	Erdélyi-szigethegység	D	27
Hu468	Alpok, Szlovákia	D	27
Hu470	Horvátország	D	32
Hu503	Horvátország	D	32

Hu510	Horvátország	F	33
Hu512	Erdélyi- szigethegység	F	35
Hu523	Erdélyi- szigethegység	D	-
Hu529	Délnyugat- Magyarország	-	50
Hu531	Észak-Románia	-	27
Hu73	Appenin-félsziget	V	-
Hu89	Appenin-félsziget	P	-
JCZ2	Ibériai-félsziget	S	52
K1668	Ibériai-félsziget	F	45
KYS	Kárpátok, Szlovákia	-	27
MVA1	Appenin-félsziget	U	27
MVA2	Appenin-félsziget	F	40
PrA46	Görögország	X	27
PrA48	Dél-Anglia	F	27
PrA51	Nyugat-Bulgária	A	53
PrA52	Szerbia	D	34
PrAALF2	Kelet- Franciaország	F	44
PrABrog1	Nyugat- Franciaország	F	-
PrAChail1	Nyugat- Franciaország	F	42
PrAChail19	Nyugat- Franciaország	F	-
PrAChail23	Kelet- Franciaország	F	42
PrAChartreuse	Franciaország	f	49
PrACres	Horvátország	-	47
PrAEsp29	Kelet- Ibériai-félsziget	b	48
PrAFr49	Franciaország	b	44
PrAIre	Írország	F	42
PrAKais	Nyugat- Alpok, Ausztria	D	-
PrALCan13	Kelet- Franciaország	y	42
PrAMalz1	Franciaország	H	46

PrAMontm1	Nyugat- Franciaország	d	43
PrANeamt	Erdélyi- szigethegység	D	42
PrASaig2	Kelet- Franciaország	F	-
pvs1 <sup>+</sup>	Kelet-Törökország	K	-
pvs2 <sup>+</sup>	Nyugat- Törökország	H	-
pvv1 <sup>+</sup>	Kelet-Törökország	J	-
pvv2 <sup>+</sup>	Kelet-Törökország	L	-
pvv3 <sup>+</sup>	Nyugat- Törökország	H	-
pvv4 <sup>+</sup>	Nyugat- Törökország	I	-
Ro1	Déli-Kárpátok	R	27
Ro3	Erdélyi- szigethegység	D	27
SP1	Ibériai-félsziget	F	-
TR1	Nyugat- Törökország	-	51

\*Volkova és mtsai. (2013) által felhasznált minták

<sup>+</sup>Gültepe és mtsai. (2010) által felhasznált minták

A külön jelöléssel el nem látott minták a tanulmányhoz mintázott populációkhoz tartoznak.