

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**A neotrópusi Hamelieae tribusz (Rubiaceae, Cinchonoideae) nemzetségeinek
filogenetikai kapcsolatai**

Készítette: SZÉNÁSY DALMA

BIOLÓGIA BSc

2010

Pécsi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. STRANCZINGER SZILVIA

PTE TTK Biológiai Intézet, Növénybiológiai Tanszék



PÉCS, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. A Rubiaceae család taxonómiájának rövid áttekintése	4
2.2. A Cinchonoideae alcsalád taxonómiájának rövid áttekintése	6
2.3. A Hamelieae tribusz taxonómiájának rövid áttekintése	7
2.4. A vizsgált DNS szakaszok.....	10
2.4.1. Az ITS (Internal Transcribed Spacer) szekvenciák jellemzői.....	10
2.4.2. A Kloroplaszt <i>trnL-F</i> régió felépítése.....	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12
3. 1. DNS izolálás	12
3.2. Agaróz gélelektroforézis	12
3.3. DNS szakaszok felszaporítása	14
3.4. A szekvenciák statisztikai kiértékelése	15
4. EREDMÉNYEK	18
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	22
5.1. A Hamelieae tribusz fő leszármazási kapcsolatai.....	22
5.2. A Hamelieae tribusz nemzetség szintű értékelése	23
6. ÖSSZEFOGLALÁS	26
8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	27
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
10. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	34

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Napjainkban a növényfajok rendszerezésében a morfológiai vizsgálatok mellett elengedhetetlenek a DNS alapú filogenetikai analízisek.

Ezen kutatások középpontjába tartozik a Rubiaceae más néven buzérfélék családja (kávéfélék), amely több mint 13000 fajával és 650 nemzetségével a virágos növénycsaládok közül a negyedik legnagyobb. A kétszikűek evolúciójában csúcsálló taxonok képviseltetik magukat ebben a családban. A zárvatermő kétszikűek legfejlettebb szintjébe, a Solananae főrend Rubiales rendjébe sorolják az ide tartozó fajokat, amelyek többnyire trópusi fák, de lehetnek cserjék, liánok, lágyszárúak és epifitonok is. A mérsékelt és hideg éghajlati övben leginkább egynyári képviselői vannak. Mindössze egy vízi faj található (*Lemnosipania sp.*) (DELPRETE 2004). Rendszere nagyon változatos és bonyolult.

A családon belül 3 alcsaládot különítünk el: Rubioideae, Cinchonoideae és Ixoroideae. A Rubiaceae család modern szempontú rendszerezését ADANSON (1763) majd BREMEKAMP (1952) kezdték meg. Ezt a rendszert először VERDCOURT (1958) és ROBBRECHT (1988) módosították. ANDERSSON és PERSSON (1991) morfológiai adatok kladisztikai analízisével elsőként készítették el a család felülvizsgálatát. Később egyre több molekuláris adatokon alapuló rendszer született meg. A különböző DNS régiók vizsgálata ellenére is sok tanulmányban találhatunk olyan eredményeket, amelyeket nem tudunk az egyes taxonok eddigi leírásai alapján megmagyarázni.

A Cinchonoideae (BREMER és mts. 1995, 1999) a legkisebb a három alcsalád közül, 120 nemzetséget tartalmaz. Ezek közül a Hamalieae tribusz fajainak és egyes szekcióinak elkülönítésére számos morfológiai és molekuláris alapú kísérlet történt (BORHIDI 2012, LORENCE 2012).

A kombinált morfológiai és filogenetikai vizsgálatok ellenére sincs egységes nézet a Cinchonoideae alcsalád szekcióinak elkülönítésére. Munkánk során a Hamelieae tribusz evolúciós leszármazási kapcsolatainak tisztázására fókuszáltunk molekuláris filogenetikai megközelítéssel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A Rubiaceae család taxonómiájának rövid áttekintése

A Rubiaceae család rendszerezését a magkezdemények száma és a termés típusa szerint ADANSON (1763) kezdte meg és ezek alapján az akkori "Aparines"-nek nevezett családot két szekcióra osztotta. DECANDOLLE (1830) a termés típusának, a magkezdemények számának és a capitum (fejecske) virágzat előfordulásának figyelembe vételével végzett rendszerezést és ennek eredményeként a magkezdemények száma alapján a család 13 tribuszát 2 csoportra osztotta. Egy magkezdeményűek: Cordiereae, Guettardeae, Paederieae, Coffeae, Spermacoeae, Anthospermeae, Stellatae, Opercularieae. Kettő vagy több magkezdeményűek: Cinchoneae, Gardenieae, Hedyotideae, Isertieae, Hamelieae. HOOKER (1873) a rekeszenkénti magkezdemények számán kívül új karaktereket is bevont a rendszerezésbe: pártacimpák borulása, magkezdemények tapadása. Rendszerében 25 tribuszt három csoportba sorolt. HOOKER rendszerét SCHUMANN (1891) módosította, aki 21 tribuszt két alcsaládba és négy "szupertribuszba" sorolt.

BREMEKAMP (1952) a családot 4 alcsaládra osztotta a maghéj szerkezete, az albumin, illetve a rafidok jelenléte vagy hiánya és az ixoroid pollen prezentáció mechanizmusa alapján: Rubioideae, Cinchonoideae, Ixoroideae, Guettardoideae. BREMEKAMP munkáját továbbfejlesztve VERDCOURT (1958) morfológiai karakterek alapján 3 alcsaládra tagolta a Rubiaceae családot: a Rubioideae-ra a rafidok és az albuminatus magok előfordulása, a Guettardoideae-ra a rafidok hiánya, nagy embrió és a redukált endospermium és a Cinchonoideae-ra a rafidok hiánya és albuminatus magok alapján. BREMEKAMP (1966) a VERDCOURT által vett morfológiai karaktereket a párta aestivációjával, a maghéj sejtjeinek tulajdonságaival és a pollen prezentáció mechanizmusával kiegészítve 8 alcsaládot különített el. Javasolta a Cinchoneae tribusz felülvizsgálatát és indítványozta a Rondeletieae revízióját.

A legutolsó morfológiai alapokra épülő rendszert ROBBRECHT (1988, 1993) dolgozta ki, aki a Rubiaceae családot 4 alcsaládra osztotta: Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioideae, Antirheoideae. Az Antirheoideae-be helyezi a Guettardeae tribuszt valamint olyan tribuszokat is, amelyek korábban más alcsaládokhoz tartoztak. Az Antirheoideae fajaira jellemzők a nagy embrióval rendelkező magányos magkezdemények. Valójában ez az alcsalád megegyezik SCHUMANN (1891) Guettardineae szupertribuszával.

A kladisztikai módszerekkel való elemzések a 90-es években kezdődtek és LENNART ANDERSSON munkásságához kapcsolódnak. ANDERSSON és PERSSON (1991) 48 karakter

kladisztikai analízisével elvégezték a Cinchoneae tribusz felülvizsgálatát, amely polifiletikusnak bizonyult. BREMER és JANSEN (1991), BREMER és STRUWE (1992), BREMER és mts. (1995) és BREMER (1996) az egész Rubiaceae családra kiterjedő morfológiai és/vagy molekuláris adatokon alapuló kladisztikai vizsgálatokat végeztek. Ezek az analízisek alátámasztották a Rubioideae, Ixoroideae és Cinchonoideae alcsalád létjogosultságát, azonban elutasították az Antirheoideae alcsalád létét.

Később egyre elterjedtebbek lettek a DNS szekvencia adatokon alapuló vizsgálatok. BREMER (1996) *rbcL* szekvenciák filogenetikai analízisét végezte el a Rubiaceae családon, amelynek eredményeképpen a család monofiletikusnak bizonyult és a vizsgált taxonok többé-kevésbé a három alcsaládnak megfelelően váltak szét. Az Antirheoideae (ROBBRECHT 1988) alcsalád létét a vizsgálatok nem támasztották alá. ANDERSSON és ROVA (1999) filogenetikai vizsgálatokat végeztek a Rubioideae alcsaládon, ezek az *rps16* intron, azaz a cpDNS levélből nyert anyagának szekvencia analízisével történtek DOWNIE és mts. (1996) valamint OXELMAN és mts. (1997) vizsgálataira alapozva. 143 taxon, mint belső, és 5 taxon, mint külsoport analízisének eredményeképpen körülbelül 50 új génusz klasszifikációja történt meg. Eredményeik azt mutatták, hogy a Rubioideae tradicionális taxonjai parafiletikusnak tűnnek, és számos nemzetség korábban rossz helyre került. A Rubioideae, Ixoroideae és Cinchonoideae alcsaládok létét vizsgálatuk alátámasztotta, míg az Antirheoideae alcsaládját nem, mivel az polifiletikusnak bizonyult szükségesnek vélték megszüntetését (BREMER és THULIN 1998, ANDERSSON és ROVA 1999, ROVA és mts. 2002, ANDERSSON és ANTONELLI 2005, RYDIN és mts. 2009).

További, *rbcL*-alapú vizsgálatok szerint az Antirheoideae-be sorolt nemzetségek a Cinchonoideae alcsaládba vannak beágyazva (Guettardeae nemzetségcsoport). Vannak azonban olyan tanulmányok, amelyek a Cinchonoideae-t és az Ixoroideae-t egy tágabb értelemben vett Cinchonoideae részeként értelmezik (ROBBRECHT és MANEN 2006). Számos tribusz és génusz helye és léte nyert bizonyítást, míg mások felülvizsgálata és/vagy áthelyezése vált szükségessé.

ROVA és mts. (2002) 154 Rubiaceae és 11 külső csoporthoz tartozó taxon kloroplaszt régió *trnL-F* szekvenciájának vizsgálatát végezték el. A hangsúlyt a Rondeletieae, Sipaneeae és Condamineeae tribuszokra fektették. A vizsgált taxonok az előző molekuláris vizsgálatokkal is alátámasztott alcsaládok szerint váltak szét. Vizsgálatuk során a következő tanulságokat fogalmazták meg. Lényeges a molekuláris taxonómiai vizsgálatoknál a széleskörű mintavételezés, mivel a Rubiaceae családon belüli kapcsolatok még ma sem tisztázottak. A család teljes kapcsolatrendszere bonyolultabbnak bizonyult, mint azt korábban

gondolták. A rendszerint monofiletikusnak vagy filogenetikailag közelinek gondolt csoportokról kiderültek, hogy nem azok, ezért a tradicionális csoportokat részekre lehetne osztani. Morfológiai adatokkal való vizsgálatoknál körültekintőnek kell lenni, főleg, ha a karakterek száma korlátozott, vagy a homológia nem teljesen világos. A párta borulásának mintázata viszont fontos bélyeg lehet. Molekuláris vizsgálatok során nagy körültekintés szükséges a megfelelő DNS régió kiválasztása során. A kloroplaszt *trnL-F* intron és a spacer régió jól használható a Rubiaceae család magasabb szintű klasszifikációjához leginkább abban az esetben, ha csupán a morfológia nem alkalmas arra (pl. Strumpfia nemzetség) (ROVA és mts. 2002). Hasonlóak a tapasztalatok a *rbcL* szekvencia adatokat illetően is (BREMER és mts. 1995). Azonban egy tág értelemben vett Ixoroideae klád esetében kiderült, hogy a *trnL-F* régió túl lassan evolválódik, ahhoz, hogy a rokonsági kapcsolatok feltárásra kerülhessenek.

2.2. A Cinchonoideae alcsalád taxonómiájának rövid áttekintése

A Cinchonoideae (BREMER és mts. 1995, 1999) a legkisebb a három Rubiaceae alcsalád közül, körülbelül 120 nemzetséget (genera) tartalmaz. Az alcsaládba tarozó fajok megtalálhatók Észak- Amerikától kezdve a Karibi-térségen át egészen Közép- és Dél- Amerikáig, de egyes nemzetségek az óvilágban is képviseltetik magukat. A Cinchonoideae fajai általában kisebb fák és cserjék, amelyekre jellemző az imbrikátus vagy valvátus aestivációjú párta, illetve a gyakran száraz, toktermés. Sok faj komplex indol alkaloidokat tartalmaz. Legismertebb génusza a Cinchona, amelynek kérge kinin előállítására szolgált és az első hatásos gyógyszernek bizonyult a malária ellen.

A Cinchonoideae taxonómiája igen vitatott és sokat változott az idők során. A termőlevelenkénti magkezdemények száma alapján először SCHUMANN (1891) írta le a Caffeoideae-val együtt, mint 2 nagyobb csoport egyikét a Rubiaceae családon belül. Napjainkban a Cinchonoideae rendszerének vizsgálata molekuláris adatokon alapul. Ezek alapján 9 tribuszt különítettek el: Cinchoneae, Chiococceae, Guettardeae, Hamelieae, Hillieae, Hymenodictyeae, Isterideae, Naucleae és Rondeletieae (MANNS és BREMER 2010).

Korábban morfológiai karakterek alapján számos tribuszt a Rubiaceae más alcsaládjaiba helyeztek (VERDCOURT 1958, BREMEKAMP 1966, ROBBRECHT 1998). Hasonlóképpen olyan tribuszokat helyeztek a Cinchonoideae-be, amelyeket ma már más alcsaládokba sorolunk (ANDERSSON és ROVA 1999, ROVA és mts. 2002, RYDIN és mts. 2009). Ezek a bizonytalan elhelyezések is mutatják, hogy a Rubiaceae-n belüli nagyobb csoportok

közi megbízhatóbb kapcsolatok is problémásak lehetnek, ha kizárólag a morfológiai karaktereket vesszük figyelembe, mivel azok erős homopláziát mutathatnak. A homológia megállapításának nehézsége és a különböző nézetek az egyes morfológiai karakterek fontosságáról ismételten a tribuszok különböző elhatárolásához vezethet.

A molekuláris analízisek jobb rálátást adhatnak a Cinchonoideae alcsalád taxonómiájának megértésében. Az *rbcL* szekvenciák filogenetikai analízise (BREMER és mts. 1995) elősegítette a Chiococceae (BREMER 1992) szélesebb körülírását, néhány évvel később pedig jelentős változásokhoz vezetett az Isertieae (BREMER és THULIN 1998) klasszifikációjában.

RAZAFIMANDIMBISON és BREMER (2001) morfológiai adatok mellett nukleáris ITS valamint kloroplaszt *rbcL* szekvencia adatok alapján javasolták a Nucleaeae elhatárolását valamint új tribuszként leírták a Hymenodictyeae-t. A nukleáris ITS és kloroplaszt szekvencia adatok analízisei megerősítették a Cinchoneae (ANDERSSON 1995) szűkebben való értelmezését (ANDERSSON és ANTONELLI 2005).

Sok nemzetség, amelyek előzőleg a Rondeletieae tribuszba kerültek, nemrégiben közelebbi rokonságot mutattak a Guetterdeae vagy Condamineae (Ixoroideae, ROVA és mts. 2002, 2009, DELPRETE and CORTÉZ-B 2004) tribuszokkal. Ezenkívül felvetették a Rondeletieae újragondolását (ROVA és mts. 2009).

A Cinchonoideae alcsaládon belüli rokonsági kapcsolatokról vannak korábbi ismereteink. A Cinchoneae az Isertieae testvér csoportja (BREMER és THULIN 1998, ANDERSSON és ROVA 1999, ANDERSSON és ANTONELLI 2005, ROBBRECHT és MANEN 2006), ahogyan a Naucleaeae a Hymenodictyeae-nak (RAZAFIMANDIMBISON és BREMER 2001, ANDERSSON és ANTONELLI 2005, ROBBRECHT és MANEN 2006, RYDIN és mts. 2009), a Hamelieae a Hillieae-nak (BREMER és mts. 1995, BREMER és THULIN 1998, ROVA és mts. 2002, ANDERSSON és ANTONELLI 2005, ROBBRECHT és MANEN 2006), valamint a Rondeletieae a Guettardieae-nak (BREMER és THULIN 1998, BREMER és mts. 1999, ROVA és mts. 2002, 2009, ROBBRECHT és MANEN 2006, RYDIN és mts. 2009).

2.3. A Hamelieae tribusz taxonómiájának rövid áttekintése

Az eredetileg DECANDOLLE (1830) által leírt neotrópusi Hamelieae tribusz, amelyet erős diverzitás jellemez Mexikóban és Közép- Amerikában, a Cinchonoideae alcsaládba tartozik. Körülbelül 230 fajt foglal magába, amelyek az alábbi nemzetségek között oszlanak el: *Cosmocalyx* (1), tág értelemben vett *Deppea* (43), *Eizia* (1), *Hamelia* (16), *Hoffmannia* (kb. 120), *Omiltemia* (3), *Pinarophyllon* (2), *Plocaniophyllon* (1), *Pseudomiltemia* (2),

Syringantha (1) és *Patima* (2). Az *Eizia*, *Omitemia*, *Pinarophyllon*, *Plocaniophyllon*, *Pseudomitemia* és *Syringantha* nemzetségek mind 10-10 fajjal endemikusan vannak jelen Mexikóban (BORHIDI 2012).

A tribusz modern taxonómiai rendszerét BREMER (1987) alapozta meg, aki a korábbi *Deppea* tribuszt (KIRKBRIDE 1984), beleértve a *Deppea* (CHAMISSO és SCHLECHTENDAL 1830), *Omitemia* (STANDLEY 1918) és *Schenkia* (SCHUMANN 1889) nemzetségeket, áthelyezte a *Hamelieae* tribuszba morfológiai karakterek kladisztikai analízise alapján. BREMER (1987) szerint a *Hamelieae* a következő nemzetségeket foglalja magába: *Deppea* (beleértve *Schenkia*), *Hamelia* (JACQUIN 1760), *Hoffmannia* (beleértve *Xerococcus*) (SWARTZ 1788), *Omitemia* és *Pinarophyllon* (BRANDEGEE 1924).

A tribusz tagjaira jellemzőek a szinte mindig murvalevél nélküli virágzatok, gyakran sárga vagy sárgás pártá, imbricatus (tetőcserepszerű) vagy jobbra irányuló aestivatio, valamint a maghéj szemcsés (granulate) vagy gumós (tuberculate) jellege (BREMER 1987).

A *Cosmocalyx* (STANDLEY 1930), *Simira* (AUBLET 1775, LORENCE és DWYER 1988), *Eizia* (STANDLEY 1940) és *Plocaniophyllon* (BRANDBERGEE 1914), valamint a *Syringantha* (STANDLEY 1930) nemzetségeket csak később helyezték a *Hamelieae* tribuszba.

A tribuszt DELPRETE (1998) 9 nemzetséggel írta le: *Hamelia*, *Deppea*, *Hoffmannia*, *Omitemia*, *Pinarophyllon*, *Eizia*, *Plocaniophyllon*, *Syringantha*, *Cosmocalyx* (*Simia* nélkül). DELPRETE és KOEK- NOORMAN (2005) hozzáadta a *Chione* (DE CANDOLLE 1830), *Colleteria* (D. W. TAYLOR 2003) és *Patima* (AUBLET 1775) nemzetségeket.

ROBBRECHT és MANEN (2006) tanulmányában az egynél több faj által képviselt *Deppea*, *Hamelia* és *Hoffmannia* nemzetségek monofiletikusnak bizonyultak. MANNS és BREMER (2010) átfogó molekuláris analízisei javasolták a *Chione* és *Colleteria* kizárását a *Hamelieae* tribuszból, és megerősítették a következő morfológiai karakterek fontosságát annak jellemzésében: szinte mindig murvalevél nélküli virágzatok, gyakran sárga vagy sárgás virágok, maghéj szemcsés (granulate) vagy gumós (tuberculate) jellege (MANNS és BREMER 2010).

A *Deppea* nemzetséget először CHAMISSO és SCHLECHTENDAL (1830) írták le, majd LORENCE és DWYER (1988) makromorfológiai vizsgálatok alapján publikálták annak taxonómiáját. Egy brazil *Schenckia* (SCHUMANN 1889), egy mexikói *Edithea* (STANDLEY 1933), egy *Omitemia* (*O. scoti*; KIRKBRIDE 1984) és a panamai *Elaeagia myriantha* (TAYLOR és HAMMER 1993) fajt is STANDLEY egyesítette a génuszban. Ezt a tágabb értelemben vett *Deppea* nemzetséget mikromorfológiai karakterek alapján újabban polifiletikusként értelmezik (BORHIDI és mts. 2004a). Ennek megfelelően, két új nemzetség került leírásra:

Bellizinca (BORHIDI és mts. 2004a) terminális vagy pszeudoaxilláris forgóvirágzattal, levélszerű csészelevelekkel, cső alakú pártával, párta tövén eredő hosszú porzókkal, amelyek alul gyűrűvé forrtak, három osztatú magházzal és lencse alakú magokkal, és *Csapodya* (BORHIDI és mts. 2004a) nagy, csővé forrt pártájú virágokkal, ellaposodott porzósálakkal, amelyek a pártacső közepe fölött erednek, alul sűrűn szőrözött bibeszállal, négy osztatú diszkusszal, apikális felnyílású terméssel valamint oválistól (semiorbiculáris) a moniliformig előforduló magokkal. Az *Edithea*-t újra génusz szintre emelték STANDLEY által megadott karakterek alapján: gyertyatartó alakú párta, subsessilis peltátus porzók, amelyek a párta torkából erednek (BORHIDI és mts. 2004a).

A szűkebb értelemben vett *Deppea* fajok morfológiai vizsgálata során szignifikáns különbségeket találtak a termések morfológiájában. Ennek eredményeként 5 fajt (*D. hernandezii*, *D. foliosa*, *D. anisophylla*, *D. tubeana*, *D. tenuiflora*) henger vagy hosszúkás alakú hypanthiummal, 2-4-szer hosszabb mint széles termésekkel, amelyeken 8 sűrűn rendezett hosszirányú erezettség figyelhető meg, hosszúkás-egyenes placentával, és apikális vagy septicid termésfelnyílással, egy új génuszba helyezték át, amely a *Deppeopsis* nevet kapta (BORHIDI és STRANCZINGER 2012).

Az *Omiltemia* génuszt STANDLEY 1918-ban írta le, mint monotipikus nemzetséget, majd MORTON (1968) hozzáadta a *Kohleria filisepala*-t a Gesneriaceae családból. KIRKBRIDE (1984b) belevette az *Edithea*-t, amit BORHIDI és mts. (2004b) vizsgáltak felül és javasolták annak kivételét, valamint leírtak egy új génuszt a *Pseudomiltemia*-t a *P. filisepala*-ra alapozva, amelyre jellemzőek a rövid, párta torkából eredő porzósálak, toktermés kiemelkedő hosszirányú vagy körkörös bordákkal, inkább apikális vagy lokulicid, mint septicid felnyílással. Ezzel szemben az *Omiltemia*-t a hosszú lapított porzósálak jellemzik, amelyek a párta aljából erednek, valamint a csúcsi részen körkörös bordák nélküli hosszúkás termések, először apikális majd egészen a toktermés aljáig tartó septicid hasadással (BORHIDI és mts. 2004b). Nemrégiben egy új *Pseudomiltemia* fajt is leírtak, a *P. davidsonii*-t (MARTINEZ-CAMILO és mts. 2011).

A *Renistipula* (BORHIDI és mts. 2004c) taxonómiája is bizonytalan. A génusz három fajtát STANDLEY és STEYERMARK (1940) írta le mint a *Rondeletia* (LINNAEI 1753) nemzetség tagjait. Később az *Arachnothryx*-be (PLANCHON 1849) lettek áthelyezve a fauciális gyűrű nélküli négy osztatú párta és septicid felnyílású termések alapján (BORHIDI 1982). *Renistipula* néven, új génuszként BORHIDI és mts. (2004c) mutatták be az *Arachnothryx* fajok elkülönítésével, a következő morfológiai karakterek alapján: nyeles, kör vagy vese alakú, bőrszerű pálhalevelek, konvex, két osztatú magház, apikális, majd septicid felnyílású

toktermés. LORENCE (2005) elhamarkodottnak találta a fajok áthelyezését és jelezte, hogy az új génusz elkülönítése megkérdőjelezhető, így további molekuláris megközelítésű vizsgálatokat javasolt az *Arachnotryx* és *Renistipula* nemzetségek filogenetikai kapcsolatainak feltárásához.

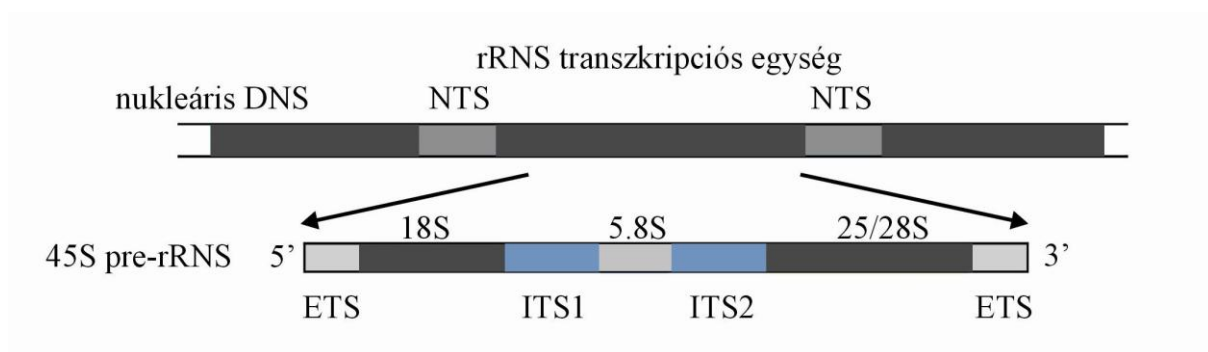
Mindent egybevetve az evolúciós kapcsolatok a Hamelieae tribuszban még mindig megoldatlanok (MANNS és BREMER 2010).

2.4. A vizsgált DNS szakaszok

2.4.1. Az ITS (Internal Transcribed Spacer) szekvenciák jellemzői

A 18S, 5,8S és 25S citoplazmatikus riboszómális RNS génjét kódoló DNS (rDNS) jelenti az egyik fő ismétlődő, ismert funkciójú szekvencia családot az eukarióta genomban. Az rDNS-gének tandem elrendeződésben találhatók, egy vagy néhány csoportosulásban. Növényekben az rDNS-eket kódoló egységek hossza 7,8 kilobázistól 18,5 kilobázisig terjed, ismétlődő tagszámuk pedig 600-tól 8500 darabig. Mindegyik egység a 18S, 5,8S és 25S RNS-t kódoló részből és az egységeket szétválasztó, ún. intergenikus DNS-szakaszból áll (LONG és DAWID 1980). Ezek az intergenikus DNS szakaszok közötti spacer szekvenciák az ITS (internal transcribed spacer) szekvenciák, amelyek elegendő különbséget biztosítanak akár közeli rokonsági körbe tartozó fajok elkülönítésére is. A DNS-ben elfoglalt helyüket az 1. ábra mutatja.

Az átíródó egységek konzerválódásával ellentétben az ismétlődéseket elválasztó intergenikus szekvenciák igen változatosak (LONG és DAWID 1980). Az intergenikus részekben található kisebb hosszúságú alegységek gyakran sokszorozódnak meg vagy szenvednek deléciókat. Az intergenikus ismétlődések gyors fejlődése származástani vizsgálatokhoz, illetve növényi fajok megkülönböztetéséhez nyújt pótolhatatlan lehetőséget (MAY és APPELS 1988, SAGHAI-MAROOF és mts. 1984). A repetitív szekvenciák különböző fejlődési iránya és sebessége, valamint a gének erősebben konzerválódott szekvenciája, de egyszersmind különböző szerveződése teszi lehetővé a fajok egymástól való elválasztását.



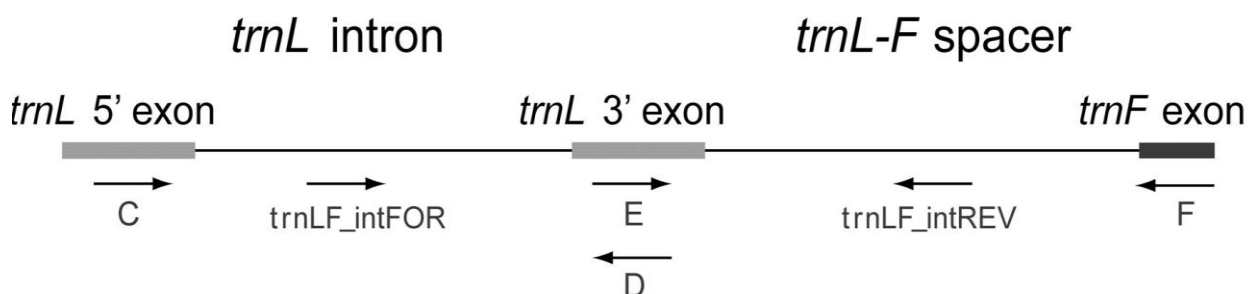
1. ábra: az ITS régió felépítése

2.4.2. A Kloroplaszt *trnL-F* régió felépítése

A kloroplaszt DNS szekvenciákat manapság széleskörűen alkalmazzák a fajok közötti rokonsági kapcsolatok vizsgálatára, viszont az alacsony evolúciós rátája miatt fajon belüli szinten használata erősen korlátozott.

A kloroplaszt DNS *trnT-F* régiója a transfer RNS génekből áll (*trnT_{ugu}*, *trnL_{uua}* és *trnF_{gaa}*), amelyek tandem elrendezésben vannak jelen és nem kódoló régiók választják el őket egymástól. Irányultságát tekintve, hozzávetőlegesen 8 kilobázisnyira található az *rbcL* géntől. A *trnL-F* régió magába foglalja a *trnL* intront és a *trnL-F* spacer-t. A konzerválódott *trn* gének sorrendje és a gén átrendeződéseknek a nyilvánvaló hiánya a *trnT-F* régiót az univerzális primer tervezés potenciális alanyává tette (TABERLET és mts. 1991, PIRIE és mts. 2007).

A nem kódoló régióban játszódnak le a legnagyobb frekvenciájú mutációk, tehát ezen szekvenciák amplifikációja és direkt szekvenálása segítséget nyújt az evolúciós tanulmányokhoz és intraspecifikus genetikai markerek azonosításához.



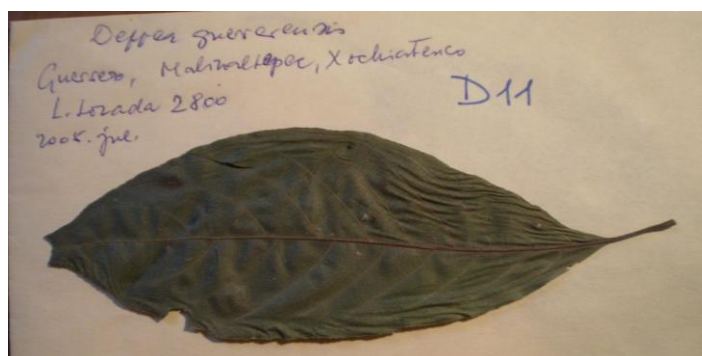
2. ábra: a *trnL-F* régió felépítése

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3. 1. DNS izolálás

A totál DNS tisztítást MEXU (Herbarium of Universidad Nacional Autónoma de México) herbáriumából származó levél anyagból végeztük (3. ábra). A minták homogenizálása folyékony N₂ jelenlétében történt. A DNS kivonáshoz és tisztításhoz Zenogene 40 növényi szövet DNS tisztító kit-et (Zenon Bio Kft., Szeged) használtunk, követve a gyártó leírását. A homogenizált növényi szövetet 500 µl NA és 5 µl NB oldatban szuszpendáltuk. A feltárás után 20 µl NC oldatot adtunk hozzá és a mintát vortexeltük, majd 15 percig 65°C-on inkubáltuk. A feltárt szövetet jégre tettük és 150 µl ND oldatot adtunk hozzá. A jól megkevert és 15 percig jégen állni hagyott mintákat 5 percig centrifugáltuk. ZG⁴⁰ oszlopra pipettáztunk 825 µl NF oldatot, ehhez adtuk a centrifugálás utáni felülúszóból 500 µl-t, és összekevertük, majd 1 percig centrifugáltuk. A csőből a folyadékot ismételtelen eltávolítottuk, és az oszlopot visszahelyeztük a műanyag csőbe. A ZG⁴⁰ oszlopra 750 µl M oldatot pipettáztunk, és ismét 1 percig centrifugáltuk. A csőből a folyadékot eltávolítottuk, és az oszlopot visszahelyeztük a műanyag csőbe. Az előző két lépést megismételtük, és 1 percig centrifugáltunk. Az oszlopot tiszta 2,0 ml-es csőbe helyeztük, az oszlopra pipettáztunk 200 µl 65–70°C-os E oldatot. 5 percig 65–70°C-on állni hagytuk, utána 1 percig centrifugáltuk.

A DNS mennyiségét és minőségét spektrofotometriásan, Nano Drop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, US) ellenőriztük.



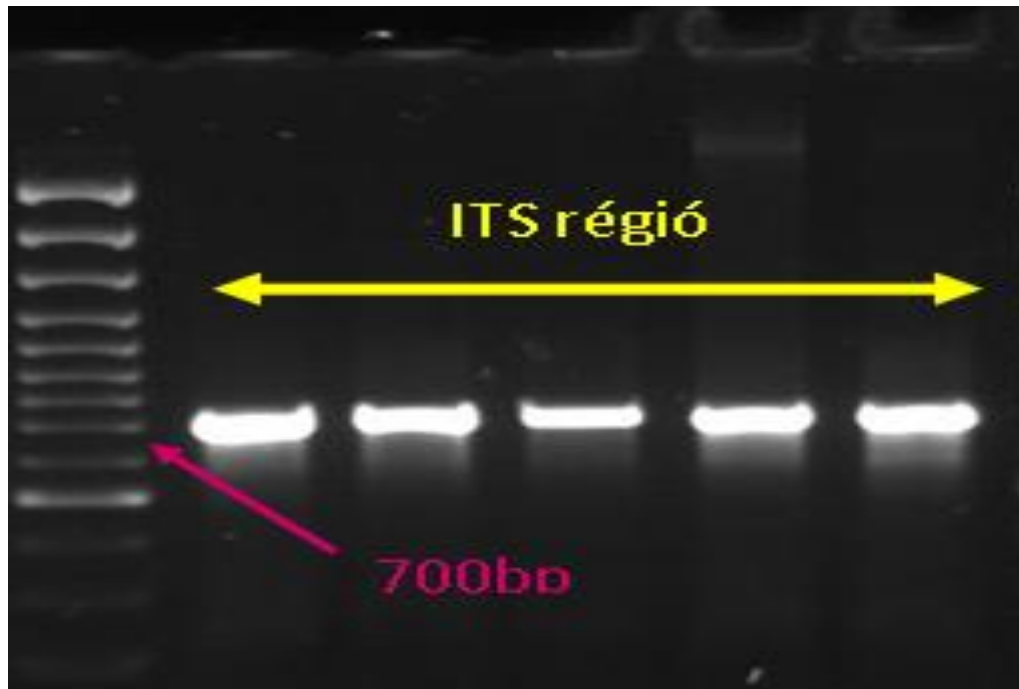
3. ábra: *Deppea guerrerensis* herbárium levele

3.2. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz a 3,6 anhidro D- galaktóz és az L- galaktóz lineáris polimere. Agaróz gélben egy lineáris duplex DNS molekula vándorlási sebessége (elektroforetikus mobilitása) fordítottan arányos a molekula tömegének logaritmusával. Közel semleges pH értékű

oldatban a DNS molekula negatív töltéssel rendelkezik, így elektromos erőterben a pozitív pólus felé fog vándorolni. Ha az oldatban többféle összetételű DNS molekula található, azok a gélben szétválnak elektroforetikus mobilitásuk különbsége szerint. A DNS fragmentek a gélben csak akkor láthatók, ha etidium-bromid interkaláló festéket alkalmazunk, és a gél ultraibolya fénnel megvilágítjuk. A DNS 260 nm, a bázisok közé ékelődött fluoreszcens festék 300 nm illetve 360 nm hullámhossznál rendelkezik elnyelési maximummal. A festék gerjesztés hatására a látható tartományban bocsát ki fényt (590 nm, narancspiros).

Vizsgálatainkhoz az 1%-os agaróz gél 1g porított agaróz és 100 ml 0,5x TBE puffer felhasználásával készítettük, melyet 5x TBE pufferből (54g TRIS; 27,5g bórsav; 20 ml 0,5M EDTA (pH:8); 1000 ml-re kiegészítve bidesztillált vízzel) hígítottunk ki. A DNS mintákat felvitel előtt 5x STOP oldattal kezeltük (2g ficoll; 10 ml 0,5M EDTA (pH:8); 10-40mg brómfenolkék; 20 ml-re kiegészítve kétszeresen desztillált vízzel), mely a futtatási frontot jelezte az elektroforézis során. A STOP pufferben lévő ficoll teszi sűrűvé az oldatot, amelynek köszönhetően a mintát a gél-zsebbe pipetázva a zseb aljára lesüllyed, és nem keveredik a futtató pufferrel (4. ábra).



4. ábra: *Deppea* fajok ITS régiójának futtatásából származó gél fotó

3.3. DNS szakaszok felszaporítása

A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, US) készüléssel történt. A reakcióelegy végtérfogata 23 µl volt, amely a következőket tartalmazta: 2,3 µl DeamTaq™ puffer, 0.5 mM dNTP mix, 1.0 mM a primerekből, 0.5 µg templát DNS, 1 U Dream Taq™ DNS Polimeráz (Thermo Scientific, US). Az ITS régió felszaporítása ITS4 és ITS5 primerekkel (WHITE és mtsi.,1990), a nem kódoló kloroplaszt régió (*trnL* 5' és *trnF* exon között) "C" + "D" valamint "E" + "F" primer párokkal történt TABERLET és mtsi. (1991) nyomán. A primerek szekvenciái az 1. táblázatban találhatók meg.

Oligonukleotid neve	Nukleotid-szekvencia
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
<i>trnL-F</i> C	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trnL-F</i> D	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
<i>trnL-F</i> E	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
<i>trnL-F</i> F	ATTTGAACTGGTGACAGGA

1. táblázat: A használt primerek szekvenciái

A PCR reakció 3 perces 94°C-os denaturációval kezdődik, amit 35 ciklus követ az alábbi lépésekkel: 1 perc 94°C-os denaturáció, 1 perc 50°C-os extenzió (primerek kötődése a komplementer DNS szekvenciákhoz, annealing), 1 perc 72°C-os elongációs szakasz. A program tartalmaz egy 7 perces 72°C-on történő utó polimerizációs záró szakaszt.

Az így felszaporított DNS mintákat 1%-os, etidium-bromiddal festett agaróz gélen futattuk meg, majd GeneJET Gel Extraction Kitet (Thermo Scientific, US) használva tisztítottuk, követve a gyártó utasításait.

A minták szekvenálása Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, US) segítségével történt a fragmentek felszaporításánál használt primerekkel. A nyers szekvenciák ellenőrzése és javítása DNA Baser programmal történt (5. ábra).



5. ábra: *Deppea amaranthina* ITS szekvencia kromatogram részlet a DNA Baser programban

3.4. A szekvenciák statisztikai kiértékelése

A szekvenciák egymáshoz illesztését JalView program segítségével ClustalW módszerrel végeztük alapértelmezett beállításokkal és manuális szerkesztéssel. Az alignmentek optimalizálása során kialakult réseket (gap) hiányzó karakterként kezeltük a végső filogenetikai analízisek során. A kladsztikai analíziseket PAUP*4.0 szoftverrel (SWOFFORD 2001) készítettük a "legnagyobb takarékoság" (Maximum Parsimony, MP) módszerét alkalmazva. Azt az evolúciós fát kerestük, amely a lehető legkisebb számú evolúciós lépést teszi szükségessé a leszármazási viszonyok megmagyarázásához (PODANI 1997). A heurisztikus opció következő elrendezésében kerestük a minimális fákat: csak a legjobb fákat tartsa meg a program, ha többszörösen összetett fák fordulnak elő, a véletlenszerűen hozzáadott szekvenciákat 10.000-szer ismételve cserélje ezeket a fákat a legjobbra, és minden egyes lépésnél csak egy fát tartson meg. A heurisztikus keresés során a lehetséges fák csak egy kis részét vizsgáljuk, arra nincs garancia, hogy megtaláljuk az MP fát. Azonban számos algoritmust használva növelhetjük ennek az esélyét (NEI és KUMAR 2000). TBR (Tree Bisection-Reconnection) algoritmus szerint cseréltük az ágakat úgy, hogy a MULTREES beállítást kikapcsoltuk. A TBR keresésénél az ideiglenes fát egyik ágánál két alfává vágjuk. Ezután ezt a két alfát újra egyesítjük összekötve két ággal, mind-két alfából eggyel, amely így különböző topológiájú fákat eredményezett (NEI és KUMAR 2000).

Az így kapott filogenetikai fa pontosságát és megbízhatóságát Bootstrap (FELSENSTEIN 1985) módszerrel teszteltük. A bootstrap egy újramintavételezési módszer,

amelyben feltételezzük, hogy a mintában lévő m egységre kapható gyakoriság eloszlás a lehető legjobban reprezentálja az eredeti populációban lévő gyakoriságot. A bootstrap mintákat úgy kapjuk, hogy a mintákból m -elemű visszatevéses mintavételezést sokszor egymás után végrehajtjuk. Az egyes bootstrap mintákat valamilyen paraméter becslésére használhatjuk fel. A változók bootstrap újramintavételezésével előállított alternatív fák egyesítésével kapjuk meg a konszenzus fát. Minden elágazást összehasonlítunk az eredeti fa elágazásaival. Eltérés esetén az adott elágazás 0, míg egyező esetén 1 értéket kap. Ezt 1000-szer megismételve az így kapott bootstrap érték %-ban fejezi ki, hogy milyen mértékben egyezett az adott elágazásban a kapott filogenetikai fa az eredetivel (NEI és KUMAR 2000). Ha a bootstrap érték magas volt (85-100%), akkor az elágazás topológiáját alátámasztottnak vettük. Alacsonyabb érték esetén az elágazás nem bizonyos.

A filogenetikai fa statisztikai értékelése magába foglalja a konzisztencia-indexet (CI: Consistency Index, KLUGE és FARRIS 1969) és az összetartozási-indexet (RI: Retention Index, FARRIS 1989) is. Ezek értékei a homopláziát mutatják a filogenetikai fában. A CI minden egyes karakterre megvizsgálja, hogy a változások száma hogyan aránylik az elméletileg elképzelhető minimumhoz. Az adott fában a j -edik karakter s_j változást mutat, holott az adatokra felírható egy olyan fa is, amelyben a minimális számú m_j változás következik be, akkor a $CI_j = m_j/s_j$ hányados fejezi ki a keresett arányt. Ha a fában a lehetséges minimum fordul elő akkor $CI=1$, azaz a karakter nem utal homopláziára. $CI = 0,5$ esetén kétszer annyi változás következett be, mint amennyire minimálisan szükség van. A retention index figyelembe veszi a lehetséges változások maximális számát is (M_j) $RI_j = M_j - s_j/M_j - m_j$, ahol a j -edik karakter s_j változást mutat, holott az adatokra felírható egy olyan fa is, amelyben a minimális számú m_j változás következik be. Értéke annál magasabb, minél kevesebb a homoplázia részesedése a szünapomorfiák kialakulásában. Ha egyáltalán nincs homoplázia, akkor $RI_j = 1$. Ha az összes szünapomorfiát homoplázia okozza, $RI_j = 0$ (PODANI 1997).

A Bayesian analízist MrBayes (RONQUIST és HUELSENBECK 2003) programmal Markov chain Monte Carlo (B/MCMC) módszert alkalmazva végeztük. A Bayes módszer azokat a törzsfákat keresi, amelyek maximalizálják azon törzsfák valószínűségét, amelyek az adatokat és az evolúciós modellt adják. Az optimális modell az lesz, amely maximalizálja az utólagos valószínűséget. A megfelelő szubsztitúciós modellt ModelTest 3.7 (POSADA és CRANDALL 1998) szoftverrel választottuk ki. A legjobban illeszkedő modellek kiválasztása az AIC általánosított kritérium alapján történt (AKAIKE 1974). Két független futtatást végeztünk 6 párhuzamos láncsal, amelyeket 1 millió generációig futtattunk, minden

századikat mintázva. Az első generáció 25%-át burn-innek tekintve eldobtuk, majd a post-burn-in fákból meghatároztuk a többségi konszenzus törzsfát. Az ITS szekvenciákhoz a GTR+I+G modell (general time-reversible= általános, idővel visszaalakuló sztochasztikus modell) a *trnL-F* szekvenciákhoz pedig a GTR+I modell illett a legjobban. A poszterior valószínűség (PP) értékét 95% felett tekintettük erősen támogatottnak.

4. EREDMÉNYEK

Az ITS szekvenciák illesztéséből kapott alignmentet vizsgálva kiderül, hogy a szekvenciák közötti döntő különbségek - mint ahogy az várható is volt - a két intergenikus szakaszra (ITS1 és ITS2) korlátozódik (6. és 7. ábra).

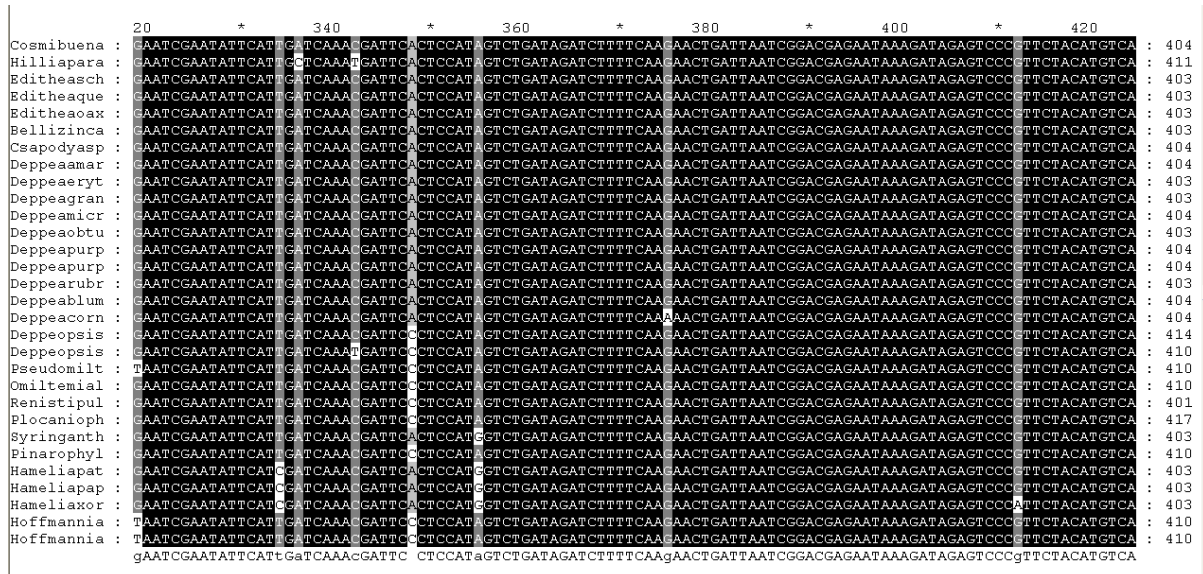
	220	*	240	*	260	*	280	*	300	*	3
Cosmibuena :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	316							
Hilliaipara :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	316							
Deppeopsis :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Deppeopsis :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Deppeopsis :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Bellizinca :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Csapodyasp :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	316							
Csapodyach :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	316							
Editheaoax :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Editheashi :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeamar :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	317							
Deppeaeryt :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeagran :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeaineq :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeamicr :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeabotu :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeapurb :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeapurb :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppearubr :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Deppeablum :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Pseudomilt :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Omilitemial :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Renistipul :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Plocanioph :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	314							
Syringanth :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Hameliaapat :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Hameliaapap :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Hoffmannia :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Hoffmannia :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Hoffmannia :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							
Hoffmannia :	AACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGT	TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCC	:	315							

6. ábra: A konzerválódott 5.8rDNS és az átíródó de nem kódoló ITS2 régió alignment részlete

	20	*	340	*	360	*	380	*	400	*	420	
Cosmibuena :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	415
Hilliaipara :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	421
Deppeopsis :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Deppeopsis :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Deppeopsis :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Bellizinca :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Csapodyasp :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	415
Csapodyach :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	415
Editheaoax :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Editheashi :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeamar :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	416
Deppeaeryt :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeagran :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeaineq :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeamicr :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeabotu :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeapurb :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeapurb :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppearubr :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Deppeablum :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Pseudomilt :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	412
Omiltemial :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Renistipul :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Plocaniph :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Syringanth :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Hameliaapat :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Hameliaapap :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Hoffmannia :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Hoffmannia :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	413
Hoffmannia :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
Hoffmannia :	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414
	TGGGCGTCACGCATCGG	GTGCCACCC	TACACAC	GTGG	GGGTGACGGAT	TTGGCCTCCGTGCC	GGAAGG	GGCGGGCC	TAAAT	GCAGTCTCTCGG	:	414

7. ábra: Az ITS2 régió alignment részlete

A *trnL-F* régióánál is megfigyelhetjük a taxon szekvenciák különbségeit és láthatjuk, hogy azok nemzetség szinten már szemmel láthatóan is elválnak egymástól (8. ábra).



8. ábra: A *trnL-F* régió alignment részlete

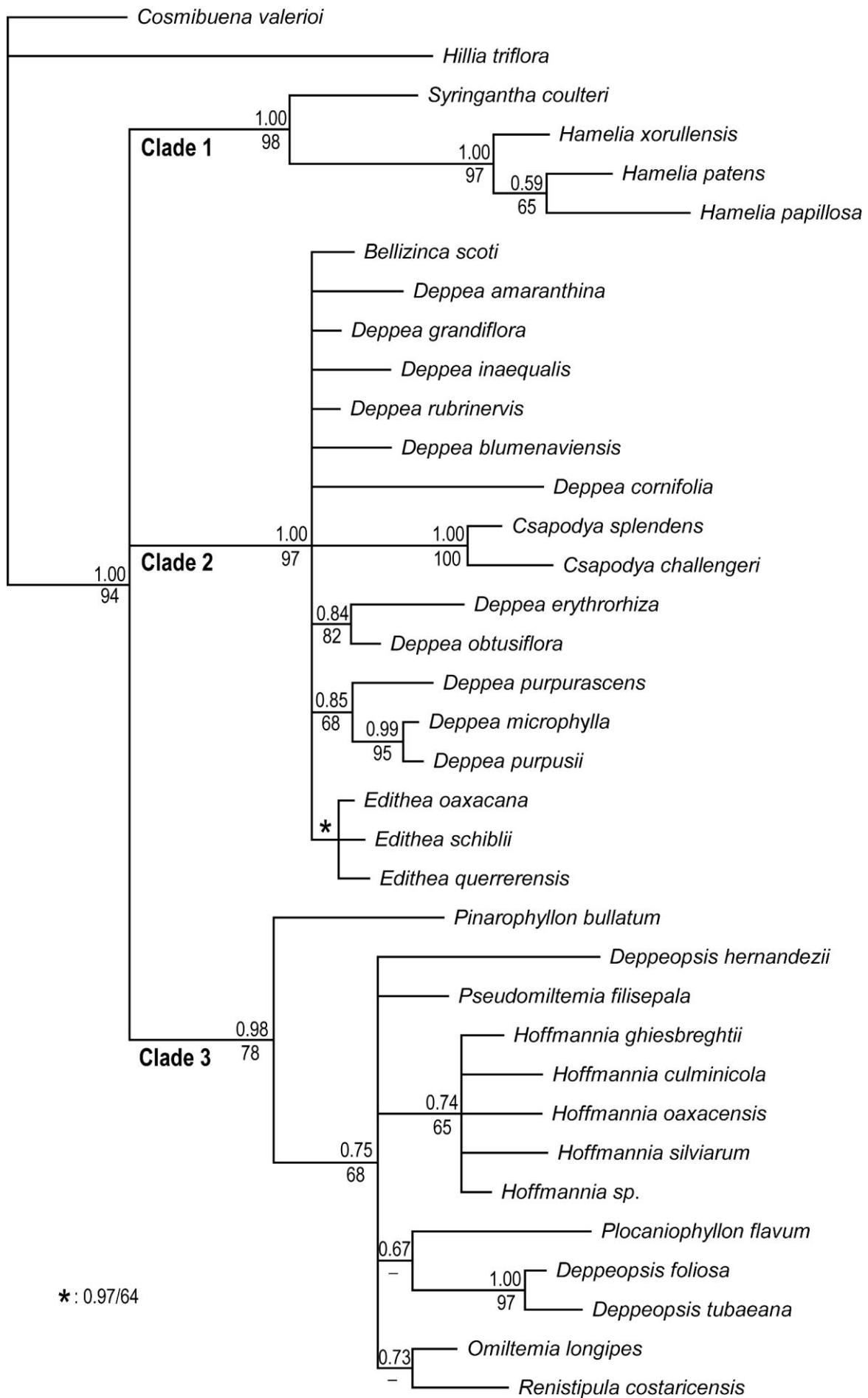
Az ITS és *trnL-F* régiók szekvencia adatait először egymástól függetlenül analizáltuk mind MP, mind pedig Bayesian módszerrel. Az így kapott fák topológiája és a fő ágak támogatottsága megegyezett. Ellentmondás az erősen támogatott csoportok között nem volt megfigyelhető ezért a két adathalmazt egyesítettük egy kombinált analízishez. Az MP módszerrel készített analízis statisztikai adatait a 2. táblázat tartalmazza.

Adathalmaz	ITS	<i>trnL-F</i>	Kombinált ITS/ <i>trnL-F</i>
Alignment mátrix hossza (bp)	495	734	1229
Változó karakterek	115	76	183
Parszimóniailag informatív karakterek	59 (11.9 %)	24 (3.3 %)	83 (6.8 %)
Konzisztencia index (CI)	0.8132	0.8529	0.7774
Retenciós (összetartozási) index (RI)	0.8794	0.8780	0.8607

2. táblázat: MP módszerrel készített statisztikák adatai

A kombinált analízissel kapott konszenzus törzsfát az 6. ábra mutatja a bootstrap (BS) és utólagos valószínűségi (posterior probabilities, PP) értékeket feltüntetve. A törzsfán három erősen támogatott monofiletikus leszármazású klád különíthető el. Az első klád (1,00/98) a

Hamelia, amely tartalmazza a *Syringantha* és *Hamelia* nemzetségeket. A három vizsgált *Hamelia* faj a kládon belül erősen támogatott csoportot képvisel (1,00/97). A második kládban találhatók a *Deppea* taxonok (*Deppea* klád), amelyet a *Deppea*, *Bellizınca*, *Edithea* és *Csapodya* nemzetségekből gyűjtött fajok alkotnak. A *Deppea* kládon belül három csoport különül el erős támogatás mellett: *Csapodya* (1,00/100), a *Deppea microphylla* és *D. purpusii* fajok alkotta csoport (0,99/95), valamint az *Edithea* csoport (0,97/64). Hasonlóképpen a harmadik nagy kládon belül is alcsoportok válnak szét: *Deppeopsis*, *Pseudomiltemia*, *Hoffmannia*, *Plocaniophyllon*, *Omiltemia* és *Renistipula* nemzetségek szerint. Érdekes módon a *Hoffmannia* monofiletikus leszármazása csak gyengén támogatott (0,74/65). A *Deppeopsis foliosa* és *D. tubaeana* erősen támogatott csoportot alkotnak (1,00/97). A *Pinarophyllon bullatum* is erős támogatást kap (0,98/78), mint a *Hoffmannia* klád testvér csoportja.



6. ábra: a kombinált analízisból származó konszenzus filogenetikai törzsfa

5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. A Hamelieae tribusz fő leszármazási kapcsolatai

Vizsgálatunk fő célja az volt, hogy rekonstruálni tudjuk a Hamelieae tribusz törzsféjlődését, megállapítsuk annak filogenetikai kapcsolatait és monofiletikus jellegét.

A kombinált analízisből származó filogenetikai törzsfá alapján (6.ábra) (nukleáris ITS régió és cp *trnL-F* szekvencia adatokból) három fő leszármazási ágat különíthetünk el: Hamelieae klád, Deppea klád és Hoffmannia klád. Ugyanezen kládokat állapította meg MANNS és BREMER (2010), de jelen tanulmány az első, ami pontosan meghatározza a nemrégiben leírt Hamelieae nemzetségek pontos filogenetikai pozícióját. Ezen kívül az alapi elágazások is erősen támogatottak, ami a fokozott mintavételnek és/vagy a *Cosmocalyx* nemzetség kizárásának köszönhető. A *Cosmocalyx* filogenetikai kapcsolatai még mindig megoldásra várnak.

A Hamelieae klád két jól elkülönülő csoportot tartalmaz, amelyeket pentamer virágok jellemeznek. A monotipikus mexikói *Syringantha* nemzetséget tokterméssel és szárnyas magokkal, valamint a neotrópusi *Hamelia* nemzetséget, amelyet húsos bogyótermésekkel és szárny nélküli magokkal írhatunk le. Az utóbbi génusz két szekcióra válik szét: *Hamelia* szekcióra, csöves virágokkal (8 faj) és *Amphituba* (ELIAS 1976) szekcióra, tölcsértől a harang alakúig változó virágokkal. A klád belső szerkezete azonban nem támogatja a két szekció létezését. A korábban MCDOWELL (1996) által javasolt *Syringantha* belefoglalása a Hamelieae-ba támogatást nyert.

A Deppea klád tartalmazza a tágan értelmezett *Deppea* részeit, kivéve a *Deppeopsis*-t, amely a harmadik kládba került. A Deppea kládot jellemzik a tetramer virágok, subapikális, körkörös, szklerenchimatikus kötegű toktermések, apikális felnyílással. Analízisünk nem volt képes megfejteni a filogenetikai kapcsolatokat ezen fajok között, ahogy MANNS és BREMER (2010) analízise sem, amely kevesebb Deppea fajt tartalmazott. Mindazonáltal jelentős eredmény az, hogy három erősen támogatott monofiletikus csoport (*Csapodya* spp., *Edithea* spp., *Deppea microphylla* és *Deppea purpusii*) fedezhető fel a kládon belül.

A törzsfá harmadik kládja a legváltozatosabb, 7 vagy 8 nemzetséget foglal magába: *Pinarophyllon*, *Deppeopsis*, *Pseudomiltemia*, *Hoffmannia*, *Plocaniophyllon*, *Omiltemia* és *Renistipula*. A *Plocaniophyllon* és *Pinarophyllon* beleszámítása a Hamelieae tribuszba erősen támogatott, mint ahogy MANNS és BREMER (2010) tanulmányában is. Mindkét analízisben a *Pinarophyllon* az összes többi taxonnak (*Hoffmannia*, *Plocaniophyllon*,

Omitemia/Pseudomitemia) a testvér kládjaként van jelen, viszont a kládon belüli közös morfológiai karakterek még feltárássra várnak.

5.2. A Hamelieae tribusz nemzetség szintű értékelése

A Hamelieae tribusz evolúciós kapcsolatainak megfejtése lehetővé teszi annak taxonómiai újragondolását. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy a három kládon belüli filogenetikus kapcsolatok még bizonytalanok.

A *Deppea* kládon belül a *Csapodya* jól támogatott szubkládot alkot, abban az esetben, ha több mint egy fajt veszünk bele az analízisbe, ellentétben MANNS és BREMER 2010-es tanulmányával. Egyrészt fontos rámutatni, hogy a *Csapodya splendens* és *C. challengerii* szemmel láthatóan is két külön faj, mint ahogy azt BORHIDI és REGES-GRACIA (2007) javasolták és nem pedig szinonimái egymásnak, ahogy azt LORENCE (2012) vélte. Ezeket a fajokat jellemzik a tölcsérré forrt pártájú virágok, a pártacsó közepe felett eredő ellaposodott porzószerű porzók, az alul sűrűn szőrözött bibeszál, a négy osztatú diszkusz, az apikális felnyílású termés és az oválistól (semiorbicularis) a moniliformig előforduló magok (BORHIDI és mts. 2004a).

A *Deppea* kládon belül az *Edithea* szubklád három fajt foglal magába (*E. guerrensis*, *E. oaxancana*, *E. schibliei*), monofiletikussága támogatott. A támogatottsági értékek (0,97/64) ellentmondások, ezért csak nagy óvatossággal alkalmazhatóak az *Edithea* fajok nemzetség szintű elhatárolásához. Az *Edithea* fajokra jellemzőek a nagy és sok virágú kettősbog virágzatok, cső vagy gyertya alakú virágokkal, párta torkában ülő porzók valamint a csúcsán domború magház (BORHIDI és mts. 2004a). Érdekes módon a *Deppea microphylla* és *D. purpusii* is jól támogatott monofiletikus egységet képviselnek. A *D. purpurascens*-el együtt ezeknek a fajoknak kicsi, kevés virágú, levélhórnálji forgóvirágzatuk van. A porzók a párta aljához közel erednek, a magház csúcsa lapos. Ennek a három *Deppea* fajnak közös ismertetőjegye az *Edithea* fajokkal és a *Deppea erythroriza*-val együtt a piros festékanyag előfordulása a kéreg alatti és fás szövetekben. A többi *Deppea* taxon és a *Bellizinca scoti* egy politómikus egységet alkotnak. Az ide tartozó hat *Deppea* fajnak (*D. amaranthina*, *D. grandiflora*, *D. inaequalis*, *D. rubrinervis*, *D. blumenaviensis*) közös bélyege a terminális vagy pseudo-axilláris, kettősbogas, sok virágú sátorvirágzat, míg a *Bellizinca* forgóvirágzattal jellemezhető (BORHIDI és mts. 2004a). A piros festékanyag szemmel látható hiánya a kéreg alatti szövetekben mind a hét taxonnál közös tulajdonság. Ahhoz, hogy megkapjuk ennek a jelenségnek a magyarázatát és, hogy megfejtjük a *Deppea* fajok filogenetikai kapcsolatait, további analízisek szükségesek, amelyeknek alapja a megfelelő és

sok mintavétel. Ezen analízisek talán segíthetnek a *Csapodya*, *Edithea* és a monotipikus *Bellizinca* pontos elhelyezésében, mivel jelen filogenetikai rekonstrukció nem elég informatív, hogy megoldja ezen bizonytalanságokat.

A *Hoffmannia* kládba tartozó *Deppeopsis* (BORHIDI és STRANCZINGER 2012) két egységre válik szét: *D. hernandezii* (a génusz típusfaja) három tagú levelekkel, ramiflóriás virágzatokkal, nagy virágokkal és termésekkel, valamint az erősen támogatott *D. foliosa* és *D. tubaeana* csoport, amelyre az ellentétesen álló levelek, a forgóvirágzat, a kis virágok és termések jellemzőek. Jelen adatok a *Deppeopsis* monofiletikusságát nem támogatják, taxonómiai elkülönítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Mindazonáltal eredményeink erősen támogatják a *Deppeopsis* taxonok kivételét a tágan értelmezett *Deppea* nemzetségből, ellentétben LORENCE és DWYER (1988) tanulmányával, amelyben a *Deppea*-t monofiletikusként írták le. MANNS és BREMER (2010) átfogó molekuláris tanulmánya látszólag támogatja a *Deppea* monofiletikus eredetét, azonban ez valószínűleg a korlátozott mintavételezésnek tulajdonítható. Ahogy azt a szerzők is jelezték, analízisük az egész Cinchonoideae alcsaládra fókuszált és nem arra, hogy megállapítsák a nemzetségeken belüli leszármazási kapcsolatokat, így nem elemezték *Deppeopsis* szekvenciákat.

A *Hoffmannia* nemzetség monofiletikus jellege a kládon belül alacsonyan támogatott. Egyrészt ez a hiányos mintavételezés eredménye lehet, főleg, ha figyelembe vesszük, hogy a *Hoffmannia* a Hamelieae tribusz legnagyobb génusza. Másrészt ez a felfedezés mutathatja a génusz para- vagy polifiletikus jellegét, amely a jövőben felülvizsgálatra szorul, ahogyan azt DELPRETE és JARDIM (2012) javasolták. Érdeemes megjegyezni, hogy MANNS és BREMER (2010) által bemutatott filogenetikai törzsfán sem támogatott a *Hoffmannia* génusz monofiletikussága. A további vizsgálatok esetében nagyon fontos, hogy minél több *Hoffmannia* taxont vegyenek be az elemzésekbe elsősorban azért, hogy el lehessen dönteni a *Deppeopsis*, *Pseudomiltemia*, *Plocaniophyllon*, *Omiltemia* és *Renistipula* *Hoffmannia* nemzetséghez viszonyított helyzetét.

Tanulmányunk fontos információkhoz vezetett a *Renistipula* nemzetség klasszifikációját illetően, a génusz bevétele a *Hoffmannia* kládba erősen támogatott. Ez az információ feltárja a génusz pontos taxonómiai kapcsolatait. A fajok *Rondeletia*-ba vétele, ahogyan azt STANDLEY (1918, 1940) javasolta, nem tűnik helyesnek. Ahogyan az sem megfelelő, hogy BORHIDI (1982) az *Arachnothryx*-be helyezte. Ezt követően BORHIDI és mts. (2004c) elkülönítették a *Renistipula*-t mindkét nemzetségtől mint új génuszt a következő karakterek alapján: korong vagy vese alakú, bőrszerű (coriaceous) pálhalevelek, konvex, két osztatú magház, először apikális majd szeptoid termésfelnyílás, egy vagy két tagú magok.

Azonban LORENCE (2005) további molekuláris vizsgálatokat indítványozott, annak érdekében, hogy a *Renistipula* megerősítést nyerjen mint a Hamelieae tribusz külön nemzetsége.

A harmadik klád belső ágai nem nyertek elég támogatottságot ahhoz, hogy el lehessen dönteni az *Omiltemia* és *Pseudomiltemia* taxonómiai kapcsolatát. MANNS és BREMER (2010) tanulmányában a *Pseudomiltemia filisepala* (*Omiltemia filisepala*-ként szerepeltetve) jól támogatott kládot alkot a *Hoffmannia* taxonokkal. Jelen esetben az *Omiltemia* (*O. longipes*-el képviselve) gyengén támogatott kládot formál a *Renistipula*-val, míg a *Pseudomiltemia* (*P. filisepala*-val képviselve) politómikus elágazást mutat a következő szinten a másik két nemzetséggel.

Összefoglalva, eredményeink BREMER (1987, 2009) elgondolásaival egybevághóak és támogatják a Hamelieae tribusz megerősítését, mint monofiletikus egységet. Viszont a morfológiai vizsgálatok mellett több hangsúlyt kellene fektetni a molekuláris szekvencia adatokra és a fokozott taxon mintavételezésre, így segítve a tribusz taxonómiai kategóriáinak újragondolását.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kombinált morfológiai és filogenetikai vizsgálatok ellenére sincs egységes nézet a Cinchonoideae alcsalád szekcióinak elkülönítésére. Munkánk során a Hamelieae tribusz belső tagolódásának megismerése érdekében két DNS szakasz, az ITS régió és a kloroplaszt *trnL-F* régió filogenetikai analízisét végeztük el.

Az ITS és *trnL-F* régiók szekvencia adatait először egymástól függetlenül analizáltuk mind MP, mind pedig Bayesian módszerrel. Mivel az erősen támogatott csoportok között nem volt különbség és a törzsfák hasonlítottak, ezért az adatokat összevontuk egy kombinált analízishez.

A kombinált analízissel kapott konszenzus törzsfán a vizsgált taxonok három kládba csoportosultak (Deppea-, Hamelia- és Hoffmannia klád). Eredményeink alapján bizonyítottuk a *Deppea* s.l. nemzetség polifiletikus voltát és javasoljuk a *Deppeopsis* nemzetség kizárását abból, amelynek létét morfológiai jellemzőkben tapasztalható különbségek is alátámasztják.

Szükségesnek ítéljük a *Csapodya* és *Edithea* fajok taxonómiai helyzetének újragondolását. Molekuláris szinten is bizonyítottuk a vizsgált két *Csapodya* taxon (*Csapodya splendens* és *C. challengerii*) fajszerűtű elkülönítését.

Az eddig elfogadott nézettel ellentétben igazoltuk az *Omiltemia* és *Pseudomiltemia* nemzetségek elválasztását.

Megerősítést nyert a korábbiakban kizárólag morfológiai karakterek alapján vizsgált és elhelyezett *Renistipula* nemzetség Hamelieae tribuszba sorolása.

Eredményeink támogatják a Hamelieae tribusz megerősítését, mint monofiletikus egységet.

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- ADANSON M. (1763): Aparines. In: Familles des plantes. **2**: 140-147. Vincent, Paris.
- AKAIKE H. (1974): A New Look at the Statistical Model Identification. IEEE Transactions on Automatic Control. **19** (6): 716–723.
- ANDERSSON L. (1995): Tribes and genera of the Cinchoneae complex (Rubiaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. **82**: 409–427.
- ANDERSSON L., ANTONELLI A. (2005): Phylogeny of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae), its position in Cinchonoideae, and description of a new genus, Ciliosemina. Taxon. **54**: 17–28.
- ANDERSSON L., PERSSON C. (1991): Circumscription of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae) – a cladistic approach. Pl. Syst. Evol. **178**: 65-94.
- ANDERSSON L., ROVA J. H. E. (1999): The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubiaceae. Pl. Syst. Evol. **214**: 161-186.
- AUBLET F. (1775): Histoire des plantes de la Guiane Françoise: rangées suivant la méthode sexuelle, avec plusieurs mémoires sur différens objects intéressans, relatifs à la culture & au commerce de la Guiane Françoise, & une notice des plantes de l'Isle-de-France. Fusée Aublet. Paris: Londres.
- BORHIDI A. (1982): Studies in Rondeletieae (Rubiaceae) III. The genera Rogiera and Arachnothryx. Acta Bot. Hung. **28**: 65-72.
- BORHIDI A. (2012): Rubiáceas de México. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- BORHIDI A., DARÓK J., KOCSIS M., STRANCZINGER SZ., KAPOSVÁRI F. (2004a): Critical revision of the *Deppea* complex (Rubiaceae, Hameliaea). Acta Bot. Hung. **46**: 77-89.
- BORHIDI A., DARÓK J., KOCSIS M., STRANCZINGER SZ. (2004b): Critical revision of the *Omiltemia* complex (Rubiaceae, Hameliaea). Acta Bot. Hung. **46**: 69-76.
- BORHIDI A., DARÓK J., KOCSIS M., STRANCZINGER SZ., KAPOSVÁRI F. (2004c): El Rondeletia Complejo en México. Acta Bot. Hung. **46**: 91-135.
- BORHIDI A., MARTINEZ-SALAS E., SALAS-MORALES S. (2010): Estudios sobre Rubiáceas Mexicanas XXVII. Una revisión breve y cuatro especies nuevas del género *Deppea* (Hamelieae). Acta Bot. Hung. **52**: 49-65.
- BORHIDI A., REYES-GARCÍA A. (2007): Estudios sobre Rubiáceas Mexicanas XI. Revisión del género *Csapodya* Borhidi (Rondeletieae), endémico de Chiapas con tres especies. Acta Bot. Hung. **49**(1-2): 13-25.

- BORHIDI A., STRANCZINGER SZ. (2012): *Deppeopsis*, un género nuevo (Hameliaceae, Rubiaceae) de México y Guatemala. Acta Bot. Hung. **54**(1-2): 85-90.
- BRANDEGEE T. S. (1914): Plantae Mexicanae Purpusianae VI. In.: University of California Publications of Botany. Berkeley: University of California Press. **6**: 517pp.
- BREMEKAMP C. E. B. (1952): The African species of *Oldenlandia* L. sensu Hiern. et Schuman. Verh. Akad. Wet. Amst. **48**: 1-297.
- BREMEKAMP C. E. B. (1966): Remarks on the position, the delimitation and the subdivision of the Rubiaceae. Acta Bot. Neerl. **15**: 1-33.
- BREMER B. (1987): The sister group of the Paleotropical tribe Argostemmatae: A redefined Neotropical tribe Hameliaceae (Rubiaceae, Rubioideae). Cladistics **3**: 35-51.
- BREMER B. (1992): Phylogeny of the Rubiaceae (Chiococceae) based on molecular and morphological data-useful approaches for classification and comparative ecology. Ann. Missouri Bot. Gard. **79**: 380-387.
- BREMER B. (1996a): Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. Cladistics **12**: 21-40.
- BREMER B. (1996b): Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. Opera Bot. Belg. **7**: 33-50.
- BREMER B. (2009): A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. Ann. Missouri Bot. Gard. **96**: 4-26.
- BREMER B., JANSEN R. K. (1991): Comparative restriction site mapping of the chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within the Rubiaceae. Amer. J. Bot. **78**: 198-213.
- BREMER B., STRUWE L. (1992): Phylogeneny of the Rubiaceae and the Loganiaceae: Congruence or conflict between morphological and molecular data. Amer. J. Bot. **79**: 1171-1184.
- BREMER B., ANDREASEN K., OLSSON D. (1995): Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on *rbcL* sequence data. Ann. Missouri Bot. Gard. **82**: 383-397.
- BREMER B., THULIN M. (1998): Collapse of Isertieae, re-establishment of Mussaendeae, and a new genus of Sabiceae (Rubiaceae); phylogenetic relationships based on *rbcL* data. Pl. Syst. Evol. **211**: 71-92.
- BREMER B., JANSEN R. K., OXELMAN B., BACKLUND M., LANTZ H., KIM K. J. (1999): More characters and more taxa for a robust phylogeny-case study from the coffee family (Rubiaceae). Syst. Biol. **48**: 413-435.
- CHAMISSE L. A., SCHLECHTENDAHL D. F. L. (1830): *Deppea* n. gen. Linnaea **5**: 1-756.
- DECANDOLLE A. P. (1830): Rubiaceae. Prodomus. Paris: Treuttel & Würtz. **4**: 341-622.

- DELPRETE P. G. (1998): Notes on calycophyllous Rubiaceae. Part III. Systematic position of the monotypic Mexican genus *Cosmocalyx* and notes on the calycophyll development. *Brittonia* **50**: 309-317.
- DELPRETE P. G. (2004): Rubiaceae. In: Smith N. P., Heald S. V., Henderson A., Mori S. A., Stevenson D. W. (eds.): Flowering plant families of the American tropics. New York Botanical Garden Press, Bronx, New York, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp. 328-333.
- DELPRETE P.G., CORTÉZ-B R. (2004): A phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using trnL-F and ITS sequence data. *Taxon* **53**: 347– 356.
- DELPRETE P. G., NEE M., KOEK-NOORMAN J. (2005): Resurrection and revision of *Patima* (Rubiaceae, Cinchonoideae, Hamelieae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* **92**: 103-112.
- DELPRETE P. G., JARDIM J. G. (2012): Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* **63** (1): 101-128.
- DOWNIE S. R., KATZ-DOWNIE D. S., CHO K.-J. (1996): Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotid sequences from the chloroplast *rpoC1* intron. *Molec. Phylogenet. Evol.* **6**: 1-18.
- ELIAS T. S. (1976): A monograph of the genus *Hamelia* (Rubiaceae). New York Botanical Garden, Memoirs **26**: 81-144.
- FARRIS J. S. (1989): The retention index and rescaled consistency index. *Cladistics* **5**: 417-419.
- FELSENSTEIN J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- HOOKE J. D. (1873): Rubiaceae. – In: Bentham G., Hooker J. D. (eds.) *Genera Plantarum*. vol. **2**: 7-151. Reeve & Co., London.
- JACQUIN N. J. (1760): *Enumeratio systematica plantarum quas in insulis Caribaeis vicinaque Americae continente detexit nouas, aut iam cognitae emendauit*. Lugduni Batavorum Leiden :Apud Theodorum Haak.
- KIRKBRIDE J. H. jr. (1984a): Manipulus Rubiacearum III. Deppeeae, a new tribe of Rubioideae (Rubiaceae). *Brittonia* **36**: 317-320.
- KIRKBRIDE J. H. jr. (1984b): Review of *Omitemia* (Rubiaceae). *Syst. Bot.* **9** (4): 410-414.
- KLUGE A. G., FARRIS J. S. (1969): Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.

- LINNAEI C. (1753): *Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas...* Holmiae: Impensis Laurentii Salvii 560 pp.
- LONG E. O., DAWID I. B. (1980): Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **43**: 727-764.
- LORENCE D. H. (2005): *Rubiacearum Americanarum Magna Hama, Pars XVII. A new Species and Four New Combinations in Mesoamerican Rondeletieae (Rubiaceae)*. *Novon* **3**: 447-451.
- LORENCE D. H. (2012): *Deppea*. In: Davidse G, Sousa M, Knapp S, Chiang F. eds. *Flora Mesoamericana Vol. IV (2). Rubiaceae, Cordiaceae, Borginaceae, Lamiaceae*. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum (London) 75-78.
- LORENCE D. H., DWYER J. D. (1988): A revision of *Deppea* (Rubiaceae). *Allertonia* **4** (7): 389-434.
- MANNS U., BREMER B. (2010): Towards a better understanding of intertribal relationships and stable tribal delimitations within Cinchonoideae s.s. (Rubiaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **56**: 21-39.
- MARTÍNEZ-CAMILO R., MARTÍNEZ-MELENDÉZ N., PÉREZ-FARRERA M. A, LORENCE D. H. (2011): Una nueva especie de *Pseudomiltemia* (Rubiaceae) de Chiapas, México. *Brittonia* **63**: 198-202.
- MAY C. E., APPLES R. (1988): Variability and genetics of spacer DNA sequences between the ribosomal RNA genes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.* **74**: 617-624.
- MCDOWELL T. (1996): *Syringantha coulteri* (Hooker f.) T. McDowell, a new combination and remarks on the relationships of the monotypic Mexican genus *Syringantha* Standley (Rubiaceae). *Novon* **6**: 273-279.
- MORTON C. V. (1968): A second species of *Omiltemia*. *Baileya* **16**: 98.
- NEI M., KUMAR S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York p. 126-127.
- OXELMAN B., LIDÉN M., BERGLUND D. (1997): Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Pl. Syst. Evol.* **184**: 355-377.
- PIRIE D. M., VARGAS BALCAZÁR P. M., BOTERMANS M., BAKKER T. F., CHATROU W. L. (2007): Ancient paralogy in the cpDNA trnL-F region in Annoaceae: implications for plant molecular systematics. *Am. J. Bot.* **94**(6): 1003–1016.

- PLANCHON A. P. (1849): Flores des Serres. 5: 442-445.
- PODANI J. (1997): Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest. 412pp.
- POSADA D., CRANDALL K. A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14** (9): 817-818.
- RAZAFIMANDIMBISON S.G., BREMER B. (2001): Tribal delimitation of Naucleaeae (Cinchonoideae, Rubiaceae): inference from molecular and morphological data. *Syst. Geogr. Pl.* **71**: 515–538.
- ROBBRECHT E. (1993): Supplement to the 1988 outline of the classification of the Rubiaceae. Index to Genera. – In: Robbrecht E. (ed.) *Advances in Rubiaceae macrosystematics*. *Opera Bot. Belg.* **6**: 173-196.
- ROBBRECHT E. (1988): Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Bot. Belg.* **1**: 1-271.
- ROBBRECHT E., MANEN J. F. (2006): The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-F* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. *Systematics and Geography of Plants* **76**: 85-146.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**(12):1572-4.
- ROVA J. H. E., DELPRETE P. G., ANDERSSON L., ALBERT V. A. (2002): A *trnL-F* cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of Rubiaceae. *Am. J. Bot.* **89**(1): 145-159.
- ROVA J.H.E., DELPRETE P.G., BREMER B. (2009): The Rondeletia complex (Rubiaceae): an attempt to use ITS, *rps16*, and *trnL-F* sequence data to delimit Guettardeae, Rondeletieae, and sections within Rondeletia. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **96**: 182– 193.
- RYDIN C., KAINULAINEN K., RAZAFIMANDIMBISON S.G., SMEDMARK J.E., BREMER B. (2009): Deep divergences in the coffee family and the systematic position of *Acranthera*. *Pl. Syst. Evol.* **278**: 101–123.
- SAGHAI-MAROOF M. A., SOLIMAN K. M., JORGENSEN R. A., ALLARD R. W. (1984): Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 8014-8018.
- SCHUMANN K. (1889): Rubiaceae. In: Martius C.F.P., von Eichler AG, Urban I eds. *Flora Brasiliensis*. Leipzig: Frid. Fleischer. **6** (6): 246.

- SCHUMANN K. (1891): Rubiaceae. In: Engler A., Prantl K. (eds.) Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Engelmann, Leipzig, Germany **4**(4): 1-156.
- STANDLEY P. C. (1918): *Omitelia longipes* Standl. Journal of the Washington Academy of Sciences **8**: 427.
- STANDLEY P. C. (1930): Studies on American plants IV. Publications of the Field Museum of Natural History. Botanical series. Chicago: Field Museum of Natural History.
- STANDLEY P. C. (1933): *Editheia*, a new genus of Mexican shrubs of the family Rubiaceae. Tropical Woods **34**: 1.
- STANDLEY P. C. (1940): Studies on American plants IX. Publications of the Field Museum of Natural History. Botanical series. Chicago: Field Museum of Natural History. **22**: 1-62.
- STANDLEY P. C., STEYERMARK J. A. (1940): Studies on Central American plants I. Publications of the Field Museum of Natural History. Botanical series. Chicago: Field Museum of Natural History, **22**: 219-322.
- STRANCZINGER SZ., GALAMBOS A., SZENASY D., SZALONTAI B. (2014): Phylogenetic relationships in the Neotropical tribe Hamelieae (Rubiaceae, Cinchonoideae) and comments on its generic limits. J. Syst. Evol. in press.
- SWARTZ O. (1788): Nova genera & species plantarum, seu, Prodromus descriptionum vegetabilium: maximam partem incognitorum quae sub itinere in Indiam Occidentalem annis 1783-87. Holmiae, Stockholm, Upsalæ & Aboæ :in bibliopoliis Acad. M. Swederi
- SWOFFORD D. L. (2001): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4. Massachusetts, Sunderland: Sinauer Associates.
- TABERLET O. L, GIELLY G., PAUTOU, BOUVET J. (1991): Universal primers for amplification of tree non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. **17**: 1105-1109.
- TAYLOR C. M., HAMMEL B. E. (1993): Notes on *Elaeagia myriantha*, Comb. Nov. (Rubiaceae). Novon **3** (4): 490-491.
- TAYLOR D. W. (2003): Colleteria D. W. Taylor (Rubiaceae), a new genus from the Caribbean. Systematics and Geography of Plants **73**: 199-208.
- VERDCOURT B. (1958): Remarks on the classification of Rubiaceae. Bull. Jard. Bot. État Brux. **28**: 209-281.
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis M. A., Gelfund D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego pp. 315-322.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani azon személyeknek, akik segítségével támogatták szakdolgozatom elkészülését.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Stranczinger Szilviának, aki szakértelmével, hasznos magyarázataival, tanácsaival és sok-sok konzultációval hatalmas segítséget nyújtott szakdolgozatom elkészítéséhez. Köszönöm Dr. Szalontai Bálintnak a laborhasználattal kapcsolatos hasznos tanácsait és segítőkészségét.

Tisztaszívvvel köszönöm szüleimnek a sok gondoskodást, ami elkísért a tanulmányaim során.

9. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Szénásy Dalma a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- totál DNS kivonást,
- DNS mennyiségi és minőségi ellenőrzését Nano Drop ND-1000 spektrofotométerrel,
- PCR reakciót,
- agaróz gélelektroforézist,
- DNS visszaizolálást ,
- nyers szekvenciák javítását DNA Baser programmal,
- filogenetikai törzsfá készítését témavezetői segítséggel végeztem el.

Pécs, 2014. 07. 01

.....
aláírás