

XXXII. OTDK Biológiai Szekció

**A *Callitriche palustris*, *C. hermaphrodita* és a nemzetség
(*Callitriche*, Callitrichaceae) ázsiai taxonjainak
filogenetikai variabilitása**

OTDK DOLGOZAT

Készítette: KOVÁCS ZOLTÁN

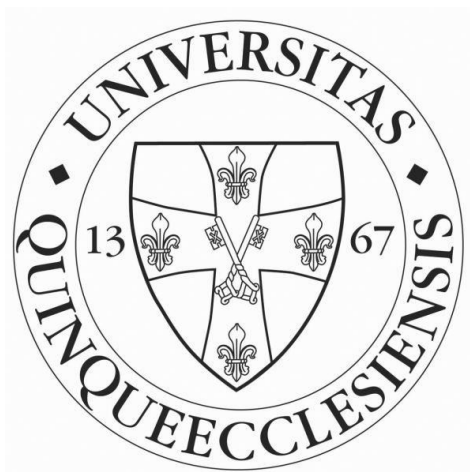
Biológus MSc, II. évfolyam

Témavezető: DR. STRANCZINGER SZILVIA

PTE TTK Biológiai Intézet, Növénybiológiai Tanszék

Konzulens: DR. MESTERHÁZY ATTILA

Magyar Horizont Energia Kft., Budapest



PÉCS, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1 A Callitrichaceae (Mocsárhúrfélék) család rendszertani helyzete.....	5
2.2 A <i>Callitriche</i> nemzetség.....	7
2.2.1 A vizsgált <i>Callitriche</i> fajok jellemzése.....	10
2.3 Filogenetikai kapcsolatok.....	14
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	15
3.1 A vizsgált <i>Callitriche</i> fajok.....	15
3.2 Totál DNS izolálása.....	16
3.3 Agaróz gélelektroforézis (AGE).....	17
3.4 A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása.....	18
3.5 A kapott szekvenciák statisztikai kiértékelése.....	19
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	21
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	26
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	28
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	29

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A taxonómia nemcsak a korábbi évszázadokban, hanem napjainkban is a biológia tudományának egyik alapkövének számító terület. Az élőlények rendszerezése és megismerése elengedhetetlen. Korábban a besorolás a morfológiai vizsgálatok és a kutatók szubjektív véleménye alapján történt, manapság azonban a molekuláris filogenetikai vizsgálatok új lehetőségekkel kecsegtetnek és még letisztultabb, hitelesebb képet adnak a fajok között fennálló rokonsági viszonyokról.

A morfológiai és filogenetikai vizsgálatokkal élénk tárul az élővilág evolúció által megálmodott rokonsági viszonyait bemutató törzsfája, törzsfái. A filogenetikai kutatások középpontjában áll az általunk vizsgált Callitrichaceae familia, más néven a mocsárhúrfélék családja is.

A *Callitriche* (Mocsárhúrok) nemzetség a Callitrichaceae család egyetlen genusa. Jelenleg 75 fajt tartanak számon, ugyanakkor a taxonómiai és a filogenetikai kutatások számos új faj létezését vetítik előre. A mocsárhúrok valamennyien mocsári-, vagy vízínövények, több különböző élőhelyen előfordulnak, a fajok harmada kozmopolitának számít. A nemzetség típusfaja a *C. palustris*, vagyis a tavaszi mocsárhúr, amit Linné azonosított és írt le 1753-ben a *C. hermaphroditica*-val (őszi mocsárhúr) együtt. A vízi életmód miatt változatos levélmorfológia jellemzi a fajokat, vannak alámerült és úszó leveleik is. A virágzatuk erősen redukálódott, makkocskas termésük lehet szárnyas vagy szárnyatlan, ami fontos határozó bélyeg az egyedek azonosításakor. Vannak közöttük igen agresszíven terjeszkedő fajok, de vannak konzolidáltabbak is, amelyek inkább holtágakban, lassú folyású vizekben jellemzők. Olykor monospecifikus állományokat is kialakíthatnak bizonyos élőhelyeken.

Célunk, hogy bemutassuk az általunk megvizsgált mocsárhúr fajok között milyen rokonsági viszonyok állnak fent, és ezt a könnyebb fajsztű azonosítás érdekében a *matK* és az *rbcL* kloroplaszt régióinak vizsgálatával végeztük el.

Az Ázsiában előforduló *Callitriche* fajok rokonsági viszonyairól kevés információ áll rendelkezésre. Kitűntetett célunk, hogy rávilágítsunk és feltárjuk a *Callitriche* genus evolúciós fejlődése során kialakult filogenetikai kapcsolatokat.

Célunk továbbá, hogy igazoljuk a *C. subanceps*, a *C. fimbriata* és a *C. transvolgensis* taxonómiai önállóságát.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A Callitrichaceae (Mocsárhúrfélék) család rendszertani helyzete

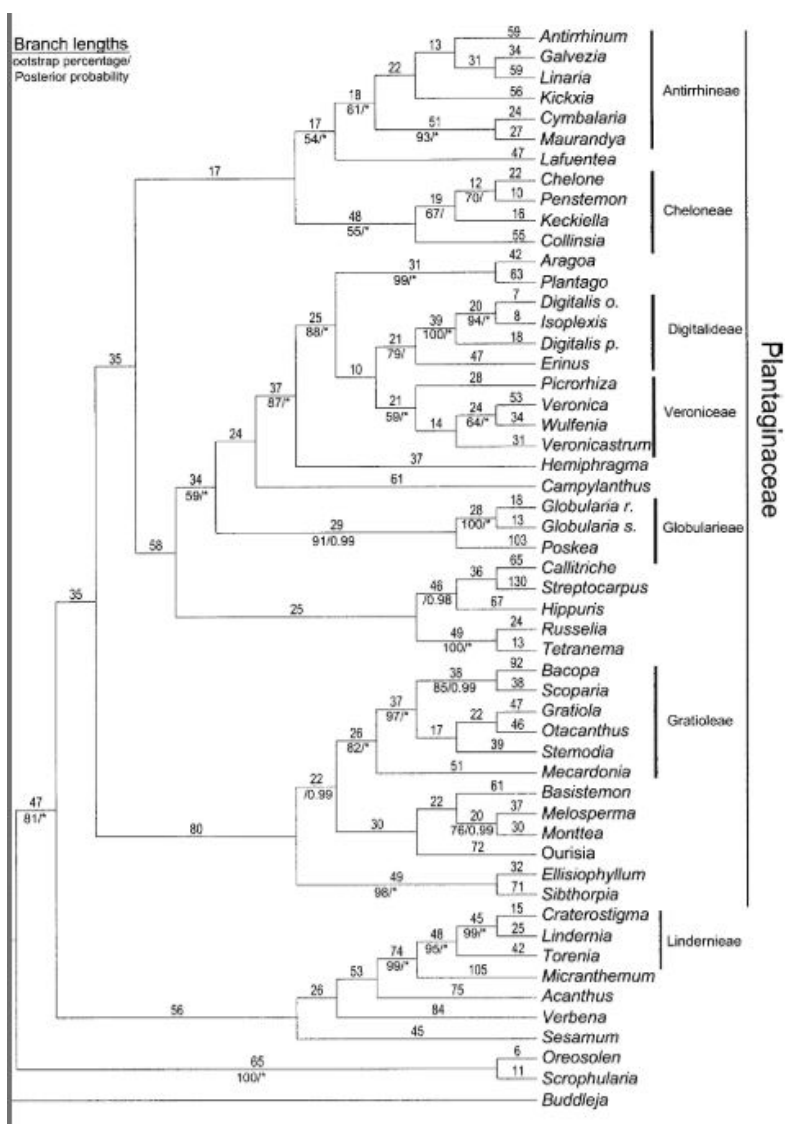
A zárvatermő, kétszikű növények rendszerezésében az elmúlt évek során gyökeres változások történtek. A taxonómusok két rendszertani kategóriát, a törzset és az osztályt kivettek a besorolásból, helyüket a kládok foglalták fel. Két botanikus csoport munkájának köszönhetően 1998 őszén megszületett a zárvatermők modern filogenetikai rendszertani felosztása, az ún. APG (Angiosperm Phylogeny Group) rendszer (APG, 1998). Később a bővülő molekuláris vizsgálatoknak köszönhetően módosításokat eszközöltek és 2003-ban elfogadták az APG II-es rendszert (APG II., 2003), amely mintegy revíziója volt az APG I-nek. Míg az APG I. a rendekre, addig az APG II. már a családokra fektette a hangsúlyt. A 2003-as felosztástól kezdve kládokba sorolták az egyes taxonokat, több családot összevontak, újakat alkottak. A harmadik módosításra 2009-ben került sor, ami az APG III-as rendszerként (1. táblázat) vált ismertté, és ami a mai napig elfogadott a növénytaxonómiában. Az APG II-es rendszerhez képest 14 új renddel bővült az újabb felosztás, és már csak kettő kisebb család és három nemzetség helyzete bizonytalan (APG III., 2009). Az APG III-as rendszer jelenleg 462 családot és 40 rendet számlál.

APG III. rendszer			
Zárvatermők	Egyszikűek		
		Commelinoidae	
	Kétszikűek		
	Valódi kétszikűek (Eudicotidae)	Rosidae	Eurosidae I / <i>Fabidae</i> /
			Eurosidae II / <i>Malvidae</i> /
		Asteridae	Euasteridae I / <i>Lamiidae</i> /
			Euasteridae II / <i>Campanulidae</i> /

1. táblázat. Az APG III. rendszer.

Egy 2005-ben elkészített tanulmányban az útifűfélék családja számos nemzetséggel egészült ki (ALBACH et al., 2005). A tanulmány során a nukleáris ITS, és kloroplasztisz *matK*, illetve *rbcL* génrégiók összehasonlító vizsgálatát végezték el. A *matK* régió kódoló génszakaszokat tartalmaz, vizsgálatával a növényi genomok azonosítása válik könnyebbé (BarCode rendszer). Az *rbcL* régió szintén kódol géneket, pl.: a fotoszintézishez szükséges RuBisCo (Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz) enzimet és 1428 bázispárral rendelkezik.

ALBACH et al. (2005) az útifűfélék (Plantaginaceae) családjának filogenetikai törzsfáját elemezték (1. ábra), amelyből kiderül, hogy a családon belül egy kisebb és egy nagyobb monofiletikus klád különül el. A kisebb kládba az *Oreosolen* és a *Scrophularia* nemzetségek tartoznak, a nagyobbba az általunk is vizsgált *Callitriche* nemzetség, egyéb genusok mellett. A mocsárhúrok a *Streptocarpus* genuszal kerültek egy kisebb egységbe, viszonylag alacsony támogatottság (36%) mellett. A *Callitriche* genushoz legközelebb álló rokon nemzetség, a *Hippuris* genus, közepes támogatottsággal (67%) egy különálló csoportot alkot.



1. ábra. A Plantaginaceae család filogenetikai törzsfája.

Az általunk megvizsgált mocsárhúrok helyzete sem volt egyértelmű a rendszerezés során. Az APG II. revíziójakor a *Callitriche* genust a Plantaginaceae familia, vagyis az útifűfélék családjába sorolták be. A filogenetikai vizsgálatok azonban kiderítették, hogy a mocsárhúrok nem közeli rokonai az útifűféléknek. Az APG III. érvénybe lépésével a nemzetséget különálló családba, a Callitrichaceae-be (Mocsárhúrfélék) helyezték át, és „*nomen conservandum*” jelzővel illették, ami szerint a család nevét és taxonómiai státuszát végleg megőrzi. A mocsárhúrok legközelebbi rokon nemzetsége a *Hippuris* genus, vagyis a vízilófark fajok nemzetsége, amit vizsgálataink során kulcsoportként kezeltünk. A két genus egy tribuszba tartozik.

A jelenleg is elfogadott besorolást a 2. táblázat mutatja.

- Ország: Plantae /Növények/
 - Klád: Angiospermatophyta /Kétszikűek/
 - Klád: Eudicotidae /Valódi kétszikűek/
 - Klád: Euasteridae I /Fészkesek/
 - Rend: Lamiales /Ajakosok/
 - Család: Callitrichaceae /Mocsárhúrfélék/
 - » Nemzetség: ***Callitriche*** /***Mocsárhúrok*** /

2. táblázat. A mocsárhúrok rendszertani felosztása.

2.2 A *Callitriche* nemzetség

A Mocsárhúrfélék családjának egyetlen nemzetsége. A genus 75 leírt fajt tartalmaz, ugyanakkor az újabb, taxonómiai és molekuláris vizsgálatok új fajok létezését valószínűsítik. 26 közülük kozmopolitának számít, Földünk jelentős részén előfordul. Európában 17 faj ismert, amiből kettő nem tekinthető őshonosnak (*C. deflexa*, *C. peploides*), valamint a svéd üvegházból leírt *C. brevistyla* őshonossága is kérdéses. Az európai fajok viszonylag szűk elterjedésűek, a mediterrán térségben rendelkeznek jelentős populációkkal, ugyanakkor az északabbi területeken is képviseltetik magukat.

Hazánkban a *C. palustris* és *C. cophocarpa* található meg közülük. Viszonylag kistermetű, vízi vagy iszapnövények, a sekélyebb tavaktól a mélyebb vizekig előfordulnak (KIRÁLY, 2009). Erre utal angol elnevezésük is: „water-starworts”. Batrachiooid típusú higrofitonok (H), vagyis a medence alján gyökerező vízinövények. A levelek morfológiájára jellemző, hogy kerekdedek vagy hosszúkásak, örvösen vagy pedig párokban állók, illetve fényesek. Az alámerült és az úszó levelek eltérő megjelenést mutatnak, míg az alámerültek

szálasak, hosszúkásak és kisebb mértékű karéjosottság figyelhető meg rajtuk, addig az úszó levelek kerekded formájúak, örvökben állnak és gyakran párnaszerűen beborítják a vízfelszínt (2. és 3. ábrák). A leveleket és a szárat vastag kutikula borítja, meggátolva ezzel a kiszáradást, továbbá hatékony védekezést biztosít a magas UV-sugárzással szemben.



2. ábra. A *C. hamulata* víz feletti levelei.



3. ábra. A *C. hermaphroditica* víz alatti levelei.

A virágok igen egyszerűek, egyivarúak és a vízi életmód következtében erősen redukálódtak. A virágzat kicsi, fehér színű. A termős virág két termőlevélből, a porzós virág egy porzóból alkot összenőtt alsó állású magházat, amelyben a magvak fejlődnek (BORHIDI, 2008). A magházban négy makkocskas termés érik meg, amely lehet szárnyas vagy szárnyatlan. A szárnyaltság jelenléte és hiánya, valamint annak mértéke fontos taxonómiai bélyeg a fajok meghatározásakor, továbbá a magok mérete is lényeges morfológiai tulajdonság (4. ábra).



4. ábra. A *C. stagnalis* virágzata és a *C. palustris* termése.

A magvak csírázókéességüket minimum öt évig megőrzik. A beporzás anemochor és hidrochor módon történik, vagyis a szél és a víz által. A víz általi megporzás lehet víz feletti (epihidrofil) és víz alatti (hipohidrofil), ez utóbbi gyakoribb. Egy ideig a víz felszínén úsznak a magvak, majd elnehezedve lesüllyednek a medence aljára és ott kicsíráznak. Némely fajokra jellemző a geitogámia, vagyis ugyanazon egyed egy virágának porzója egy másik virág termőjét porozza be. Geitogámiát két észak-amerikai (*C. heterophylla* és *C. trochlearis*), és négy dél-amerikai (*C. nubigena*, *C. heteropoda*, *C. lechleri* és *C. rimosa*) mocsárhúr fajon figyeltek meg (PHILBRICK et al., 2000). A fajok többsége évelő (pl.: *C. palustris* és *C. hermaphroditica*) és mind vízben, mind pedig szárazföldön képesek növekedni, de vannak közöttük olyanok is, amik csak vízben tudnak fejlődésnek indulni (pl.: *C. peploides* és *C. nuttallii*). A fajok növekedési üteme eltérő. Több vizes élőhelyen annyira elszaporodhatnak, hogy zavarhatják más ott élő növények és állatok életét. A lassú folyású vizekben és kisebb tavakban pedig sűrű, monodomináns állományokat alkothatnak.

A mocsárhúr fajok azonosításakor az alábbi tulajdonságokat veszik figyelembe (3. táblázat) (PHILBRICK et al., 2000):

Vizsgált tulajdonságok (jelenlét-hiány)	
Felfújt, virágos rozetták	Vannak, nincsenek.
Mirigyes szőr a leveleken	Van, nincs.
Levelek elhelyezkedése	Örvös vagy párban állók.
Geitogámia	Jellemző, nem jellemző.
Virágok egyneműek	Igen, nem.
Csészelevelek jelenléte	Igen, nem.
Termés szárnyaltsága	Jellemző, nem jellemző.
Termésen kocsány	Van, nincs.
Termés elhelyezkedése	Álló, visszahajló.
Sejtfalvastagodások a portokban	Jellemző, nem jellemző.
Pollenfalában exine	Van, nincs.
Exine vastagsága	Jól fejlett, csökkent, nem jellemző.
Sexine morfológiája	Hegyes, kerek, nem jellemző.
Sexine felületi mintái	Sokszögű, szemcsés, nem jellemző.

3. táblázat. A *Callitriche* fajok rendszerezésekor figyelembe vett tulajdonságok (PHILBRICK et al., 2000).

2.2.1 A vizsgált *Callitriche* fajok jellemzése (KOMAROV, 1934)

C. palustris /tavaszi mocsárhúr/ (= *C. verna*) (Linné, 1753)

A tavaszi mocsárhúr a nemzetség típusfaja. 3-50 cm nagyságú növényke. Kozmopolita, mert minden kontinensen képviselteti magát. Évelő. Úszó levelei kerekdedek és örvökben állnak, alámerült levelei vékonyak, sallangosak. A levelek ereztettek és a rozetták megtalálhatók. Virágzata fehér és egyszerű. Termésének felső része szárnyalt, 1,4-2 mm hosszú és 3 mm széles. Örökzöld és gyorsan növekszik. Előfordulási helyek: Kaukázus, Nyugat- és Kelet-Szibéria, Közép-Ázsia, Kamcsatka, Japán, Európa, Észak-Amerika, Izland, Grönland.

C. palustris (5. ábra)



C. hermaphroditica /ősz mocsárhúr/ (= *C. autumnalis*) (Linné, 1753)

Igen elterjedt mocsárhúrfaj. 5-80 cm nagyságú. Évelő. Úszó levelei oválisak, elmerült levelei hosszúkásak, párban állnak; két levél indul egy szárcsomóról. A levelek egy főeret tartalmaznak. Virágzata redukált, egyszerű, egynemű. Termése erősen szárnyalt, 5,5 mm hosszú és 4 mm széles. Monodomináns állományokat képezhet. Előfordulási helyek: Kamcsatka, Közép-Ázsia, Japán, Kína, Európa, Észak-Amerika, Dél-Amerika, Grönland.

C. hermaphroditica (6. ábra)



C. cophocarpa /változó mocsárhúr/ (= *C. polymorpha*) (Loennr., 1804)

A változó mocsárhúr a lassú folyású vizek, tavak növényfaja. 4-30 cm nagyságú. Évelő. Úszó levelei kerekdedek és örvökben állnak, víz alatti levelei hosszúkásak. Virágzata egynemű, fehér. A termése szárnyatlan, 4-6 mm hosszú és 1,2-1,5 mm széles. A tavaszi mocsárhúrral együtt hazánkban előfordul.

C. cophocarpa (7. ábra)



Monodomináns állományokat képezhet. Előfordulási helyek: Kaukázus, Nyugat-Szibéria, Kína, Európa, Japán, Észak-Amerika, Grönland.

C. transvolgensis (Tzvelev, 1975)

A Volga folyó térségére jellemző faj. 4-40 cm nagyságú növényke. Évelő. Úszó levelei örvökben állnak, oválisak, az elmerültek pedig vékonyak, hosszúkásak. Virágzata szintén egyszerű, egyivarú. Termése közepesen szárnyalt, 3,5 mm hosszú és 3 mm széles. Örökzöld és gyorsan növekszik. Előfordulási helyek: Kelet-Európa és Nyugat-Ázsia.

C. transvolgensis (8. ábra)



C. fimbriata (= *C. truncata* subsp. *fimbriata*) (Schotsman, 1967)

A Volga és Don folyó térségének jellegzetes mocsárhúr faja. 5-30 cm nagyságú faj. Évelő. Úszó levelei kicsik és kerekdedek, alámerült levelei hosszúkásak és sallangosak. Virágzata redukált és egyszerű. Termése szárnyalt, 2 mm hosszú, 3 mm széles. Örökzöld és gyorsan növekszik. Előfordulási helyek: Közép-Ázsia, Kelet-Európa.

C. fimbriata (9. ábra)



C. subanceps (= *C. palustris/anceps* subsp. *subanceps*) (Petrov, 1921)

Palearktikus mocsárhúrfaj. 10-20 cm nagyságú. Évelő. Az úszó levelek örvökben állnak, oválisak, az alámerültek pedig szálasak, párosával állók. A leveleken egyetlen főér található, a rozetták időnként lehullnak. Virágzata egynemű és fehér. Termése szárnyatlan, 0,7-0,8 mm hosszú, 2 mm széles. Monodomináns állományokat képezhet. Előfordulási

C. subanceps (10. ábra)

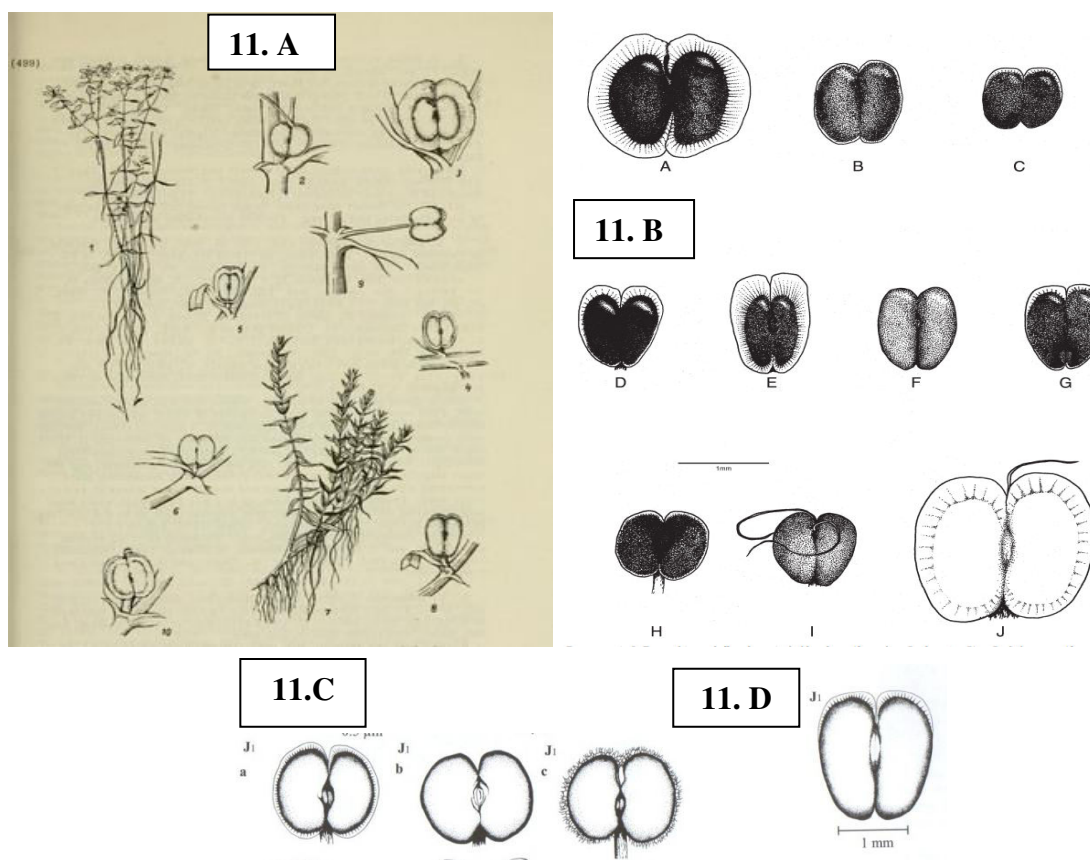


helyek: Közép-Ázsia, Kelet-Szibéria, Kamcsatka.

Határozókulcs az Ázsiában előforduló mocsárhúrokról, Lansdown szerint (LANSDOWN, 2006a)

1a. Termés szárnyatlan.....	2
1b. Termés egyértelműen szárnyalt.....	5
2a. Rozetták jellemzők.....	<i>C. peploides</i> (Nuttall)
2b. Rozetták nem jellemzők.....	3
3a. A leveleken egyetlen főér található, a rozetták lehullnak.....	<i>C. subanceps</i> (Petrov)
3b. A levelek erezettek, a rozetták megmaradnak.....	4
4a. Rozetták kb. olyan hosszúak és szélesek, mint a termés, egyszerű levélerezet jellemző.....	<i>C. palustris</i> L. var. <i>oryzetorum</i> (Petrov)
4b. Rozetták keskenyebbek, mint a termés.....	<i>C. fuscicarpa</i> (Lansdown)
5a. Termés felső része szélesebb, mint az alsó.....	6
5b. Termés középső része széles.....	7
6a. Rozetták hiányoznak, a leveleken 1-3 ér található.....	<i>C. japonica</i> (Engelmann ex Hegelmaier)
6b. Rozetták megtalálhatók, a levelek erezettek.....	<i>C. palustris</i> (L.)
7a. A termés csak a csúcsa körül szárnyalt.....	<i>C. glareosa</i> (Lansdown)
7b. A termés mindenhol szárnyalt.....	8
8a. Rozetták hiányoznak.....	9
8b. Rozetták jelen vannak.....	11
9a. A termés rövidebb 1 mm-nél.....	<i>C. deflexa</i> (A. Braun ex Hegelmaier)
9b. A termés hosszabb 2 mm-nél.....	10
10a. A levelek egy főeret tartalmaznak.....	<i>C. hermaphroditica</i> (L.)
10b. A levelek háromnál több eret tartalmaznak.....	<i>C. wightiana</i> (Wallich in Wight)
11a. A rozetták kisebb, mint 0,5 mm hosszúak.....	<i>C. raveniana</i> (Lansdown)
11b. A rozetták több mint 0,5 mm hosszúak.....	12
12a. A szárnyalt termés kisebb, mint 1 mm nagyságú.....	<i>C. fuscicarpa</i> (Lansdown)
12b. A szárnyalt termés nagyobb, mint 1 mm nagyságú.....	<i>C. fehmedianii</i> (Majeeid Kak & Javeid)

A *C. palustris* és variánsai, illetve a *C. subanceps* hasonló termés-morfológiát mutat, ahogy KOMAROV, LANSDOWN, SCHOTSMAN és TZVELEV munkáit összehasonlítva is látható. (11. A, B, C, D ábrák).



11. A és B ábrák. A *Callitriche* fajok termései.

11. A ábra (KOMAROV, 1934): 1. és 4.: *C. palustris*, 2.: *C. cophocarpa*, 3. és 7.: *C. hermaphroditica*, 5.: *C. elegans*, 6.: *C. fallax*, 8.: *C. subanceps*, 9.: *C. pedunculata*, 10.: *C. stagnalis*.

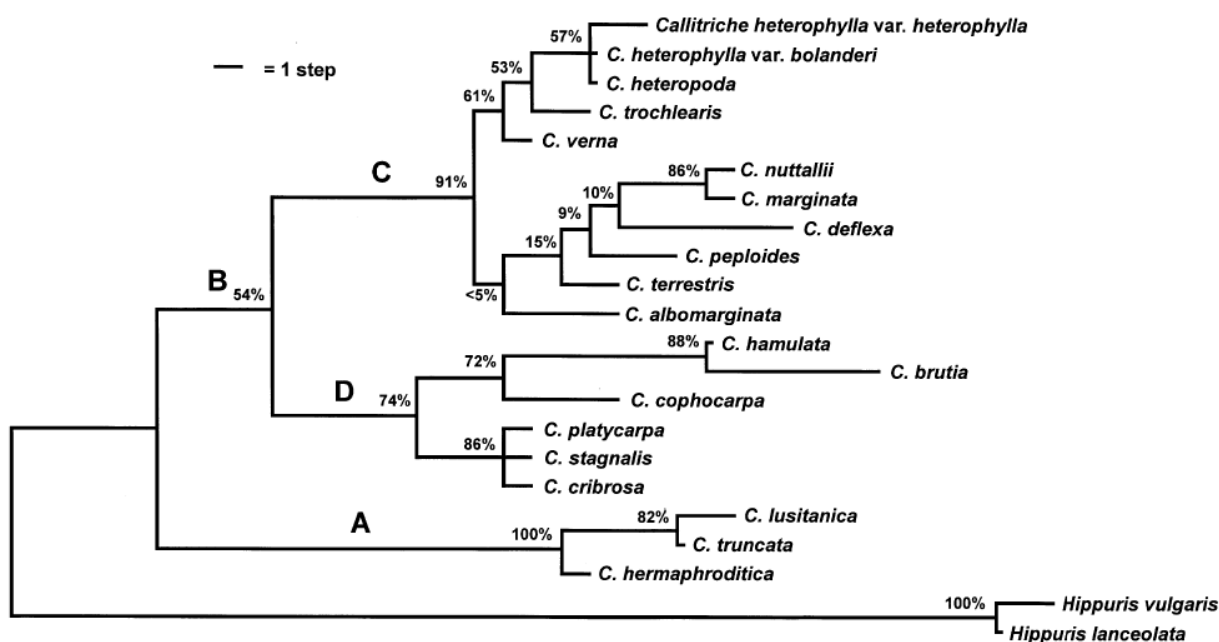
11. B ábra (LANSDOWN, 2006a): A: *C. fehmedianii*, B: *C. fuscicarpa*, C: *C. glareosa*, D: *C. palustris* var. *elegans*, E: *C. palustris* var. *megalata*, F: *C. palustris* var. *oryzetorum*, G: *C. palustris* var. *strumosa*, H: *C. raveniana*, I: *C. subanceps*, J: *C. wightiana*.

11. C ábra (SCHOTSMAN, 1967): *C. fimbriata*.

11. D ábra (TZVELEV, 1975): *C. transvolgensis*.

2.3 Filogenetikai kapcsolatok

A mocsárhúrok rokonsági viszonyainak felderítése több évre nyúlik vissza. Egy 2000-ben készített tanulmány során megvizsgálták az egyes fajok rbcL szekvenciáit és összehasonlították a fajokat az alábbi tulajdonságaikban: A= belső geitogámia jellemző, nem jellemző, B=portok sejtfalvastagodása jellemző/nem jellemző és C/D=exine vastagsága: jól fejlett, csökkent, nem jellemző (PHILBRICK, 2000). A *Callitriche* fajok közt fennálló filogenetikai viszonyokról a 12. ábra ad felvilágosítást.



12. ábra. A mocsárhúrok filogenetikai kapcsolatait bemutató törzsfája.

Külcsoportnak a *Hippuris* genushoz tartozó *H. vulgaris* (közönséges vízilófark) és a *H. lanceolata* (lándzsalevelű vízilófark) fajokat választották. Egy kisebb, erősen támogatott (100%), és egy nagyobb, alacsonyabban támogatott (54%) monofiletikus kládot tudtak elkülöníteni. A kisebb, erősen támogatott (100%) kládon (A) belül, a *C. hermaphroditica*-tól leválva 82 %-os bootstrap érték mellett különálló egységet alkotnak a *C. truncata* és *C. lusitanica* fajok. A nagyobb monofiletikus kládon (B) belül a fajok két jól elhatárolódó egységet alkotnak. A D kládon belül jó támogatottság mellett (88%) a *C. hamulata* és *C. brutia* fajok leválnak, hasonló támogatottságú (86%) a *C. platycarpa*, *C. stagnalis*, és a *C. cribrosa* fajok alkotta egység mellett. A C klád esetében pedig hat faj szinte csekély megbízhatósággal (kevesebb, mint 5 %-kal) egy kisebb csoportot alkot, míg 61 %-os megbízhatósági értékkel leválik a *C. verna* != *C. palustris*/ a szintén alacsonyabban támogatott (57%) *C. heterophylla* és *C. heteropoda* alkotta kisebb csoporttól.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A vizsgált *Callitriche* fajok

A filogenetikai vizsgálatokhoz az alábbi fajokat használtuk fel (4. táblázat). Az egyedek kiválasztásánál fontos szempont az volt, hogy a minták különböző élőhelyről és régiókból származzanak.

Fajok	Származási hely	Gyűjtés ideje	Leíró
<i>Callitriche hermaphroditica</i>	Russia, Magadan region, Susuman distr. 13 km SE from village Burkandiya, lake Khariusovoye	24.08.2012.	A. Bobrov - O. Mochalova
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Magadan region, Susuman distr. 13 km SE from village Burkandiya, thermokarst small lake	24.08.2012.	A. Bobrov - O. Mochalova
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Magadan region, Ola distr. 22 km S from lake, river Lankovaya, below the inflow of river Khady, shallow over the pebble bar, river bay	11.08.2012.	A. Bobrov - O. Mochalova
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Magadan region, Susuman distr. 13 km SE from village Burkandiya, between rivers Byoryolyokh and Malyk-Shien, lake Bolshoe	24.08.2012.	A. Bobrov - O. Mochalova
<i>Callitriche hermaphroditica</i>	Russia, Kamchatka, Elizovo distr., 31 km N from village Ganaly, river Bystraya in oxbow	30.07.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche hermaphroditica</i>	Russia, Kamchatka, Milkovo distr., village Milkovo near Naberezhnaya, ostrog, stream	30.07.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche hermaphroditica</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk, chanel of lake Azabachie, small spring lake	12.08.2013	A. Bobrov
<i>Callitriche hermaphroditica</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk, vicinity of town Ust-Kamchatsk, 1,5 km N from cape Pogodnyi, coast of lake Nerpichie, small lake in tundra	14.08.2014	A. Bobrov
<i>Callitriche hermaphroditica</i>	Russia, Kamchatka, Ust'-Bolsheretsk distr., village Ust-Bol'sheretsk, river Amcigacha	25.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Milkovo distr., village Milkovo near Naberezhnaya, ostrog, stream	30.07.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Milkovo distr., village Milkovo near Naberezhnaya, ostrog, stream	30.07.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Milkovo distr., 13 km SW from village Dolinovka, river Lipatovka (stream Topkii)	02.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk distr., town Kozyrevsk, lake Domashnee	04.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk distr., 18 km SW from town Kozyrevsk, floodplan of river Kamchatka, oxbow near the bridge	05.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk distr., 39 km SW from Ust-Kamchatsk, lake Azabachie eastern part, near channel Azabachiya, constricted small spring lake	10.08.2013.	A. Bobrov

<i>Callitriche subanceps</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk, vicinity of town Ust-Kamchatsk, 2 km N from cape Pogodnyi, coast of lake Nerpiche, lake in tundra	14.08.2014.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Ust-Kamchatsk distr., 0,5 km N from Ust-Kamchatsk, small lake	15.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Ust'-Bolheretsk distr., 8 km SW from village Kavalerskoe, floodplain of river Bolshaya, oxbow	24.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Kamchatka, Ust'-Bolheretsk distr., 3 km NE from Ust-Bol'sheretsk, river Amcigacha	25.08.2013.	A. Bobrov
<i>Callitriche subanceps</i>	Russia, Magadan region, Yagodinskiy distr., lake of Jack London	06.09.2013.	O. A. Mochalova
<i>Callitriche cophocarpa</i>	Hungary, Somogy County, small pool in a forest near Szentá	02.05.2011.	A. Mesterházy
<i>Callitriche transvolgensis</i>	Russia, S-Russia, Astrachan region, Solenoye-Zaymishche, in a small liman (10-20 cm deep water)	06.06.2012.	A. Mesterházy - A. Bobrov - A. Laktionov - D. Pifko
<i>Callitriche transvolgensis</i>	Russia, S-Russia, Volgograd region, Alexandrovka, at the shore of liman (20-40 cm deep water) mainly between Ranunculus rionii stand	05.06.2013.	A. Mesterházy - A. Bobrov - A. Laktionov - D. Pifko
<i>Callitriche fimbriata</i>	Russia, S-Russia, Kalmükya, Bolshoy Tsharyn, in a liman, between Butomus umbellatus stand app. 60 cm deep water	06.06.2012.	A. Mesterházy - A. Bobrov - A. Laktionov - D. Pifko
<i>Callitriche fimbriata</i>	Russia, S-Russia, Volgograd region, Demidov, in a liman, between Bolboschoenus maritimus stand (20-30 cm deep water)	05.06.2013.	A. Mesterházy - A. Bobrov - A. Laktionov - D. Pifko
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, S-Russia, Kalmükya, Bolshoy Tsharyn, in a liman, between Butomus umbellatus stand app. 60 cm deep water	06.06.2012.	A. Mesterházy - A. Bobrov - A. Laktionov - D. Pifko
<i>Callitriche palustris</i>	Hungary, Vas County, Egyházashollós, in small pool of "Hollósi-erdő"	08.07.2011.	A. Mesterházy
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Yakutia republic, unnamed waterbody near suburbs of Mirny city	25.07.2012.	A. Efremov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Amur region, Kani-Kurganskoe, unnamed waterbody in Amur river valley	18.06.2012.	A. Efremov
<i>Callitriche palustris</i>	Russia, Komi Republic, Kozhva, Kozhva river	15.07.2010	A. Efremov

4. táblázat. A vizsgált fajok és azok gyűjtési helyei.

3.2 Totál DNS izolálása

A totál DNS izolálás fagyasztott, illetve silika géllal szárított mintákból vontuk ki. A minták megfelelő homogenizálása Disruptor Genie (Scientific Industries New York, NY, USA) készülékben, 0,5 mm üveggyöngyök jelenlétében történt. A DNS tisztításához és kivonásához Zenogene 40 növényi szövet DNS tisztító kit-et (Zenon Bio Kft., Szeged,

Magyarország) alkalmaztunk, követve a gyártó leírását. 500 µl NA és 5 µl NB oldatban szuszpendáltuk a homogenizált növényi szövetet. A feltárást követően 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 vortexelt és 15 percig jégen állni hagyott mintákat 5 percig centrifugáltuk. Centrifugálást követően ZG⁴⁰ oszlopra pipettáztunk 825 µl NF oldatot, ehhez adtuk a centrifugálás utáni felülúszóból 500 µl-t, ezt összekevertük, majd 1 perc centrifugálás következett. 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 előbb leírt 2 lépést megismételtük, majd pedig 1 perc centrifugálás következett. Az oszlopot ezt követően tiszta 2,0 ml-es csőbe helyeztük, az oszlopra pipettáztunk 200 µl 65–70 °C-os E oldatot. A mintákat 5 percig 65–70 °C-on ismét inkubáltuk, majd 1 percen át centrifugáltuk.

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

3.3 Agaróz gélelektroforézis (AGE)

Az agaróz, másik nevén agarobióz az 1,3 kapcsolt β-D-galatopiranóz és az 1,4 kapcsolt 3,6-anhidro-α-L-galaktopiranóz lineáris polimere (diszacharid egységek alkotják), melyet tengeri vörösmoszatból nyernek ki. A gél magas hőmérsékleten ún. sol (folyadékszerű) állapotba kerül. Az agarózban a poliszacharid egységek között létrejövő másodlagos kötések (víz H-híd kötései) alakítják ki a térhálós szerkezetet (32-40 °C-ra lehűlve), mivel kovalens kötések nem tartalmaz. A pórusok mérete a gél agaróz koncentrációjától függ. Az agaróz jellemző tulajdonságai, hogy kémiaiilag inert, hidrofil, stabil és nem köt meg felesleges festékmolekulákat. A gélben egy lineáris duplex DNS molekula vándorlási sebessége (elektroforetikus mobilitása) fordítottan arányos a molekula tömegének logaritmusával ($\log \mu = \log \mu_0 - KrT$, ahol μ a mobilitás, T pedig a gél koncentrációja). 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 (EtBr) interkaláló festéket alkalmazunk, és az agaróz gél ultraibolya fénnel megvilágítjuk. A DNS 260 nm-en, a bázisok közé ékelődött fluoreszcens festék 300 nm-es, illetve 360 nm-es hullámhossznál

rendelkezik fényelnyelési maximummal. A festék gerjesztés hatására a látható tartományban bocsát ki fényt (590 nm-en 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 desztillált 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.

3.4 A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása

A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel történt. A reakcióelegy végtérfogata 23 μ l volt, amely a következőket tartalmazta: 2,3 μ l DeamTaqTM puffer, 0.5 mM dNTP mix, 1.0 mM a primerekből, 0.5 μ g templát DNS, 1 U Dream TaqTM DNS Polimeráz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A kloroplasztisz genom régióiból az *rbcL* és a *matK* régiókat vizsgáltuk meg. A *matK* régió vizsgálatakor az ún. BarCode rendszerben használt primerpárokat alkalmazzunk (F2lamialesF: CCCCAATTTGCGATCAATTCATTCA és F2lamialesR: CAGTACTTTTGTGTTTCCGAGCCAA). Az *rbcL* régió esetében saját tervezésű primerekkel dolgoztunk (Cal rbcLF: AAGTGTTGGATTCAAAGCGGG és Cal rbcLR: CTCCATTTGCAAGC CTCACG).

A PCR reakció 3 perces 94°C-os denaturációval indul, 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 (EtBr) festett agaróz gélen futattuk meg, majd GeneJET Gel Extraction Kitet (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használva tisztítottuk, követve a gyártó utasításait.

A minták szekvenálása Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével történt a fragmentek felszaporításánál használt primerekkel.

Az így megkapott nyers szekvenciák ellenőrzése és javítása DNA Baser programmal történt meg.

3.5 A kapott 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. Kulcsoportként a *Hippuris* nemzetséget használtuk (KC474895, AF248029). 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 fáknak 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 összehasonlítottunk 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 sj változást mutat, holott az adatokra felírható egy olyan fa is, amelyben a minimális számú mj változás következik be, akkor a $CI_j = mj/sj$ 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 (Mj) $RI_j = (Mj - sj)/Mj - mj$, ahol a j -edik karakter sj változást mutat, holott az adatokra felírható egy olyan fa is, amelyben a minimális számú mj 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 fákban meghatároztuk a többségi konszenzus törzsfát. A posztterior valószínűség (PP) értékét 95% felett tekintettük erősen támogatottnak.

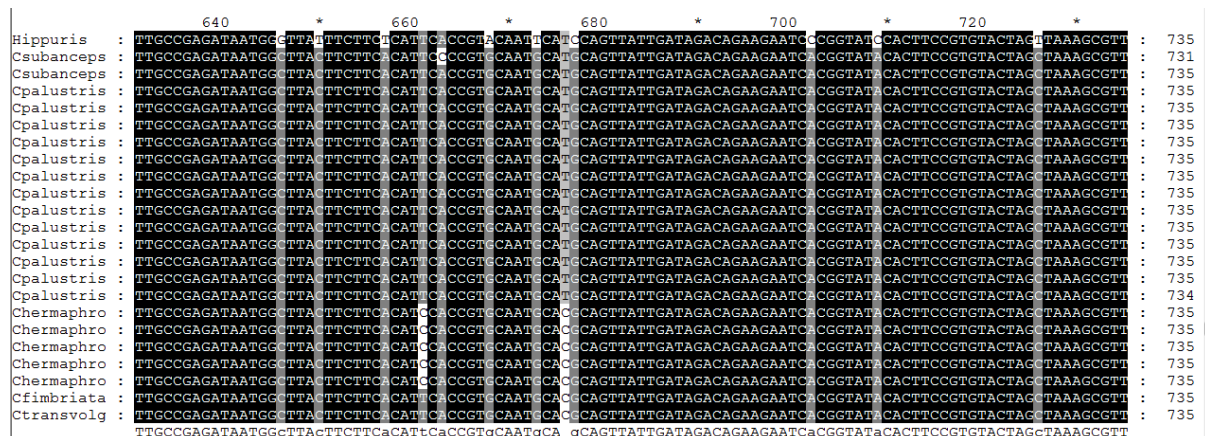
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A vizsgált mocsárhúr fajok (*C. palustris*, *C. hermaphroditica*, *C. subanceps*, *C. transvolgensis*, *C. fimbriata*) *rbcL* és *matK* szekvenciáit határoztuk meg. Mindkét az elemzésbe bevont régió esetében szükség volt a DNS szakaszok hossza miatt (>1000 bázispár), mind 5' → 3', mind 3' → 5' (forward és reverse) irányban szekvenáltatni azokat (13. ábra).

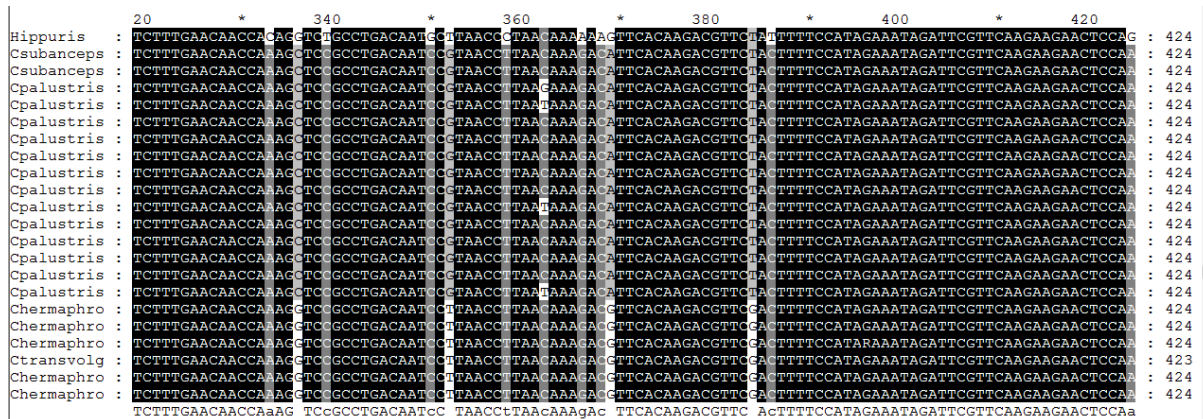


13. ábra. A *C. subanceps* *matK* kloroplaszt régiójának szekvencia kromatogram részlete.

A kloroplaszt régiók szekvenciáinak illesztéséből kapott alignment részleteket a 14. és a 15. ábra mutatja be. A fajok között, illetve fajon belül szekvencia szintű különbségeket láthatunk.



14. ábra. Az *rbcL* régió konzerválódott és variábilis szakaszainak alignment részlete.



15. ábra. A *matK* régió konzerválódott és variábilis szakaszainak alignment részlete.

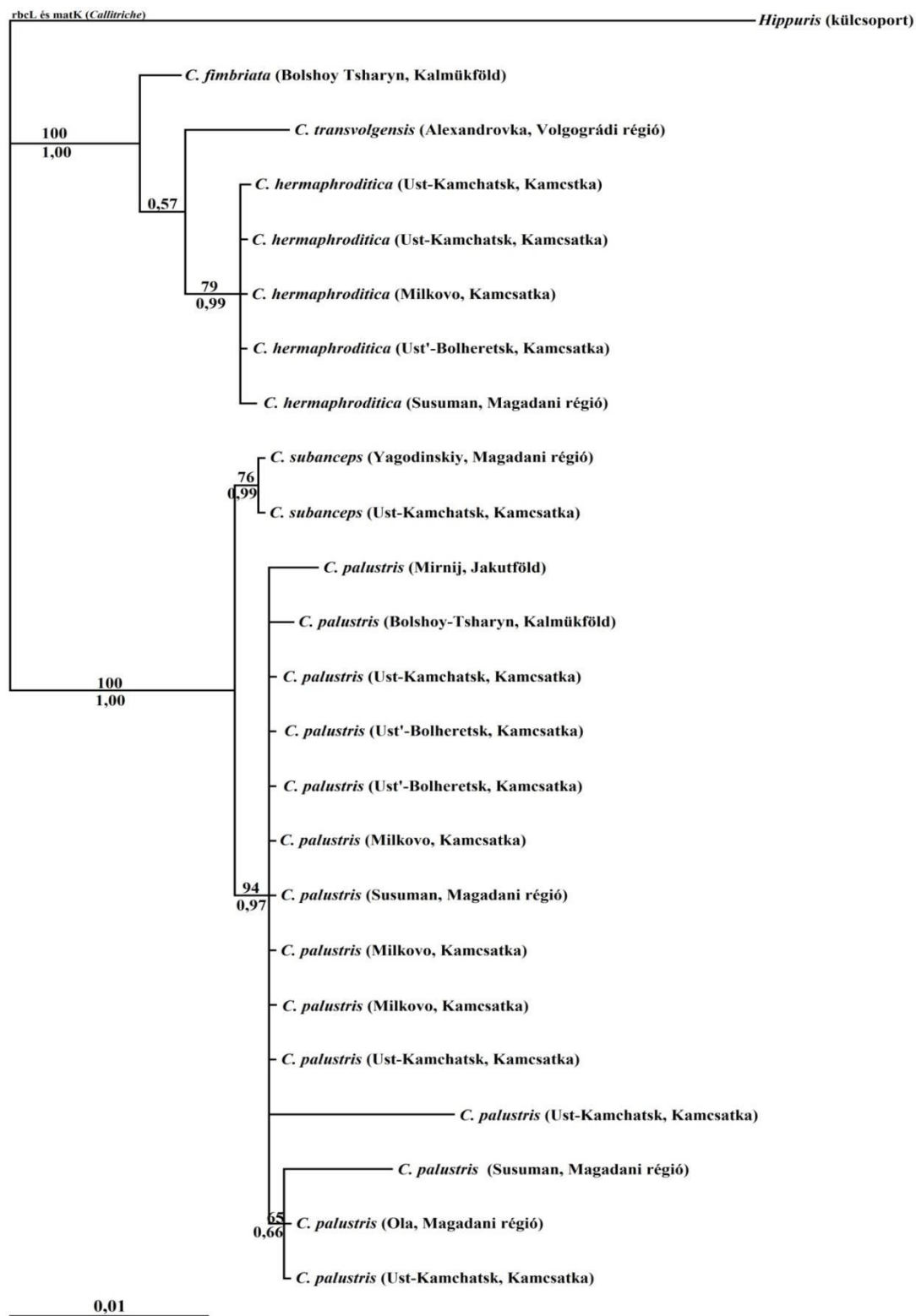
A két kloroplaszt gén régiót külön-külön analizáltuk mind MP, mind pedig Bayesian módszerrel. Az így kapott fák topológiája, és a fő ágak támogatottsága megegyezett. Mindkét régió elemzésénél a GTR+I szubsztitúciós modell bizonyult a legalkalmasabbnak. Ellentmondás az erősen támogatott csoportok között nem volt megfigyelhető, ezért a két adathalmazt egyesítettük (konkatenáltuk) egy kombinált analízishez. Az MP módszerrel készített analízis statisztikai adatait az 5. táblázat ismerteti.

Adatok	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	Kombinált (<i>rbcL</i> / <i>matK</i>)
Összbázissszám	962	752	1831
Konstans régió	844	664	1626
Nem informatív bázisok (variábilis régió)	100	48	147
Informatív bázisok (variábilis régió)	18	40	58
Variabilitás	1,8%	5,3%	3,1%
Konzisztencia index (CI)	0,9609	0,9590	0,9353
Homoplázia index (HI)	0,0391	0,0404	0,0647

5. táblázat. Az MP módszerrel készített statisztikák adatai.

A két génrégió közül az *rbcL* hosszabb, ugyanakkor kevesebb parszimóniailag informatív karaktert tartalmaz, mint a *matK*. A *matK* régió bizonyult variábilisabbnak. A kombinált analízis esetén a parszimóniailag informatív karakterek értéke 3,1 %. Mindkét kloroplaszt régió esetében alacsony a homoplázia index értéke, s a konzisztencia index pedig közelít 1-hez, ami a törzsfa megbízhatóságának magas támogatottságát jelenti.

A kombinált analízissel kapott konszenzus törzsfát a 16. ábra ismerteti a bootstrap (BS) és az utólagos valószínűségi (posterior probabilities, PP) értékeket feltüntetve.



16. ábra. A kombinált analízisből származó konszenzus filogenetikai törzsfa.

Külcsoportként a *Hippuris* nemzetséget választottuk, mint közel rokon genust. A törzsfán két erősen támogatott (1,00/100) monofiletikus kládot tudunk elkülöníteni. A kisebb monofiletikus kládon belül alapi helyzetben a *C. fimbriata* helyezkedik el. A csoporton belül alacsony támogatottság mellett (0,57) külön egységet alkotnak a *C. transvolgensis* és *C. hermaphroditica* fajokhoz tartozó egyedek. 79 %-os bootstrap, illetve 0,99 PP érték mellett elkülönülnek egy nagyobb egységet alkotva a *C. hermaphroditica* egyedei. A másik monofiletikus kládon belül közepes támogatottság mellett (0,99/76) leválnak a *C. subanceps* egyedek. A *C. palustris* fajhoz tartozó egyedek 94 % bootstrap (0,97 PP) értékkel alkotnak külön egységet a kládon belül. A *C. palustris* egyedek egy kisebb csoportja, alacsony támogatottság mellett (0,66/65) alkot különálló csoportot a monofiletikus kládon belül.

Vizsgálatunk fő célja az volt, hogy rekonstruálni tudjuk a *Callitriche* nemzetség törzsfejlődését, megállapítsuk annak monofiletikus jellegét és feltárjuk a fajok közt fennálló filogenetikai kapcsolatokat. A kombinált analízisből származó törzsfá alapján elmondható, hogy két fő leszármazási ágat tudunk elkülöníteni: az egyikbe a *C. hermaphroditica*-, a *C. fimbriata*- és *C. transvolgensis* fajok egyedei kerültek, míg a másikba *C. palustris*- és a *C. subanceps* fajok egyedei. Külcsoportként a *Hippuris* genust választottuk, mint közel rokon nemzetséget csakúgy, mint PHILBRICK et al. (2000), annyi különbséggel, hogy ő a nemzetség két fajával (*H. vulgaris* és *H. lanceolata*) állapította meg a filogenetikai viszonyokat.

Hegelmaier két szekcióra osztotta fel a nemzetséget (HEGELMAIER, 1864). Az egyik szekció a *Pseudocallitriche*-, a másik az *Eucallitriche*. A *Pseudocallitriche*-be a *C. hermaphroditica*, a *C. truncata* és *C. pulchra* tartozik, amelyek obligát, szubmerz fajok. Az *Eucallitriche* szekciót a többi mocsárhúr faj alkotja, amelyek leginkább teresztrisek és évelők. Fassett az *Eucallitriche* szekción belül elkülönítette a *Microcallitriche*-t, amelybe öt fajt emelt át, amelyek az újvilágban terjedtek el (FASSETT, 1951). A törzsfán külön kládba kerültek a *C. palustris*- és a *C. hermaphroditica* egyedei a HEGELMAIER (1864) szerinti szekciófelosztásnak megfelelően. Ugyanezen eredményre jutott PHILBRICK et al. (2000) a *Callitriche* fajok *rbcL* régió vizsgálatánál is.

PHILBRICK et al. (2000) eredményeihez hasonlóan a mi elemzésünkben is elválík egymástól a *C. hermaphroditica* a *C. fimbriata*-tól. Az általunk vizsgált *C. fimbriata* LANSDOWN (2006b) cikkében bemutatott *C. truncata* alfajának tekinthető. Elemzésünk támogatja a dél-orosz térségben endemikusnak tartott *C. transvolgensis* faji önállóságát, hiszen magas támogatottság mellett leválik a *C. hermaphroditica* és *C. fimbriata* fajoktól. A

kozmpolitának számító *C. palustris* egyedek alkotta monofiletikus egység nagy genetikai változatosságot mutat, az utóbbi években számos variánsát azonosították (LANSDOWN, 2006a). Elmondható az is, hogy nem azok a *C. palustris* egyedek kerültek egy nagyobb egységbe, amelyek különböző élőhelyről származnak, hanem, amelyek hasonló termésmorfológiát mutatnak.

A *C. subanceps*-hez tartozó egyedek egy jól támogatott, önálló egységet képeznek a nagyobbik kládon belül. A faj termését megvizsgálva, amely 0,7-0,8 mm hosszú, 2 mm széles és szárnyatlan, azt mondhatjuk, hogy rendkívül hasonló a *C. palustris* terméséhez, ami 1,2 mm hosszú, 3 mm széles, és aminek felső része szárnyalt (KOMAROV, 1934). Petrov 1921-ben a *C. subanceps*-et a *C. anceps* alfajának tekintette, azonban KOMAROV (1934) a *C. heterophylla* egyik variánsaként említi meg jellemzésében. A begyűjtött *C. subanceps* példányokra nem igazán illik KOMAROV (1934) jellemzése, sokkal inkább *C. palustris* var. *terrestris* formájára hasonlítanak. Eddigi vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy e faj filogenetikai szempontból önálló taxonómiai csoportot jelent.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A morfológiai és DNS alapú filogenetikai vizsgálatokkal feltárhatjuk az élőlények között fennálló rokonsági viszonyokat. A *Callitriche* nemzetség is e vizsgálatok középpontjában áll. A genust 2009-ben, az APG III. külön családba (*Callitrichaceae*) sorolta be. Változatos növényfajok alkotják e genust, a leírt fajoknak harmada kozmopolitának számít, ugyanakkor a többi faj is jelentős állományokat alkot elterjedési területén. Európában 17 fajuk ismert, Magyarországon kettő fordul elő (*C. cophocarpa* és a *C. palustris*).

A mocsárhúrokra jellemző, hogy valamennyien kistermetű, batrachoid típusú higrofitonok, a vizes élőhelyek rezidens növényei. Morfológiai megjelenésük nagy változatosságot mutat, emiatt a fajok azonosítása komoly taxonómiai tudást igényel. Mivel vízi növények, ezért különböző stratégiát alkalmaznak kiszáradásuk elkerülésére, hiszen képesek folyamatos párologtatásra. Víz feletti leveleik kerekdedek és örvösen állnak, olykor sűrűn benövik a vízfelszínt, alámerült levélzetük rendszerint szálas, sallangos és olykor párosával állók, amelyeken kisebb mértékű karéjosottság is megfigyelhető. Mivel egész életüket vízben élik le, emiatt virágzatuk felépítése is rendkívül egyszerű és redukált. Virágai általában fehér színűek, csupán kettő termőlevelet, illetve egy porzószálat tartalmaznak, amiből később makkocska termés fejlődik, benne négy maggal. A termés lehet szárnyas vagy szárnyatlan, a fajok azonosításakor ez fontos taxonómiai bélyeg, egyéb morfológiai tulajdonságok mellett. A megporzásuk szél és víz által történik, ez utóbbi azonban sokkal gyakoribb. A fajok növekedési üteme igen változó, vannak igen gyorsan növvő és kevésbé terjeszkedő fajok is. A gyengébb vízfolyású patakokban, holtágakban akár monodomináns és igen sűrű állományokat is képezhetnek, amivel negatívan befolyásolják más ott élő élőlények életét.

Vizsgálatainkba a *C. palustris*-, a *C. hermaphroditica*-, a *C. subanceps*-, a *C. transvolgensis*-, a *C. cophocarpa*- és *C. fimbriata* egyedeit vontuk be. A tavaszi- és az őszi mocsárhúr mindenütt jelen van, előbbi a nemzetség típusfaja is egyben. A többi faj elterjedése inkább Ázsia területére korlátozódik, sőt a *C. transvolgensis* faj szűk elterjedése miatt már endemikusnak számít a dél-orosz térségben. Terméseiket tekintve a *C. cophocarpa* és a *C. subanceps* esetében szárnyatlan, a többi vizsgált fajé pedig szárnyas. Míg a *C. palustris*-nak csak a termés felső része szárnyalt, addig *C. hermaphroditica* esetében már a termés egésze. Valamennyien évelők, magvaik csírázókéességüket évekig megőrzik. Az egyedek kiválasztásánál kulcskérdés volt, hogy különböző földrajzi régiókból származzanak.

Vizsgálatunk a kloroplaszt *rbcL* és *matK* génrégióra terjedt ki. A *matK* régió vizsgálatát a BarCode rendszerben is használatos primerekkel végeztük el. Az *rbcL* régió esetében saját tervezésű primerpárokkal dolgoztunk. Analízisünk során az egyedek leveleiből totál DNS-t izoláltunk, felamplifikáltuk, tisztítottuk és megszekvenáltuk a szükséges fragmenteket, a kapott szekvenciákat statisztikai programokkal kiértékeltek és ennek eredményeként megalkottuk az általunk vizsgált *Callitriche* fajok filogenetikai törzsfáját (16. ábra).

Külcsoportként a közel rokon nemzetséget, a *Hippuris*-t választottuk, csakúgy, mint Philbrich (PHILBRICH 2000). Két erősen támogatott monofiletikus kládot láthatunk a törzsfán. A nagyobb kládban találhatók *C. palustris* és *C. subanceps* fajok egyedei. A *C. subanceps* egyedek közepes támogatottság mellett leválnak a tavaszi mocsárhúr (94%) egyedeitől. A kisebb kládon belül az őszi mocsárhúrhoz tartozó egyedek egy külön csoportot alkotva jó támogatottsággal elkülönülnek a *C. fimbriata* és *C. transvolgensis* fajok egyedeitől. A *C. hermaphroditica* egyedek kloroplaszt régiói nem mutatnak jelentős változatosságot, annak ellenére, hogy különböző élőhelyről származnak. A törzsfán a hasonló termésmorfológiát mutató *C. palustris* egyedek találhatók közel egymáshoz. A tavaszi mocsárhúr egyedeit nagy genetikai változatosság is jellemzi, hiszen számos variánsát azonosították az elmúlt években (LANSDOWN, 2006a). Egyelőre még nem sikerült tisztázni az endemikusnak tartott *C. transvolgensis* faji önállóságát, ugyanakkor a törzsfán belül elfoglalt pozíciója ezt sugallja. Taxonómiai és filogenetikai szempontból a *C. subanceps*-hez tartozó egyedek egy önálló egységet alkotnak a nagyobbik kládon belül. A kládon belüli elkülönülés bizonyítja és igazolja önálló, taxonómiai státuszát a mocsárhúrok nemzetségében.

Az eredmények megerősítése érdekében jelenleg a nukleáris ITS régió elemzését végezzük, amelynek segítségével még differenciáltabb képet kaphatunk a vizsgált *Callitriche* fajok között fennálló filogenetikai kapcsolatokról.

6. 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 diplomamunkám elkészítéséhez. Köszönöm továbbá Dr. Mesterházy Attilának szakmai segítségét, ötleteit és hasznos tanácsait.

Szeretném megköszönni családomnak azt a rengeteg támogatást és biztatást, aminek köszönhetően közelebb kerültem kitűzött céljaim eléréséhez.

IRODALOMJEGYZÉK

- AKAIKE H. (1974): A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. **19** (6): 716–723 pp.
- ALBACH C. D., MEUDT M. H., BOXELMAN B. (2005): Piecing together the „new” Plantaginaceae. *American Journal of Botany* **92** (2): 297-315 pp.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP /APG/ (1998): *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 85, No. 4, 531-553 pp.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. /APG II./ (2003): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**, 399-431 pp.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III. /APG III./ (2009): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161** (2): 105-121 pp.
- BORHIDI A. (2008): A zártermők rendszertana molekuláris filogenetikai megközelítésben. PTE Biológia Intézet, 328 pp.
- FASSETT, N. C. (1951): *Callitriche* in the New World, *Rhodora*: **53**:137-155; 161-182, 185-194; 209-222
- FARRIS J. S. (1989): The retention index and rescaled consistency index. *Cladistics* **5**: 417-419 pp.
- FELSENSTEIN J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791 pp.
- HEGELMAIER F. (1864): Monographie der Gattung *Callitriche*, Verlag von Ebner & Seubert, Stuttgart, 64 pp.
- KIRÁLY G. (2009, 2011): Új, magyar fűvészkönyv I-II. – Magyarország hajtásos növényei, Határozókulcsok – Ábrák. Kiadó: Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, 1291 pp.
- KLUGE A. G., FARRIS J. S. (1969): Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32 pp.
- KOMAROV L. V. (1934): FLORA of the U.S.S.R. Vol. XIV. Callitrichaceae. Kiadó: Akademiya Nauk SSSR, 378-384 pp.
- LANDSOWN V. R. (2006a): The Genus *Callitriche* (Callitrichaceae) in Asia. *Novon*, Vol. **16** Number 3, 354-361 pp.
- LANDSOWN V. R. (2006b): Notes on the water-starworts (*Callitriche*) recorded in Europe. *Watsonia*, Vol. **26**: 105-120 pp.
- LINNAEUS C. (1753): *Species Plantarum*. Ed. 1. Holmiae.

- NEI M., KUMAR S. (2000): Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York p. 126-127 pp.
- PHILBRICK C. T., LES H. D. (2000): Phylogenetic studies in *Callitriche*: implications for interpretation of ecological, karyological and pollination system evolution. Aquatic Botany **68**: 123-141 pp.
- PODANI J. (1997): Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest. 412 pp.
- POSADA D., CRANDALL K. A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics **14** (9): 817-818 pp.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics **19** (12):1572-4.
- SWOFFORD D. L. (2001): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4. Massachusetts, Sunderland: Sinauer Associates.
- TZVELEV N. N. (1975): Nota de genere *Callitriche* L. in URRS. *Novosti sistematiki vysshikh rastenii = Novitates systematicae plantarum vascularium* **12**: 237-238 pp.

WEBOLDALAK /ábrák/:

1. WEBOLDAL /2. ábra/
http://www.biopix.dk/smalbladet-vandstjerne-callitriche-hamulata_photo-45807.aspx
2. WEBOLDAL /3. ábra/
<http://www.green-portal.ru/vodoemy/1193.html>
3. WEBOLDAL /4. ábra/
<https://gobotany.newenglandwild.org/species/callitriche/stagnalis/>
4. WEBOLDAL /4. ábra/
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Callitriche_palustris_capa52_002_php.jpg
5. WEBOLDAL /5. ábra/
http://www.hlasek.com/callitriche_palustris_ak6634.html
6. WEBOLDAL /6. ábra/
<http://botany.cz/cs/callitriche-hermaphroditica/>
7. WEBOLDAL /7. ábra/
<http://botany.cz/cs/callitriche-cophocarpa/>
8. WEBOLDAL /8. ábra/
<http://www.pro-landshaft.ru/plants/detail/1045/>

9. WEBOLDAL /9. ábra/

<http://www.brc.ac.uk/plantatlas/index.php?q=node/3175>

10. WEBOLDAL /10. ábra/

<http://www.plantarium.ru/page/taxonomy/taxon/7715.html>