



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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

PhD theses

Sramkó Gábor

Témavezetők:

Dr. Molnár V. Attila

Prof. Dr. Varga Zoltán

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2008

1. Az értekezés összegzése

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

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

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

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

A klónozások során 59 APS-t hordozó populáció egy-egy egyedének direkt szekvenciáját klónoztuk, egyedenként átlag±szórás $10,1\pm 1,93$ klónt szekvenálva meg. Ebből 479 klón nrITS szekvencia a Fuciflora komplex azon 19 fajának 45 populációjából származott, melyet tovább elemeztünk. A pszeudogének (4 szekvencia) kizárása után a klón szekvenciákat 52 ribotípusra vontuk össze. Ezek mennyiségi viszonyai megmutatták, hogy bizonyos klón ribotípusok nagyon gyakoriak (ezeket domináns klón nrITS ribotípusoknak neveztük), mások ritkábban (szubdomináns klón ribotípusok), míg a többség akcidentálisan fordul elő. LaJeunesse & Pinzón (2007) meglátásának megfelelően mi csak a domináns és szubdomináns klónokat vizsgáltuk tovább, mert ezek nagy valószínűséggel az élőlények közti evolúciós viszonyt tükröző ortológ gének, míg a többi szinte bizonyosan egyeden belül keletkezett, filogenetikai szignál nélküli paralóg.

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

A domináns és szubdomináns klón ribotípusok, a külcsoport *O. apifera* szekvenciák, valamint az összehasonlításhoz bevont Argolica és Umbilicata csoportokból származó ribotípusok filogenetikai törzsfarekonstrukciója nagyon hasonló topológiájú fákat adott. A maximális parszimónia és a bayesi utólagos valószínűségek alapján képzett fák megegyeztek, míg a szomszéd csatolás módszerével készített fa kissé kisebb felbontást eredményezett. A ribotípusok közti viszonyt bemutató fák kládjai közepes (bayesi utólagos valószínűségű), illetve alacsony statisztikai („bootstrap”) támogatásúak voltak, ami nagy valószínűséggel a szekvenciák közti roppant kis különbségekből (2,7% variábilis hely a teljes mátrixban) ered. Ezek a fák, alacsony támogatottságuk ellenére, az eddiginél (Devey *et al.* 2008) kicsit mélyebb betekintést engednek az *Ophrys* nemzetség Fuciflora komplexének evolúciós viszonyaiba.

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

Ennek megfelelően négy fő kládot sikerült kimutatni az elemzett *Ophrys* populációk nrITS szekvenciáiban, melyek földrajzi affinitása világos: a „fuciA” a Balkán-félsziget, a „fuciF” az Ibériai-félsziget és Észak-Afrika jellemző ribotípusa, addig a „fuciB” és „fuciD” kládok viszont mindketten az Appennini-félsziget jellemző ribotípusait tartalmazzák. Az európai élővilág glaciális történetének ismeretében (Hewitt 1999) joggal feltételezzük, hogy a négy klád a három nagy európai glaciális refúgiumban izolálódott a legutolsó glaciális során, amikor a termofil poszméhangó ősök nagy valószínűséggel ide húzódtak vissza. A posztglaciális klímajavulással pedig áréájuk kiterjedt, és az eltérő ősi leszármazási vonalak kereszteződéséből jött létre a napjainkban látható kiterjedt varrat zóna.

Nyitva marad azonban a kérdés, hogy hogyan izolálódhatott két leszármazási vonal („fuciB” és „fuciD”) is ugyanazon elsődleges refúgiumban? Erre populációgenetikai differenciációt tesztelő AMOVA elemzésekkel kerestük a választ a két érintett klád domináns

és szubdomináns ribotípusainak bevonásával, mely során partíciónáltuk a genetikai variabilitást 1.) a Delforge (2005) által felállított fajok közt; 2.) a Delforge (2005) által megadott fajcsoportok közt; 3.) földrajzi régiók közt; 4.) a virágzási idő alapján képzett fenológiai csoportok közt. Habár elemzéseinkben Szicília földrajzi elkülönülését megerősítettük, további földrajzi struktúrát nem találtunk az adatokban. Érdekes csoportok közötti differenciációt találtunk viszont a korán virágzó és a későn virágzó poszméhangók közt. Ebből arra következtettünk, hogy szimpatrikus helyzetben az eltérő virágzási idő, és az ahhoz kapcsolódó külön megporzó méhnem izolálta a két kládot.

Ennek megfelelően az *Ophrys fuciflora* (s.str.) komplexben 4 fő leszármazási ágat különíthetünk el (1. ábra): a tágabb értelemben vett keleti szarvasbangók kládja („fuciA”), mely az *O. oestrifera* rokonsági köre mellett egyéb, keleti-mediterrán fajcsoportokat is magába foglal; a nyugati szarvasbangók kládja („fuciF”), mely az *O. scolopax* faj rokonait tartalmazza; a korai virágzású poszméhangók kládja („fuciD”), mely a dél-olasz *O. fuciflora* rokonokat tartalmazza; és a kései virágzású poszméhangók kládja („fuciB”), mely a *Tetralonia* nembe tartozó méhek által megporzott *O. tetraloniae* rokonait foglalja magában.

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

Ez utóbbi nézőpontot jelen dolgozat nagymértékben támogatja, mert a Fuciflora (s.str.) komplexen belül talált nagymértékű génáramlás az izolációs barrier kis jelentőségére hívja fel a figyelmet. Ha pedig az elkülönített alakok egymástól genetikailag nem teljesen izolálódtak, akkor csupán a faj alatti kategóriák alkalmazhatók az alakok megnevezésére. Ha pedig elfogadjuk, hogy a Delforge (2005) által közölt fajok inkább faj alatti kategóriákba sorolható alakok, és figyelembe vesszük Schiestl (2005) által közölt „szügameon elméletet”, az nrITS tükrében négy „szügameonként evolválódó” fajt különíthetünk a Fuciflora komplexen (s.str.)

belül el. Ezek a keleti szarvasbangó (*Ophrys oestrifera*), a nyugati szarvasbangó (*Ophrys scolopax*), a korán virágzó poszméhangó (*Ophrys fuciflora*) és a későn virágzó poszméhangó (*Ophrys tetraloniae*). Az egyes „szügameon-fajokhoz” tartozó alakok pontos taxonómiai vizsgálata és besorolása az evolúciós viszonyokba az nrITS-énél mélyebb betekintést nyújtó, variábilis génszakaszok alkalmazását szükségeltetik.

Összegezve, „az nrITS változatossága a mediterrán bangó (*Ophrys* L.) nemzetség poszméhangó (*O. fuciflora*) fajkomplexében” című doktori (PhD) értekezésem új tudományos eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A poszméhangó fajkomplexben jellemző erőteljes hibridizációból eredő közép-európai varrat zóna és ahhoz kapcsolódó jelentős génáramlás kimutatása az nrITS régió szekvenálásával.

2. Az nrITS régió intenzív klónozásával (59 populációból egyedenként átlag $10,1 \pm 1,93$ klón szekvenálása) és az ortológ ribotípusok kiszűrésével a varrat zónát kialakító fő leszármazási vonalak megállapítása.

3. Az ortológ ribotípusokra alapozva a fő leszármazási vonalak földrajzi elhelyezkedése alapján azok földrajzi eredetének kimutatása.

4. Az ortológ ribotípusok alapján a fő leszármazási vonalak egymáshoz való viszonyának megállapítása filogenetikai módszerekkel, így a jelenleginél (Devey *et al.* 2008) mélyebb betekintést nyújtott a poszméhangó alakkör filogenetikai viszonyaiba.

5. A fő leszármazási vonalak közti földrajzi izoláció megállapítása, illetve a szimpatikus leszármazási vonalak esetén a fenológiai izoláció populációgenetikai módszerekkel történt igazolása.

6. Az eredmények tükrében a nemzetségben jelenleg alkalmazott, mások által is vitatott proliferáló fajfogalomhoz adott újabb kritika.

2. Summary of PhD thesis

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

Our workgroup has started to investigate hybridisation between certain *Ophrys* species with the nrITS (ribosomal ITS of the nuclear genome) in 2002. We have found hybridisation-caused double-peaks (APs, „additive polymorphic sites”) in the nrITS, and we reported gene-flow between three, distantly related species (Gulyás *et al.* 2005). By expanding the geographical and taxonomical scope of our investigations (in fact, to the *Ophrys fuciflora* species-complex and its area), we have found hybridisation and subsequent introgression related APs (Gulyás 2007) on the whole adriatic-mediterranean part of its area. Since much phylogenetic software do not distinguish between different types of APs, nrITS sequences with APs can thus be used for phylogenetic reconstruction limitedly. So we have aimed to investigate the Central-European suture zone (common hybrid zone of many genealogical lineages) of the *Ophrys fuciflora* complex in detail, the identification of orthologous ribotypes, and their involvement in the phylogenetic reconstruction to gain a deeper insight into the evolutionary relationship of the complex.

105 populations of 40 species out of the 77 species (Delforge 2005) in the *Ophrys fuciflora* species-complex were studied in detail, with the addition of 10 species from the related Argolica species-complex for comparison considerations. As earlier studies (Soliva *et al.* 2002; Bateman *et al.* 2003; Devey *et al.* 2008) has clearly indicated, the sister group of the

Fuciflora – Argolica – Sphegodes complexes is the Apifera group. Thus, sequences of *Ophrys apifera* Huds., as closest relative, were used as outgroup in the investigations.

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

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

The geographic distribution of the dominant and subdominant clone ribotypes has shown some interesting features. Certain clone ribotypes were confined to smaller geographic regions, while others were much more extendedly distributed and their lack in some regions were more conspicuous. The possible phylogenetic relationship between the ribotypes was assessed by TCS, which has split the ribotypes into two main groups. One of them was the group of the largely distributed and most frequent CH21 and its allies (CH36, CH22, CH30, CH46), while the other was constituted by less frequent or rare ribotypes (CH09, CH02,

CH01, CH06, CH33, CH48). No conspicuous relationship between the species and the ribotypes was found on the DCA diagram generated from the clone ribotypes frequencies.

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

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

Altogether, four main nrITS lineages were unravelled by our investigations in the analysed nrITS sequences of the studied *Ophrys* populations. All clades had clear geographical affinities: the clade “fuciA” is the characteristic clade of the Balkan Peninsula; the clade “fuciF” is distributed in the Iberian Peninsula and Northern Africa; while clades “fuciB” and “fuciD” are both characteristic for the Apennine Peninsula. Keeping the recent history of the European biota in mind (Hewitt 1999), one may well postulate that the four main clades were isolated and formed in the three great primary glacial refugia during last glaciations, when the thermophilous ancestors of the Fuciflora species-complex were retreated back here. The area of the species has probably expanded with postglacial warming,

and the nowadays' huge suture zone is formed by the amalgamation of the previously distinct, ancient nrITS lineages.

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

Altogether, we identified 4 main nrITS clades (fig. 1) within the *Ophrys fuciflora* species-complex (s.str.): the clade (“fuciA”) of the eastern “scolopaxoid” bee-orchids which is composed of the *O. oestrifera* and its allies, and other Eastern Mediterranean species-groups, the Bornmuelleri and the Heldreichii groups; the clade (“fuciF”) of “western scolopaxoid” bee-orchids including the *O. scolopax* and its allies; the clade (“fuciD”) of early-blooming “fucifloroid” bee-orchids with the *O. fuciflora*-like Southern Italian species; and the clade (“fuciB”) of late-blooming “fucifloroid” bee-orchids encountering the *Tetralonia* bees pollinated *O. tetraloniae* and its allies.

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

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

To sum up, in my view the following statements can be regarded as scientific novelties in the work:

1. The presentation of the Central European suture zone resulting from the intensive hybridisation, and in connection to it, the presentation of significant gene-flow by sequencing the nrITS region in the Fuciflora species-complex.

2. The presentation of the suture-zone-constructing main genealogical lineages by intensively cloning [from 59 populations 10,1±1,93 (mean±s.d.) sequences per individual] the nrITS region, and by screening for the orthologous ribotypes.

3. The presentation of the geographical origin of the main genealogical lineages by mapping the spatial pattern of the orthologous ribotypes.

4. Based on the orthologous ribotypes, the presentation of evolutionary relationship between the main genealogical lineages using phylogenetic methods, thus providing a deeper than present (Devey *et al.* 2008) insight into the phylogenetic relationship of the Fuciflora species-complex.

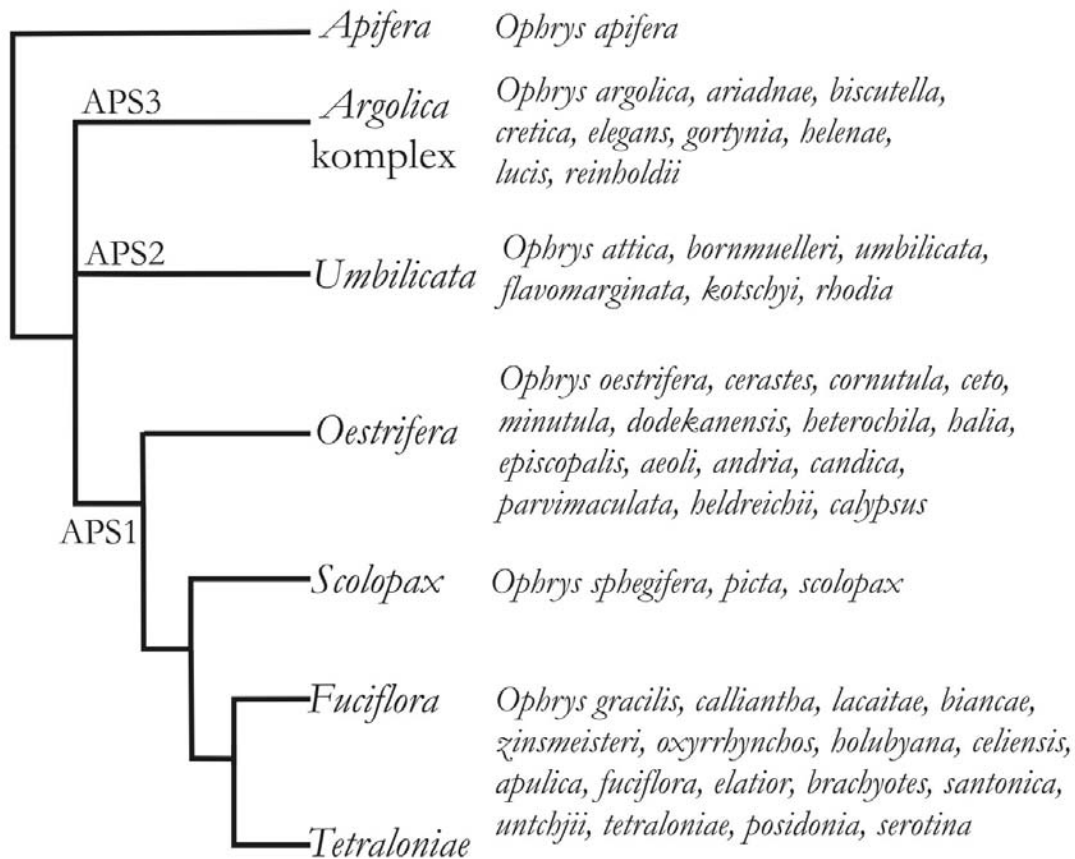
5. The presentation of the geographical isolation between the main genealogical lineages, and in case of sympatric lineages, the verification of phenological isolation using population-genetic methods.

6. In the light of the results, the addition of further criticism to the disputed proliferating species-concept currently in use in the genus.

3. Idézett irodalom / *Literature cited*

- Álvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417-434.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 247-277.
- Bateman RM, Hollingsworth PM, Preston J, Yi-Bo L, Pridgeon AM, Chase MW (2003) Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **142**: 1-40.
- Delforge P (2005) *Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient*, 3^{ème} edn. Delachaux et Niestlé, Paris
- Devey DS, Bateman RM, Fay MF, Hawkins JA (2008) Friends or relatives? Phylogenetics and species delimitation in the controversial European orchid genus *Ophrys*. *Annals of Botany* **101**(3): 385-402.
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**: 477-485.
- Gulyás G (2007) Az *Ophrys fuciflora* fajkomplex (Orchidaceae) molekuláris vizsgálata. Doktori (PhD) értekezés (mscr). Debreceni Egyetem Biológia Doktori Iskola, Debrecen
- Gulyás G, Sramkó G, Molnár VA, Rudnóy Sz, Illyés Z, Balázs T, Bratek Z (2005) Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **47**: 61-67.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**(4): 411-453.
- LaJeunesse TC, Pinzón JH (2007) Screening intragenomic rDNA for dominant variants can provide a consistent retrieval of evolutionary persistent ITS (rDNA) sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **45**: 417-422.
- Paulus HF (2006) Deceived males – Pollination biology of the Mediterranean orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Journal Europäischer Orchideen* **38**(2): 303-353.

- Paulus HF, Gack C (1990) Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). *Israel Journal of Botany* **39**: 43-79.
- Pedersen HÆ, Faurholdt N (2007) *Ophrys, the bee orchids of Europe*. Kew Publishing, Kew
- Pillon Y, Chase MW (2007) Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conservation Biology* **21**(1): 263-265.
- Schiestl FP (2005) On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften* **92**: 255-264.
- Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt Ch, Hansson BS, Ibarra F, Francke W (1999) Orchid pollination by sexual swindle. *Nature* **399**: 421-422.
- Soliva M, Kocyan A, Widmer A (2001) Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**: 78-88.
- Soliva M, Widmer A (2003) Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* **57**: 2252-2261.
- Wood J (2001) Distribution. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum Volume 2 Orchidoideae (Part 1)*. Oxford University Press, New York, p.: 329.
- Wood J, Cribb PJ (2001) Taxonomic notes. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum Volume 2 Orchidoideae (Part 1)*. Oxford University Press, New York, pp.: 332-333.



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

Fig. 1. Main nrITS clades within the samples of the studied *Ophrys* populations. Next to clade branches the characteristic APS-type is shown, while species that can be assigned to a clade are also shown next to the clade name. The *Fuciflora* complex (s.str.) is characterised by APS1, and within it, to *Fuciflora* and *Tetraloniae* groups species were not possible to unambiguously assigned.

4. A jelölt tudományos tevékenységének jegyzéke

4.1. Az értekezés témakörében megjelent lektorált cikkek

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

Sramkó G, Gulyás G, Matus G, Rudnóy Sz, Illyés Z, Bratek Z, Molnár VA (2008) Leaf width, nrDNA and cpDNA ITS sequence variation within Central European *Bulbocodium vernum* and *B. versicolor* (Colchicaceae) populations: are there really two taxa? – *Acta Biologica Hungarica* **59**(1): 103-114.

4.2. Egyéb megjelent, vagy közlésre elfogadott lektorált cikkek, könyvek

Sramkó G. (1999) A mátraverebélyi Kő-szirt hegy növényzete. *Kitaibelia* **4**(1): 51-53.

Harmos K, Sramkó G (2000) Adatok a Mátra edényes flórájához I, *Kitaibelia* **5**(1): 63-78.

Harmos K, Sramkó G, Stadler Á (2001) Adatok a Cserhát edényes flórájához. *Kitaibelia* **6**(1): 73-86.

Harmos K, Sramkó G (2001) A *Saga pedo* (Pallas) újabb lelőhelye a Mátrában. *Fol. Hist.-nat. Mus. Matr.* **25**: 79-82.

Sramkó G, Vojtkó A, Harmos K, Magos G (2003) Adatok a Mátra és környéke edényes flórájának ismeretéhez. *Kitaibelia* **8**(1): 139-160.

Sramkó G (2004) „Dunántúli” közép-dunai flóraválasztós fajok a Matricum flórájában. *Kitaibelia* **9**(1): 31-56.

Sramkó G, Hűvös-Récsi A (2004) A *Seseli hippomarathrum* Jacq. aktuális előfordulása Erdélyben. *Kitaibelia* **9**(1): 87-91.

Matus G, Sramkó G, Papp B, Lökös L (2006) A *Woodsia ilvensis* (L.) R. Br. új előfordulása az Eperjes–Tokaji-hegységben. *Kitaibelia* **10**(1): 18-23.

Sramkó G, Magos G (2007) Néhány adat a Keleti-Cserhát és tágabb környéke edényes flórájának ismeretéhez. *Kitaibelia* **12**(1): 133-137.

Molnár Cs, Baros Z, Pintér I, Sramkó G, Zólyomi Sz (2007) Az *Anogramma leptophylla* (L.) Link előfordulása a Kárpát-medencében. *Kitaibelia* **12**(1) 138-141.

Barina Z, Csiky J, Farkas S, Jakab G, Király G, Lájér K, Mesterházy A, Molnár V. A, Nagy J, Németh Cs, Pál R, Pifkó D, Pinke Gy, Schmotzer A, Somlyay L, Sramkó G, Vidéki R, Vojtkó A (2007) *Vörös lista. A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai*. Szerzői kiadás, Sopron, 73 pp.

Molnár VA, Sramkó G (2007) Magyarország növényzete és fontosabb élőhelytípusai. In: Bihari Z, Csorba G, Heltai M (eds.): *Magyarország emlőseinek atlasza*. Kossuth Kiadó, Budapest, pp.: 18-24.

Sramkó G, Magos G, Molnár Cs, Urbán L (2008) Adatok a Mátra és környéke edényes flórájának ismeretéhez. *Kitaibelia* **13**(1): 74-93.

4.3. Az értekezés témakörében elhangzott előadás- és poszterösszefoglalók

Sramkó G, Gulyás G, Molnár V. A, Rudnóy S, Illyés Z.– Bratek Z (2005) Phylogeographical observations on species complex *Ophrys fuciflora* inferred from nuclear ribosomal ITS sequences, XVII International Botanical Congress – Abstracts: 367.

Sramkó G, Gulyás G, Rudnóy Sz, Illyés Z, Péntes Zs, Molnár V. A (2006) Fő leszármazási vonalak az *Ophrys fuciflora* fajkomplexben (Orchidaceae) az nrDNS ITS régió szekvencia változatossága alapján. *Kitaibelia* **11**(1): 27.

Lukács BA, Sramkó G, Molnár VA (2006) A *Nymphaea lotus* L. var. *thermalis* (DC.) Tuzson taxonómiai helyzetének vizsgálata nrITS szekvenciák alapján. *Kitaibelia* **11**(1): 63.

Sramkó G, Gulyás G, Matus G, Rudnóy Sz, Illyés Z, Bratek Z, Molnár V. A (2008) Levélszélesség, nrDNS és kpDNS ITS szekvenciaváltozatosság közép-európai egyhajúvirág populációkban: valóban két taxon van? *Kitaibelia* **13**(1): 131.

Sramkó G, Gulyás G, Bán Á, Nagy Sz, Péntes Cs, Molnár V. A (2008) Az nrITS használatának nehézségei egyes orchidea csoportokban. *Kitaibelia* **13**(1): 214.

4.4. Egyéb témakörében elhangzott előadás- és poszterösszefoglalók

Sramkó G, Magos G (2003) A *Woodsia ilvensis* (L.) R. Br. hazai aktuális elterjedése. *Bot. Közlem.* **89**(1-2): 241.

Sramkó G (2004) „Közép-dunai flóraválasztós” fajok a Keleti-Cserhát és a Mátra flórájában. *Bot. Közlem.* **90**(1-2): 168-171.

Sramkó G (2004) Közép-dunai flóraválasztós fajok a Matricum flórájában. In. Szabó I, Hermann T, Szalóky I (eds.) Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében VI, Keszthely, p.: 33.

Sramkó G, Magos G (2004) *Woodsia ilvensis* (L.) R. Br. aktuális helyzete hazánkban. In. Szabo I, Hermann T, Szalóky I (eds.) Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében VI, Keszthely

Matus G, Sramkó G (2004) A *Woodsia ilvensis* (L.) R. Br. új előfordulása a Tokaj-Eperjesi-hegységben. *Bot. Közlem.* **90**(1-2):177-178.

Sramkó G, Magos G (2005) A keleti tüskemag (*Torilis ucranica* Spr.) újabb előfordulásai hazánkban. *Bot. Közlem.* **92**(1-2): 209-210.

Magos G, Sramkó G, Urbán L (2006) Adatok a Mátra hegység flórájának ismeretéhez. *Kitaibelia* **11**(1): 64.

Sramkó Gábor

Debreceni Egyetem TTK Növénytani Tanszék

Debrecen, Pf: 14.

4010

Hungary

sramkog@puma.unideb.hu