

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A *Crocus vernus* fajcsoport Kárpát-medencei fajainak
molekuláris taxonómiája**

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

Mosolygó-Lukács Ágnes

Témavezető: Dr. Surányi Gyula



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2016

Bevezetés

A *Crocus vernus* fajcsoport az *Iridaceae* családon belül a *Crocus* nemzetséghez, ezen belül a *Verni* sorozathoz tartozik. Morfológiailag és citogenetikailag rendkívül változatos növénycsoport, amelynek pontos nevezéktani és filogenetikai viszonyai morfológiai és DNS vizsgálatok alapján sem kellően tisztázottak (HARPKE et al. 2014).

A fajcsoport taxonómiájával kapcsolatos legújabb eredmények morfológiai, molekuláris genetikai és kariológiai vizsgálatok alapján a *Verni* sorozat filogenetikai rekonstrukciójára irányultak (Harpke et al. 2014). Ez a vizsgálat azonban nem terjedt ki a fajcsoport közép-európai elterjedésű taxonjaira, úgymint a *C. scepusiensis*, *C. vittatus*. Tehát a *C. vernus* fajcsoport rendszertanával és fejlődéstörténetével kapcsolatos kérdések továbbra is megválaszolásra várnak.

A Kárpát-medencében és térségében a *Crocus vernus* fajcsoport tagjai közül négy taxon fordul elő.

A fehér sáfrány (*Crocus vernus* (L.) Hill = *Crocus albiflorus* Kit. ex Schult.) alpesi faj, lelei fehér színűek és lepeltorkában szörképletek találhatóak. Kromoszómaszáma $2n=8$. A Kárpát-medencében az Alpokalján és a Velebitben fordul elő.

A kárpáti sáfrány (*Crocus heuffelianus* Herb.) lelei lila színűek, jellegzetes V alakú folttal a csúcsukon. A lepeltorka csupasz. Citogenetikailag rendkívül változatos, a Kárpát-medencében a $2n=10$ -es kromoszómaszámú citotípusa fordul elő (BRIGHTON 1976, MURIN & HINDAKOVA 1984, MÁJOVSKY 1990 HARPKE et al. 2014).

A szepességi sáfrány (*Crocus scepusiensis* Borb. ex Kulcz.) a fajcsoport és egyben a nemzetség legészakibb előfordulású faja, amely az Északi-Kárpátok vonulatain fordul

elő. Leplei lila színűek, lepeltorka szőrözött. Kromoszómaszáma $2n=18$ (SKALINSKA 1968, BRIGHTON 1976, MÁJOVSKÝ et al. 1990). Eredetét tekintve MÁJOVSKÝ (1990) úgy vélekedik, hogy a *C. heuffelianus* ($2n=10$) északi populációból származik autopoliploidizáció révén két kromoszóma elvesztésével.

A Dunántúlon két populációja ismert a halvány sáfránynak (*Crocus vittatus* Schloss. & Vukot.). Elterjedési területe a Kárpát-medence délnyugati részétől (Szlovénia, Horvátország), Magyarország területén át a Déli-Kárpátokig húzódik. Kromoszómaszáma szintén $2n=18$ és lepeltorka szőrözött.

Kutatómunkám során a fent említett taxonok molekuláris rendszertani és filogenetikai vizsgálatát végeztük AFLP markerek és kloroplaszt szekvencia adatok alapján.

Célkitűzések

Kutatómunkám során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

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

Anyag és Módszer

Növényi minták

A molekuláris taxonómiai vizsgálatokba a Kárpát-medence térségéből nyolc *Crocus* fajt vontunk be 32 különböző populációból. A *C. vernus* fajcsoportához tartozó fajok közül a *C. vernus*, *C. heuffelianus*, *C. scepusiensis*, *C. vittatus* és a közép-olasz elterjedésű *C. neapolitanus* faj egy egyedét vizsgáltuk. Külcsoportként *C. sativus* és *C. banaticus*, *C. tommasinianus* fajok szerepeltek.

DNS izolálás

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

AFLP analízisek módszertana

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

(1) Az elővizsgálatok során 6 *Crocus* populációt vizsgáltunk. A retriációs fragmentek felszaporítására egy lépéses PCR reakciót alkalmaztunk. A DNS fragmentmintázat detektálása poliakrilamid gélelektroforézissel és ezüsfestéssel történt.

(2) A kísérletek második szakaszában az AFLP analíziseket a teljes adatsoron, 32 különböző *Crocus* populáció bevonásával végeztük. Az AFLP protokolt a VOS et al. (1995) által közölték szerint végeztük, kisebb módosításokkal. A PCR reakció során kétlépéses amplifikációt alkalmaztunk. A

fragmentmintázat detektálása kapilláris elektroforézissel történt.

Kloroplaszt szekvencia analízisek módszertana

A kloroplaszt szekvencia analízis során az *accD-psaI* intergénikus spacer (cpIGS) szekvenciát szaporítottuk fel 35 *Crocus* mintában (SMALL et al. 1998).

Kromoszómaszám meghatározás

Citológiai vizsgálatainkban a *Crocus vernus* fajcsoporthoz tartozó fajok és a *C. tommasinianus* esetében is kromoszóma szám meghatározást végeztünk.

Statisztikai értékelés

Az AFLP fragmentmintázat értékelése során az 50 és 500 bp közötti fragmenteket vizsgáltuk és 0/1 bináris adatokká alakítottuk.

Az elővizsgálatok során Nei és Li módszere (1979) alapján genetikai távolság mátrixot készítettünk, majd ebből kiindulva UPGMA dendrogrammot rekonstruáltunk. A teljes adatsor bevonása során filogenetikai és fenetikai elemzéseket végeztünk. A fenetikai elemzés során Jaccard hasonlósági index alapján PcoA analízist végeztünk. A filogenetikai összefüggések megállapítására parszimónia alapú elemzést végeztünk PAUP* v4.0b10 programmal (SWOFFORD 2003). A parszimónia elemzéseket elvégeztük a teljes adatsorral, valamint egy szűkített adasorral is, amelyből kizártuk a feltételezett hibrid taxonokat (*C. vittatus* és *C. scepusiensis*). A hibridizáció vizsgálatára Bayes-féle utólagos valószínűségen (“Bayesian posterior probability”) alapuló statisztikai analízist

végeztünk a NewHybrids programmal (ANDERSON & THOMSON 2002).

Populációgenetikai elemzéseink során a *C. vernus* fajcsoportozható fajok genetikai variabilitását, valamint a populációszerkezetének hierarchiáját vizsgáltuk molekuláris varianciánálizissel (AMOVA). A genetikai divergencia mérőszámaként a *PhiPT* értékét határoztuk meg. Az elemzéseket a GenALEx 6.5. programmal végeztük.

A kloroplaszt szekvencia elemzés során maximum parszimónia (MP) analízist végeztünk (FITCH et al. 1971) PAUP program segítségével. A törzsfá elágazási pontjainak statisztikai támogatottságát bootstrap (BS) módszerrel (FELSENSTEIN 1985) teszteltük 1000 ismétléssel.

Eredmények

***AFLP* vizsgálatok eredményei**

Az AFLP elővizsgálatok során 6 *Crocus* faj genetikai variabilitását vizsgáltuk. Az UPGMA dendrogramokon a *C. heuffelianus*, *C. vittatus* és *C. tommasinianus* minták egy kládot alkottak, azonban a *C. scepusiensis* minták esetén nagyobb genetikai távolságot állapítottunk meg. A külcsoporként bevont *C. banaticus* elkülönülését nem sikerült egyértelműen megállapítani.

A teljes adatsor bevonásával készített AFLP analízis során hét *Crocus* faj 44 egyedét vizsgáltuk. A végső analízishez három szelektív primerkombinációt választottunk, amely összesen 185 AFLP fragmentet eredményezett, ezek közül 157 volt polimorf (85%). Az MP filogenetikai fa első leágazását a külcsoporként bevont *C. banaticus* egyedek alkották 100%-os BS támogatottság mellett. A következő leágazásban a *C. tommasinianus* és a *C. vernus* fajcsoport egyedei szerepeltek. A *C. vernus* fajcsoporton belül a minták két kládot alkottak. (i) A balkáni kládot a *C. heuffelianus* s.s. minták és egy *C.*

tommasinianus egyed alkotta. (ii) Az adriai kládon belül egy kládot alkottak a *C. vittatus* és *C. vernus* minták, míg a *C. scepusiensis* minták és a *C. neapolitanus* minta egy másik alkládot képviselt. Az analízisből a feltételezett hibrid mintákat kizárva a balkáni és adriai kládok 84% és 76%-os statisztikai támogatottság mellett különültek el.

A PCoA analízis a *Crocus vernus* fajcsoporton belül három fő csoportot különített el. A balkáni csoportot a *C. heuffelianus* s.s. és a *C. tommasinianus* minták alkották. Az adriai csoportot a *C. vernus*, *C. vittatus* és *C. neapolitanus* egyedek. A *C. scepusiensis* minták által alkotott harmadik csoport elkülönül a balkáni és adriai csoport egyedeitől. A NewHybrids analízis P1 szülői genotípusnak a *C. vernus* és a horvátországi *C. vittatus* mintákat állapította meg. A P2 szülői genotípust a *C. heuffelianus* s.s. egyedek alkották. F1 hibrid kategóriába a *C. scepusiensis*, valamint a magyar és horvát *C. vittatus* minták tartoztak.

A populációgenetikai vizsgálataink során az átlagos heterozigóta gyakoriság (H_e) értékek alacsonyak voltak. A *C. vernus* fajcsoport tagjai között ez a mutató 0,105 és 0,163 között változott. Az AMOVA analízis során a teljes genetikai varianciát populációk és fajok szintjén vizsgáltuk. A teljes variancia nagyobb része a populációk közötti különbségből származott (57%), míg a populációkon belül ez az érték 43 % volt. Faji szinten vizsgálódva azonban a teljes variancia 61 %-a a fajok közötti varianciából adódott, míg fajokon belül ez az érték 39% volt. A genetikai differenciálódás mértéke a populációk közötti magasabb volt ($\Phi_{PT}=0,573$), mint fajok között vizsgálódva ($\Phi_{PT}=0,389$).

Szekvencia alapú vizsgálatok eredményei

A kloroplaszt szekvencia analízis során 35 *Crocus* minta esetén határoztuk meg az *accD-psaI* intergénikus spacer bázissorozatát. A filogenetikai fa első leágazását a külsoporthként bevont *C. banaticus* alkotta (BS:100%). A fa ezt követően hasonlóan az AFLP markerek alapján rekonstruált dendrogramhoz két alkládra különült el. (i) A balkáni kládot a *C. tommasinianus*, a *C. heuffelianus* s.s., a *C. scepusiensis* minták és egy *C. vittatus* minta alkotta (BS: 99%). (ii) Az adriai kládot (BS: 96 %) a *C. vittatus*, *C. vernus* és *C. neapolitanus* egyedei alkották, faji szinten azonban nem különültek el.

Kromoszóma vizsgálatok eredményei

A citogenetikai vizsgálatok során a *Crocus vernus* fajsoporthoz tartozó fajok és a *C. tommasinianus* esetében is kromoszóma szám meghatározást végeztünk. A *C. vernus* esetén $2n=8$ kromoszómaszámot állapítottunk meg. A *C. heuffelianus* minta kromoszómaszáma $2n=10$ volt. A *C. scepusiensis* és a *C. vittatus* populációk esetén $2n=18$ tetraploid kromoszómaszámot állapítottunk meg. A *C. tommasinianus* minta szintén tetraploid volt $2n=16$ kromoszómaszámmal.

Diszkusszió

Molekuláris vizsgálataink eredményeképpen a kloroplaszt szekvencia adatok és az AFLP markerek alapján a *C. vernus* fajcsoporton belül két fejlődési vonalat különböztetünk meg, a balkáni és adriai kládokat; amelyek két különböző biogeográfiai régiót reprezentálnak. A balkáni kládhoz tartozó taxonok a *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* (plasztid fa estén). Az adriai kládhoz pedig a *C. vernus*, *C. vittatus* és *C. neapolitanus* taxonok tartoznak. A faji szintű felbontóképesség tekintetében az AFLP módszer az *accD-psaI* plasztid markerrel összehasonlítva árnyaltabb filogenetikai kapcsolatok megállapítását tette lehetővé. A plasztid fán a balkáni és adriai klád magas staisztikai támogatottság mellett különül el, azonban a kládokon belül a fajok keverednek, így az *accD-psaI* plasztid marker a *Crocus vernus* fajcsoporton belül a faj szintű azonosítást nem tette lehetővé.

Az AFLP adatok filogenetikai és fenetikai analízisében is a *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* és *C. neapolitanus* taxonok faji szinten elkülönültek. Azonban a *C. vernus* és *C. vittatus* egyedeit az AFLP markerek alapján sem tudtuk faji szinten megkülönböztetni.

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

Molekuláris genetikai eredményeinket és a fajok morfológiai jellegzetességet együttesen figyelembe véve 6 *Crocus* fajt Evolúciósan Szignifikáns Egységként definiáltunk,

ezek a *C. banaticus*, *C. tommasinianus*, *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis*, *C. vernus* és *C. vittatus* fajok voltak. Funkcionális Konzervációs egységek azonban eredményeink alapján nem jelölhetők ki.

Filogenetikai vizsgálataink során az AFLP markerek alapján rekonstruált kladogram és az *accD-psaI* kloroplaszt szekvencia alapú fa a *C. scepusiensis* egyedeket az AFLP fán az adriai kládba, ezzel ellentétben a plasztid fán a balkáni kládba helyezte. A biparentálisan és maternálisan öröklődő markerek ilyen fajta inkongruenciája a hibridizációs fajkeletkezési folyamatok bizonyítéka (LINDER & RIESEBERG 2004, WAN et al. 2013). A PCoA analízis ordinációs ábráján a *C. scepusiensis* egyedek az adriai és a balkáni klád egyedei között egy jól definiálható köztes helyzetű csoportban helyezkedtek el, amely szintén hibridizációra utaló jel (TOYAMA et al. 2014). A NewHybrids analízis pedig a *C. scepusiensis* egyedeket F1 hibrid genotípusba sorolta. Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy molekuláris genetikai vizsgálatainkkal egy olyan hibridizációs fajkeletkezési eseményt bizonyítottuk, amelyben a *C. scepusiensis* taxon a balkáni és az adriai klád valamely tagjának hibridizációja révén jöhetett létre. A kromoszómaszám adatok és a molekuláris markerek alapján a hibrid eredeten túl arra engednek következtetni, hogy a *C. scepusiensis* ($2n=18$) a *C. vernus* ($2n=8$) és a *C. heuffelianus* ($2n=10$) hibridje. Így ez a faj az allopoliploid fajkeletkezés egy tipikus példája, amelyben két különböző faj első lépésben hibridizált egymással, majd egy poliploidizációs eseményt követően tetraploid formává alakult.

Hasonló fajkeletkezési folyamatot feltételezhetünk a *C. vittatus* ($2n=18$) taxon esetében is, amely a *C. scepusiensis* fajjal párhuzamosan a Kárpát-medence déli térségében parallel fajkeletkezési folyamat útján jöhetett létre, szintén a $2n=10$ -es

C. heuffelianus és $2n=8$ -as kromoszómaszámú *C. vernus* allotetraploid hibridjeként.

Új tudományos eredmények

1. Az AFLP vizsgálataink optimalizációja során olyan reprodukálható kísérleti rendszert állítottunk fel, amelynek segítségével lehetőség nyílt a *Crocus vernus* fajcsoport tagjainak genetikai variabilitás vizsgálatára és filogenetikai viszonyaik pontosabb megállapítására.

2. A *Crocus* nemzetség filogenetikai vizsgálataihoz egy eddig nem alkalmazott genetikai markert, az *accD-psaI* intergénikus kloroplaszt régiót vizsgáltunk.

3. Az AFLP és az *accD-psaI* markerek alapján a *Crocus vernus* fajcsoporton belül két fejlődési vonalat különböztetünk meg, a balkáni és adriai kládokat. A balkáni kládhoz tartozó taxonok a *C. heuffelianus s.s.*, *C. scepusiensis* (plasztid fa estén). Az adriai kládhoz pedig a *C. vernus*, *C. vittatus* és *C. neapolitanus* taxonok tartoznak.

4. Molekuláris taxonómiai vizsgálatunkban az AFLP eredményeink egyértelműen igazolják a *C. heuffelianus s.s.* ($2n=10$) faji szintű elkülönülését a *C. vittatus* és *C. vernus* taxonoktól.

5. Terepi megfigyeléseink alapján fontos megkülönböztető morfológiai bélyegnek bizonyult a lepeltorok szőrözöttsége.

6. Molekuláris genetikai, citogenetikai és morfológiai eredményeinket együttesen figyelembe véve a *C. heuffelianus s.s.*, a *C. vittatus* és *C. scepusiensis* taxonok egyértelműen

elkülöníthetők egymástól. A *C. vittatus* faji rangú tagja a *C. vernus* fajcsoportnak.

7. Filogenetikai eredményeink inkongruenciája a *C. scepusiensis* hibrid eredetét bizonyítja, amelyet a NewHybrids analízis is megerősített. A citológiai eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a *C. scepusiensis* ($2n=18$) a *C. vernus* ($2n=8$) és a *C. heuffelianus* s.s. ($2n=10$) allotetraploid hibridje.

8. A *C. vittatus* ($2n=18$) esetén is allotetraploid fajkeletkezési folyamatot feltételezünk. A *C. vittatus* a Kárpát-medence déli térségében parallel fajkeletkezési folyamat útján jöhetett létre, szintén a *C. heuffelianus* ($2n=10$) és a *C. vernus* ($2n=8$) hibridjeként.

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

Introduction

The taxonomically and cytologically complicated *Crocus vernus* species complex belongs to the genus *Crocus* series *Verni*, and distributed from the Iberian Peninsula to the western Balkans (HARPKE et al. 2014). Phylogenetic relationships within the genus *Crocus* series *Verni* were studied with morphological, molecular and karyological analyses (HARPKE et al. 2014). However, this work does not cover the northeast region of species distribution, where *C. vernus*, *C. heuffelianus*, *C. scepusiensis* and *C. vittatus* occur together. Therefore the phylogenetics and evolution of the *C. vernus* species group is still waiting for answers.

The *C. vernus* species complex is represented by four species in the Carpathian Basin.

C. vernus (= *C. albiflorus* Kit. ex Schult.) is a predominantly white flowered alpine plant distributed in the high mountains of Alps that has a diploid chromosome number of $2n=8$ (BRIGHTON 1976).

Crocus heuffelianus Herb. is a lilac-flowered species with a V-shaped dark patch on the upper end of the tepals and a hairless entrance to the perianth tube. The distribution of this species extends from the Balkan Peninsula and extends eastwards via Romania and Ukraine into Poland (MIHALY & KRICSFALUSY 1997, BRIGHTON 1976, HARPKE et al. 2014). In Transylvania this species is characterised by chromosome numbers of $2n=10$. *C. chromosome number of 2n=10* (BRIGHTON 1976, MURIN & HINDAKOVA 1984, MÁJOVSKY 1990).

Crocus scepusiensis Borb. ex Kulcz. is found in mountain habitats in the Northern Carpathians in Slovakia and Southern Poland. This taxon is morphologically also characterised by lilac tepals and by a hairy entrance to the perianth tube

(MÁJOVSKÝ et al. 1990). *C. scepusiensis* is reported to be $2n=18$ (SKALINSKA 1968, BRIGHTON 1976, MÁJOVSKÝ et al.1990) and MÁJOVSKÝ et al.(1990) assumed that this species originated from the northern population of *C. heuffelianius* ($2n=10$) by autopolyploidisation and subsequent aneuploidy (i.e. loss of two chromosomes).

Crocus vittatus Schloss. & Vukot. represented by two wild population in Hungary This taxon occurs in the southeastern part of the Carpathian Basin distributed from Slovenia, Croatia and Hungary eastwards into the Southern Carpathians in Romania. It is also a tetraploid species with a $2n=18$ chromosome number the perianth tube is hairy at the entrance. The main objective of my study to reveal the phylogenetic relationships of these *Crocus* species based on AFLP markers and chloroplast sequences data.

Aims of the study

The aim of our study was to contribute to the solution of following questions:

1. The optimization and applying of AFLP method to evaluate the genetic variability within the *Crocus vernus* species complex.
2. Exploration of molecular taxonomy of *Crocus vernus* species complex using new genetic markers.
3. Molecular taxonomy, phylogenetic and population genetic study of the species belongs to the *Crocus vernus* species complex in the Carpathian Basin based on AFLP markers.
4. Cytogenetic study of the species belongs to the *Crocus vernus* species complex in the Carpathian Basin.

Materials and methods

Plant materials

We studied a total of 31 populations belonging to eight species of *Crocus* from in Hungary, Ukraine, Romania, Slovakia, Croatia and Italy. The autumn-flowering *Crocus banaticus* Gay and *C. sativus* L. were included as distant outgroup while *C. tommasinianus* is regarded as close outgroup of our studied species.

DNA extraction

Total genomic DNA was extracted using phenol-chloroform extraction (BENNER et al. 1995) and modified CTAB protocol as detailed in SRAMKÓ *et al.* (2014).

AFLP fingerprinting

Two different AFLP experimental procedure were performed to study the genetic variability of the *Crocus* species.

(1) During the first AFLP experiment six *Crocus* population were analyzed. The amplification of fragments from restriction digestion was performed by one-step PCR reaction. The detection of DNA fragments has occurred with polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining.

(2) In the second phase of the experiments AFLP analysis was carried out for the full dataset, involving 32 different *Crocus* population. Az AFLP procedure was performed following VOS *et al.*(1995) with minor modifications. In this

experiment we used two-step PCR amplification and selected three different primer combinations for the final analysis. The analysis of fragments was performed by capillary electrophoresis.

Amplification of the accD-psaI plastid region

Exploration of phylogenetic relationships of 35 *Crocus* species was undertaken using DNA sequences of the plastid-encoded *accD-psaI* intergenic spacer (cpIGS). This plastid region was amplified prior to sequencing with PCR using the primers described in SMALL *et al.* (1998).

Chromosome counts

We performed chromosome counting with the members of the *Crocus vernus* species complex found in the Carpathian Basin and *C. tommasinianus*.

Statistical analysis

AFLP fragments were scored as present (1) or absent (0) between lengths 50–500 bp. Based on the results of the first AFLP analysis NEI and LI (1979) genetic distance matrix was created and UPGMA dendrogram reconstructed. The entire AFLP dataset analysed both phenetically and cladistically. For the phenetic analysis, genetic relationships between *Crocus* taxa were inferred by principal coordinate analysis (PCoA) with the distance matrix based on the Jaccard coefficient of similarity. The AFLP dataset was analysed cladistically using the MP criterion for phylogenetic tree reconstruction implemented in PAUP* v4.0b10 (SWOFFORD 2003). We performed a second analysis using the same settings where individuals, found to be of hybrid origin in hybridity tests (*C.*

vittatus, *C. scepusiensis*), were left out. The Bayesian assignment program NewHybrids was then used to estimate hybrid genotypes in a our AFLP data (ANDERSON & THOMSON 2002). The AFLP-data were also used to obtain basic statistics on marker variability as well as some population genetic measures. Additionally, different scenarios for partitioning genetic variability were also investigated in the ingroup samples (i.e. *Crocus vernus* complex) using a Analysis of Molecular Variance (AMOVA) approach implemented in GenAlEx v.6.5. Genetic divergence – defined with a *PhiPT* value, a multiallelic analogue of F_{ST} – was compared between the two alternative AMOVA arrangements. Based on sequence data from the *accD-psaI* intergenic spacer we reconstructed a phylogenetic tree using an heuristic search and the maximum parsimony (MP) criterion (FITCH *et al.* 1971) implemented in PAUP* v4.0b10. The robustness of tree topology was tested using the non-parametric bootstrap (BS) procedure (FELSENSTEIN 1985) after 1000 pseudo-replicates.

Results

AFLP

In the pre-AFLP experiment we examined the genetic variability of six *Crocus* species. On the UPGMA dendrogram *C. heuffelianus*, *C. vittatus* and *C. tommasinianus* samples formed a clade, but in the case of *C. scepusiensis* samples higher genetic distance was assumed. The separation of the outgroup *C. banaticus* and *C. sativus* could not be clearly established. In the second AFLP analysis with the entire dataset AFLP profiles of 44 individuals generated 185 characters (AFLP loci) with three primer combinations of which 157 were polymorphic (85%). MP analysis of our AFLP dataset supported the presence of two major groups

(BS: 63%) within the *Crocus vernus* species complex: (i) the ‘AFLP Balkan clade’ containing all *C. heuffelianus s.s.* specimens and one sample of *C. tommasinianus*; and (ii) the ‘AFLP Adriatic clade’ which is divided into two subclades. These sublineages comprise, respectively, the samples of *C. vittatus* and *C. vernus* from Hungary and Croatia while *C. scepusiensis* samples from Slovakia and the Italian *C. neapolitanus* sample form the other subclade. *C. tommasinianus* was sister to the *C. vernus* species complex in this analysis. Although these two main clades did not receive BS in the original analysis, when we omitted the hybrid specimens the two clades received moderate BS (84% – AFLP Adriatic clade; 76% – AFLP Balkan clade).

Our PCoA separated species into three main groups. Similar to the MP tree, *C. heuffelianus s.s.* and *C. tommasinianus* were placed close to each other (‘Balkan clade’) while the other main group included all *C. vernus*, *C. vittatus* and *C. neapolitanus* specimens (‘Adriatic clade’). The third group, comprised of *C. scepusiensis* individuals, was resolved in an intermediate position between the other two groups. In the NewHybrids analysis all *C. vernus* samples and three *C. vittatus* individuals, were determined as constituents of the first parental species (P1) while individuals of *C. heuffelianus* were assigned to the second parental species (P2). All *C. scepusiensis* specimens and remaining *C. vittatus* specimens from Hungary and Croatia were assigned as F1 hybrids.

In our population genetic measures the genetic diversity, expressed as mean expected heterozygosity (H_e), was generally low. For the members of the *C. vernus* species complex were similar across taxa. AMOVA resulted in a higher level of inferred variation (57 %) among populations than within populations, but this pattern is reversed if variance is partitioned at the species-level; only 39% of molecular

variance was assigned among species. Comparison between population vs. species level groupings show much higher genetic differentiation between populations ($PhiPT=0.573$) than between species ($PhiPT=0.389$).

Chloroplast DNA analysis

In our chloroplast DNA analysis we obtained the *accD-psaI* IGS region for a total of 35 individuals. Based on this analysis, a well-supported (BS: 100%) major cluster was recovered for the outgroup, containing all members of the *Crocus banaticus*. Similarly to the AFLP data two main lineages were recovered in the tree: (i) the Balkan clade containing all *C. tommasinianus*, *C. heuffelianus*, *C. scepusiensis* samples and one *C. vittatus* sample (BS: 99%) and (ii) the Adriatic clade containing the *C. vittatus*, *C. vernus* and *neapolitanus* samples (BS:96%). This clade contains no further resolution within samples.

Chromosome counts

In our cytogenetic analysis the chromosome number determinations were carried out with *C. tommasinianus* and species belonging to the *Crocus vernus* species complex. Chromosome number of $2n=8$ was found in the sample of *C. vernus*. The sample of *C. heuffelianus* was revealed chromosome number of $2n=10$. Tetraploid chromosome numbers were confirmed for *C. scepusiensis* and *C. vittatus*, both with $2n=18$. *C. tommasinianus* was found to be tetraploid at $2n=16$.

Discussion

Our phylogenetic study, including all species of the *Crocus vernus* species complex occurring in the Carpathian Basin, provides new insight: two main lineages can be identified using both plastid sequences and AFLP fingerprinting; a Balkan clade and an Adriatic clade that represent distinct biogeographical regions. The Balkan clade contained *Crocus heuffelianus* s.s., one *Crocus vittatus* samples, *C. scepusiensis* (plastid tree) and *C. tommasinianus*. The Adriatic clade included *C. vittatus* and *C. vernus*, as well as *C. neapolitanus*.

In comparison to the plastid marker, our AFLP analysis achieved better resolution at the species level. Although on the plastid tree the Balkan and Adriatic clade separated with high BS support, within the clades there was no resolution at species level.

In both phenetic and phylogenetic analysis of AFLP data *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* and *C. neapolitanus* were separate at species level. However, based on AFLP markers the individuals of *C. vernus* and *C. vittatus* could not be separated at the species.

In our population genetic measures the low levels of genetic diversity measured in the AFLP data, the fact that more genetic variability is partitioned between populations than between species, and the fact that populations display much higher genetic differentiation than species, clearly argues for the importance of an evolutionarily recent separation in the case of Carpathian species.

Six distinct Evolutionary Signification Units were detected within the *C. vernus* species complex corresponding to the species of *C. banaticus*, *C. tommasinianus*, *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis*, *C. vernus* and *C. vittatus*. However Functional

Conservation Units could not be defined on the basis of our results.

In our molecular taxonomic study AFLP markers clearly revealed the separation of *C. heuffelianus* s.s. from the *C. scepusiensis* and *C. vittatus*. Furthermore regarding of our molecular genetic results and the distribution area of taxon we also considered the separate taxonomic entity of the morphological similar *C. scepusiensis* and *C. vittatus* both with $2n=18$ chromosome number.

Our AFLP-tree and plastid tree both place all the *C. scepusiensis* individuals incongruently into either the Adriatic (AFLPs) or the Balkan (plastid) clade. Such incongruence between phylogenies based on biparentally and maternally inherited markers are clear indications of hybridisation (LINDER & RIESEBERG 2004, WAN et al. 2013). Moreover, in our PCoA analysis, samples of *C. scepusiensis* form a well-defined lineage and are placed in an intermediate position between the Adriatic and Balkan groups. Our molecular results suggest that *C. scepusiensis* may be derived from a cross between a member of the Balkan clade and the Adriatic clade; and NewHybrids analysis reveals that all *C. scepusiensis* specimens are hybrids. Given the $2n=8$ diploid number of the *Crocus vernus*, the $2n=10$ diploid number of *C. heuffelianus*, and the tetraploid $2n=18$ of *C. scepusiensis*, it is more likely that *C. scepusiensis* originated from a cross between *C. vernus* and *C. heuffelianus* s.s. and that this was followed subsequently by tetraployploidisation. Therefore, this species is a classic example of allotetraploid hybridisation, where two different species were first involved in the hybridisation process and this was then followed by polyploidisation. Our lowland samples of *Crocus vittatus* are also shown to be of hybrid origin in the NewHybrids analysis, based on the AFLP data. In combination with the same ploidy level, $2n=18$, this indicates a similar allotetraploid origin for this species in the

southern part of the Carpathian Basin. In summary, we conclude a similar evolutionary origin for *C. vittatus* on the southern arc of the Carpathian Basin, where, similar to *C. scepusiensis*, the same parental species – most probably *C. vernus* ($2n=8$) and *C. heuffelianus* ($2n=10$) – gave rise to the allotetraploid *C. vittatus* that possesses a similar morphology.

Scientific results of the dissertation

1. With the optimization of the AFLP method we set up a reproducible experimental system that achieved a usable marker system to explore the deeper level of genetic variability and phylogenetic relationship within the *C. vernus* species complex.

2. In our phylogenetic study DNA sequences of the plastid-encoded *accD-psaI* intergenic spacer was also included, which we used first for the molecular genetic studies of the genus *Crocus*.

3. Both the AFLP and plastid phylogenetic trees separated the taxa into two groups: Balkan clade and Adriatic clade. The Balkan clade contained *Crocus heuffelianus s.s.*, one *Crocus vittatus* samples, *C. scepusiensis* (plastid tree) and *C. tommasinianus*. The Adriatic clade included *C. vittatus* and *C. vernus*, as well as *C. neapolitanus*.

4. In our molecular taxonomic study we consider *C. heuffelianus* in the strict sense, restricting this name to only diploid ($2n=10$) forms from the Transylvanian Carpathians and adjacent territories. Based on our molecular results and the morphological, citological features *C. heuffelianus s.s.* clearly separated from *C. scepusiensis* and *C. vittatus*.

5. Based on field observations proved to be an important distinctive morphological character the hairy entrance to the perianth tube.

6. Within the *Crocus vernus* species complex species level differences were discovered between *C. heuffelianus* s.s., *C. scepusiensis* and *C. vittatus* regarding our molecular genetic results, citological and morphological features.

7. In our phylogenetic study the AFLP-tree and plastid tree both place all the *C. scepusiensis* individuals incongruently into either the Adriatic (AFLPs) or the Balkan (plastid) clade. Such incongruence between phylogenies based on biparentally (e.g. AFLP) and maternally (cpDNA) inherited markers are clear indications of hybridisation. Bayesian hybridity analysis also revealed this result. Given the $2n=8$ diploid number of the *C. vernus*, the $2n=10$ diploid number of *C. heuffelianus* s.s., and the tetraploid $2n=18$ of *C. scepusiensis*, it is more likely that *C. scepusiensis* originated from a cross between *C. vernus* and *C. heuffelianus*.

8. We conclude a similar evolutionary origin for *C. vittatus* on the southern arc of the Carpathian Basin, where, the same parental species – most probably *C. vernus* ($2n=8$) and *C. heuffelianus* ($2n=10$) – gave rise to the allotetraploid *C. vittatus*.

Acknowledgments

I am grateful to my supervisor, Gyula Surányi for his support during my research.

I thank my co-authors, in particular Gábor Sramkó for professional help in AFLP and sequence analyzes.

We thank Ágnes-Júlia Albert, Erzsébet Barna, Levente Czeglédi, Gergely Gulyás, Orsolya Horváth, Balázs Keszei, Levente Laczkó, Balázs András Lukács, Miklós Óvári, László Papp, Anna Resetár, Miklós Toldi, Attila Takács, Gábor Vasas for helping in the sampling and laboratory work.

This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund under the framework of TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001 ‘National Excellence Program’ Program’. The study was also supported by the EU Project CROCUSBANK AGRI-2006-0265.

Irodalom jegyzék - References

An, Z. W., Xie, L. L., Cheng, H., Zhou, Y., Zhang, Q., He, X. G., & Huang, H. S. (2009). A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391: 77-79.

Anderson, E. C. & Thompson, E. A. (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217–1229.

Benner, M. S., Braunstein, M. D., weisberg, M. U. (1995) detection of DNA poly-morphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). *Plant Molecular Reporter* 13: 147–155.

Brighton, C. A., Mathew, B., Marchant, C. J. (1973) Chromosome counts in the genus *Crocus* (Iridaceae). *Kew Bulletin* 28: 451–464.

Brighton, C. A. (1976) Cytological problems in the genus *Crocus* (Iridaceae): I. *Crocus vernus* aggregate. *Kew Bulletin* 31 1: 33–46.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fitch, W. M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.

Harpke, D., Carta, A., Tomović, G., Randelović, V., Randelović, N., Blattner, F.R. & Peruzzi, L. (2014) Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* ser. *Verni* (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 309-325.

Harpke, D., Meng, S., Rutten, T., Kerndorff, H. & Blattner, F.R. (2013) Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 617-627.

Linder, C. R. & Rieseberg, L. H. (2004) Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *American Journal of Botany* 91: 1700–1708.

Májovský, J., Murín A., Hindáková M. (1990) Karyotaxonomic of Slovak populations of the genus *Crocus* *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae Botanica* 38: 49-87.

Mihaly, A. & Kricsfalusy, V. (1997) Population biology and ecology of *Crocus heuffelianus* Herb. (*Iridaceae*) in Ukraine. *Linzer Biologische Beitrage* 29: 641–681.

Nei, M., Li, W. H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:5269-5273.

Peruzzi, L., Carta, A., Garbari, F. (2013) Lectotypification of the name *Crocus sativus* var. *vernus* L. (*Iridaceae*) and its consequences within the series *Verni*. *Taxon* 62: 1037-1040.

Skalińska, M. (1966) Cyto-taxonomical studies on the genus *Crocus* L., *C. albiflorus* Kit. *Acta Biologica Cracoviensia Series botanica* 9:137-152.

Skalińska, M. (1968) Further cyto-taxonomical studies on the genus *Crocus* L., *C. albiflorus* Kit. *Acta Biologica Cracoviensia Series botanica* 1: 31–37.

Small R. L., Ryburn J. A., Cronn R. C., Seelanan T., Wendel J. F. (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear ADH sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* 85: 1301–1315

Sramkó, G., Molnár V., A., Hawkins, J. A. & Bateman, R. M. (2014) Molecular phylogeny and evolutionary history of

the Eurasiatic orchid genus *Himantoglossum* s.l. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 114: 1609–1626.

Swofford, D. L. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.

Toyama, H., Kamiyama, T., Yahara, T. (2015). A genome-wide AFLP replacement in a hybrid population derived from two closely related *Viola* species from contrasting habitats. *Plant Systematics and Evolution* 301 :1073-1084.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, Th., Homes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.

Wan, X. Q., Zhang, F., Zhong, Y., Ding, Y. H., Wang, C. L. & Hu, T. X (2013) Study of genetic relationships and phylogeny of the native *Populus* in Southwest China based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* and nuclear DNA. *Plant Systematics and Evolution* 299: 57–65.

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

Impact faktoros közlemények - Papers with impact factor

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

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

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

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

Máthé C., **Mosolygó Á.**, Surányi G., Beke A., Demeter Z., Tóth R.V., Beyer D., Grigorszky I., Mészáros I., M-Hamvas M. (2012) Genotype and explant-type dependent morphogenesis and silicon response of common reed

(*Phragmites australis*) tissue cultures *Aquatic Botany* 97:(1) pp. 57-63. IF:1.593

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

Egyéb közlemények - Other publications

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

Konferenciák - Conferences

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

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

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

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

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