

**XXXII. OTDK
Biológia Szekció**

**Egy mezofil lomberdei faj, a szártalan kankalin
(*Primula vulgaris* Huds.) európai léptékű filogeográfiája,
különös tekintettel a Kárpát-medencére**

Laczkó Levente
Biológus Msc
I. évf.

Témavezető:

Sramkó Gábor
posztdoktori kutató
DE TTK Növénytani Tanszék
MTA – MTM – ELTE Ökológiai Kutatócsoport

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Növénytani Tanszék



Debrecen, 2015

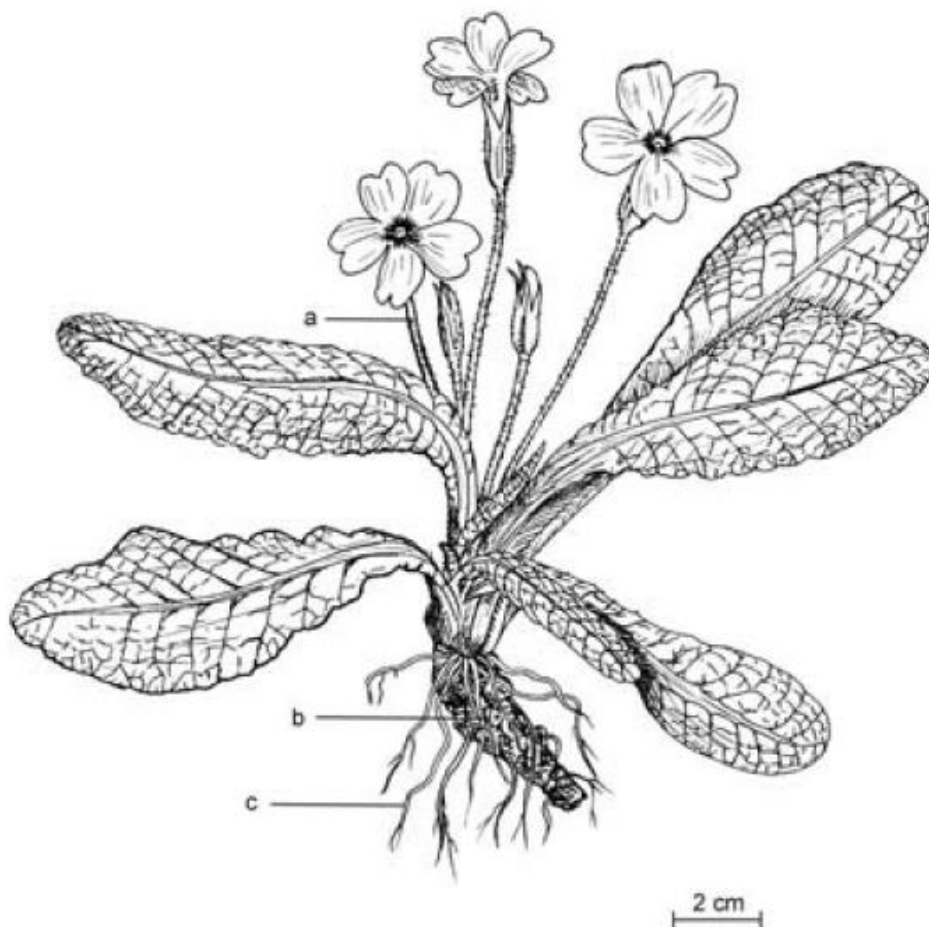
Tartalom

1. Bevezetés.....	3
1.1. <i>A vizsgált növény rövid jellemzése</i>	<i>3</i>
1.2. <i>Irodalmi áttekintés.....</i>	<i>5</i>
2. Célkitűzés	8
3. Anyag és módszer	9
3.1. <i>Növényanyag</i>	<i>9</i>
3.2. <i>Felhasznált módszerek</i>	<i>10</i>
4. Eredmények	15
4.1. <i>Nukleáris és plaztidiális szekvenciák analízise</i>	<i>15</i>
4.2. <i>Mikroszatellitek analízise</i>	<i>20</i>
5. Diskusszió	23
6. Konklúzió	25
7. Köszönetnyilvánítás.....	26
8. Irodalomjegyzék	27
9. Tételes szerzői hozzájárulás.....	29

1. Bevezetés

1.1. A vizsgált növény rövid jellemzése

A *Primula vulgaris* Huds. (syn.: *Primula acaulis* (L.) Hill.) a Primulaceae családba tartozó kis termetű, mezofil igényű, rizómával rendelkező növény, mely főleg üde erdők árnyékosabb széleinek, tisztásainak jellemző faja. Levelei levélrózsában állnak, ráncos lemezűek, visszás tojásdad alakúak, melyek 5–22 cm hosszúak, 2,5–3 cm átmérőjű, kénsárga virágai április elejétől nyílnak (**1.ábra, 1. kép**). Rovarmegporzású (elsősorban *Bombus* spp.) növény, mely eltérő alakokkal, különböző hosszúságú porzószákkal próbálja maximalizálni a keresztbeporzás valószínűségét. Ismert önmegporzó alakja is, mely sikerebb olyan években, amikor ritkábbak a megporzók. A vegetatív szaporodás csak ritkán fordul elő és csak kis távolságon hatékony. Egy növény 42–57 magot hoz létre termésenként. Megfigyelhető a myrmecochoria, azaz a növény magvainak hangyák által történő terjesztése (JACQUEMYN *et al.* 2009).

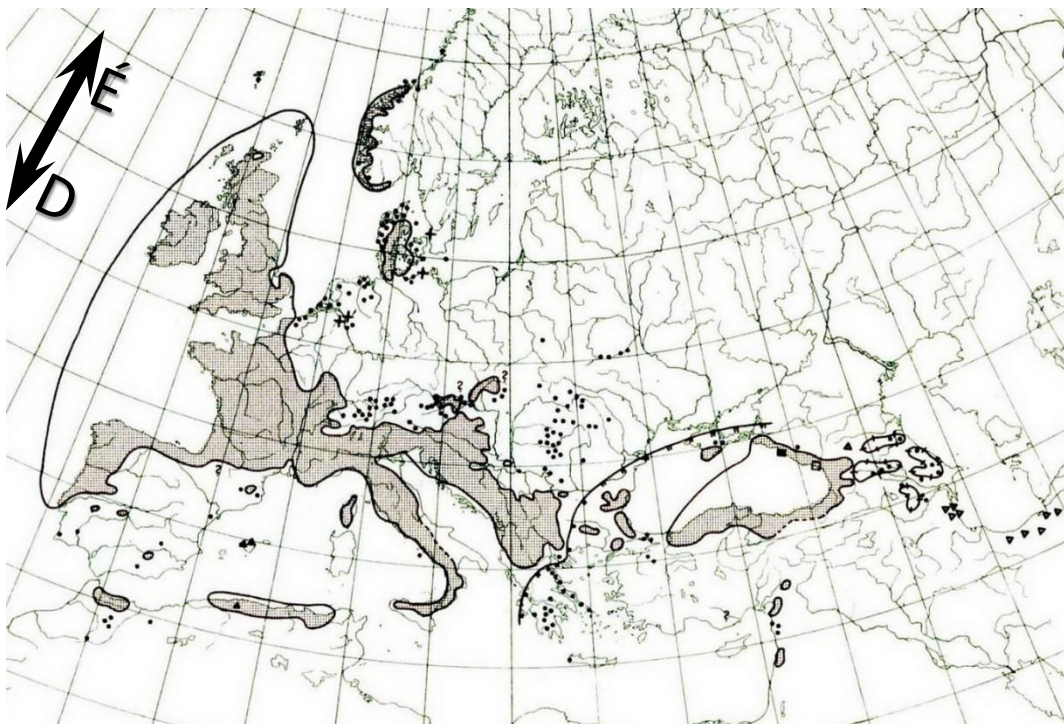


1.ábra: Virágzó *Primula vulgaris* (JACQUEMYN *et al.* 2009)



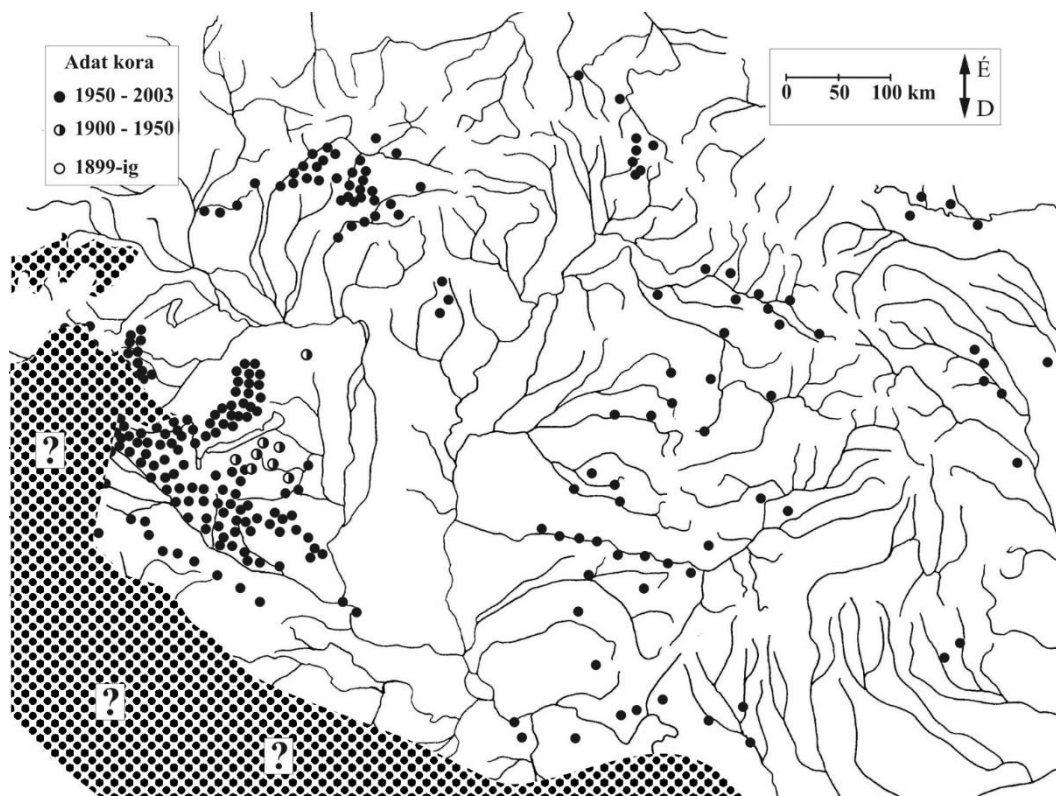
1. kép: *A csödei állomány egyedei* (fotó: Sramkó Gábor)

A faj alapvetően atlanti-szubmediterrán elterjedési mintázatot mutat, áréája Európában a Kaukázustól a Brit-szigetekig, Norvégiától Észak-Afrikáig terjed, ezáltal az egyetlen *Primula* faj, amelynek áréája Afrikát is eléri (2. ábra).



2. ábra: *A faj európai áréája* (MEUSEL et JÄGER 1965)

Érdeemes kiemelni a Kárpát-medencei elterjedési mintázatot. Magyarországon, a Dunántúlon a faj áréája egybefüggő, de gyakori Szlovákia nyugati részén, illetve számos populációt találhatunk az Erdélyi-szigethegységen át egészen Kárpátalja északi részéig. Földrajzi adottságok tükrében a régiónbeli elterjedési mintázat legfőképpen középhegységi területekre összpontosul, megfigyelhető egy harapófogó-szerű, két pólusos mintázat (3. ábra).

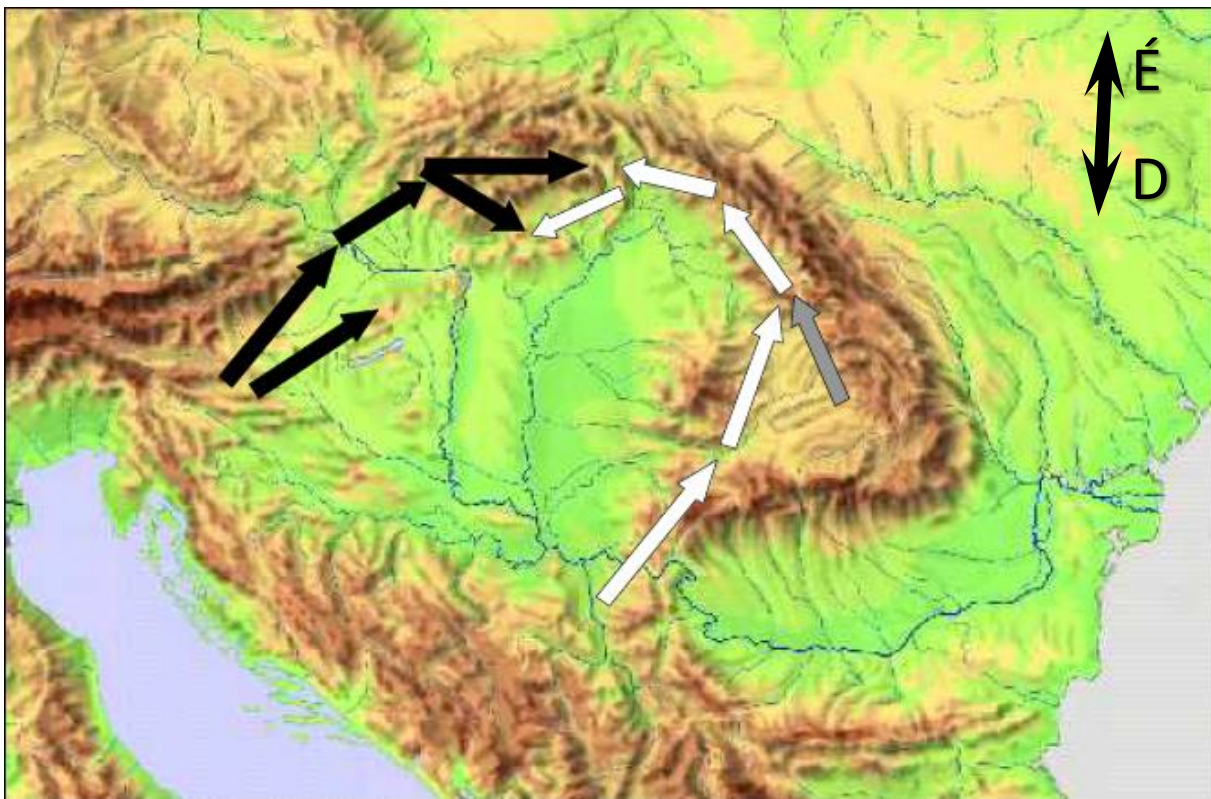


3. ábra: A *Primula vulgaris* Kárpát-medencei elterjedése (SRAMKÓ)

1.2. Irodalmi áttekintés

Az ilyen és ehhez hasonló elterjedési mintázat kialakulását az „illír-dácikus harapófogó” elmélete segítségével értelmezhetjük, amelyet ezen a néven VARGA (1964:136) írt le a nagylepkefauna alapján, azonban hasonló elterjedésű növények esetén is alkalmazhatjuk. Ennek értelmében két posztglaciális migrációs útvonalat feltételezhetünk: egyet illír területről a nórikumon át, és egy másik, ún. dácikus útvonalat. Ezek szerint a jégkorszakokat a déli európai félszigetek refúgiumaiban átvészelt faj a Kárpát-medencét a fenti két fő útvonalon, harapófogó-szerűen kolonizálta a glaciális utáni felmelegedő időszakban. A *Primula vulgaris* flóratörténetével HENDRYCH (1996) is foglalkozott, főleg klimatikus viszonyok alapján vizsgálta a növény elterjedését. Jelenkori ökológiai igények alapján azt valószínűsítette, hogy a faj korábban nagyobb területen volt jelen, az área jelenleg felszakadozó fázisban lehet, ezen kívül leírta, hogy

a *P. vulgaris* valószínűleg az illír-dácikus harapófogó mentén terjedhetett el a Kárpát-medencében a glaciálisok után. Ez alapján feltételezhető, hogy a három nagy déli, európai félszigeten lévő refúgiumokban vészelte át a faj a lehűléseket, mint azt számos faj esetében bizonyították molekuláris filogenetikai módszerekkel (TABERLET *et al.* 1998). Később BORHIDI (2002) a harapófogó nyugati oldalán három útvonalat valószínűsített: egy délit a Villányi-hegység felé, egy Dunántúli-középhegységen át ívelő középsőt és egy északit az Északnyugati-Kárpátok felé. SRAMKÓ (2004) részletes elemzést mutatott be arról, mely fajok kerülhettek be illír, melyek dácikus és melyek mindkét útvonalon. A tanulmány szintén valószínűsíti, hogy a *P. vulgaris* az illír-dácikus harapófogó migrációs útvonalait követte (**4. ábra**).



4. ábra: A feltételezett migrációs útvonalak (SRAMKÓ 2004)

Az elmélet tesztelésére leginkább molekuláris filogeográfiai módszerek alkalmasak, melyekhez a megfelelő markerek eddig nem álltak rendelkezésünkre. Azonban segítségünkre voltak más szerzők, akik foglalkoztak a *Primula vulgaris*-szal molekuláris alapon. VOLKOVA és munkatársai (2013) bemutatták a faj Fekete-tenger környéki filogeográfiáját, valamint olyan markereket publikáltak, amelyeket populáción belül nem talált variábilisnak, populációk között viszont igen, tehát alkalmasak filogeográfiai mintázat feltérképezésére. Az általa használt régiók a nukleáris ITS, valamint plasztidiális *trnL-trnF* és *rpl32-trnL* voltak. Az ITS olyan sejt-magi DNS régió, amelyből több kópia is jelen van a nukleáris genomban. Több egység alkotja,

a megegyező egységek szekvenciái azonosak. A két spacer az ITS 1 és az ITS 2, az ITS 1 a 18S és 5,8S gén közé, az ITS 2 az 5,8S és 26S gén közé van beágyazva. A *trnL-trnF* a plasztidiális genomban helyezkedik el, tartalmazza a *trnL* intront és a *trnL-trnF* spacer. A szintén plasztidiális marker *rpl32-trnL* intergenerikus spacer, amely az *rpl32* és *trnL* gének között található.

Munkánk molekuláris alapját egy másik, a közelmúltban közölt eredmény fektette le. TRIEST és munkatársai (2014) 15 mikroszatellit markert fejlesztettek a célfajunkban.

A mikroszatellitek 2–4(–5) alapszekvenciájú tandem ismétlődések, amelyek nagy számban találhatóak a genomban. Mutációs sebességük igen nagy, ami által számos allélt hozhatnak létre, vagyis alkalmasak populációgenetikai struktúra feltárására. Számos esetben dinukleotid ismétlődések formájában vannak jelen, amelyek lehetnek (CA)_n, (GA)_n, (AT)_n, (GC)_n, habár a (GC)_n típus ritkább a többinél (ELLEGREN 2004). A TRIEST és mtsai. által bemutatott lókuszok közül 8 dinukleotid ismétlődés, a fennmaradó 7 komplexebb struktúra. Összesen 187 allélt fedeztek fel, amelyek száma lókuszonként 7–28 közé, populációnként 25–121 közé esett, adataik alapján a genetikai variabilitás magasnak mutatkozott.

2. Célkitűzés

Vizsgálataink során a szártalan kankalin (*Primula vulgaris*) európai léptékű filogeográfiai analízisét tűztük ki célul, melyhez molekuláris genetikai módszereket használtunk fel. Célunk volt továbbá az illír-dácikus harapófogó elmélet helyességének tesztelése a faj esetében. A hipotézis helyessége esetén a keleti és nyugati ágak molekuláris alapon elkülöníthetők egymástól. Filogeográfiai elemzéshez felhasználtunk sejtmagi és plasztidiális szekvenciákra alapuló adatokat, valamint mikroszatelliteket, tehát populációgenetikai szempontból és jellemeztünk egyes populációkat, aminek segítségével megállapíthatók a feltételezett migrációs útvonalak.

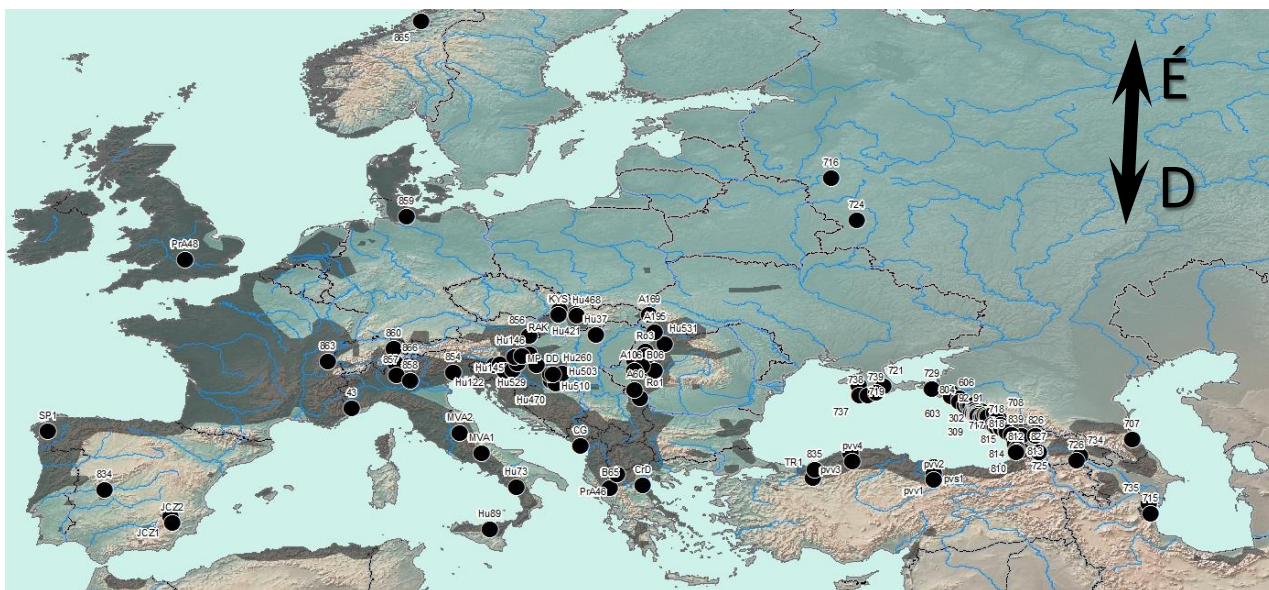
3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

A mintagyűjtés a 2000-es évek első felében történt 96%-os etanolba, aminek következményeképpen összesen 63 populáció egyedeiből tudtunk DNS-kivonatot előállítani. A Polina Volkova-val való közös munka eredményeképpen ez a lista bővült, a feldolgozott minták földrajzilag az área jelentős részét lefedik (**5. ábra**). Az illír-dácikus harapófogó elmélet tesztelésére történt populációgenetikai mintavételezés is (**1. táblázat**). Ezek – szemben a VOLKOVA és mtsai. (2013) által leírt markerekkel, amelyek populációnként egy egyed elemzését igénylik – minél több egyed mintázására van szükség. Az ilyen módon történt gyűjtés a harapófogó mentén csoportosult.

1. táblázat: *A populációgenetikai célokra gyűjtött minták*

Rövid név	Populáció	Koordináta(É)	Koordináta(K)	Mintázott egyedek száma
Slk_W1	Sk: Blatnica: Gaderská dolina	48.93681	18.9385	20
Slk_W2	Sk: Vrchteplá	49.12850	18.56128	20
Cr_W3	Cr: Grádisté: Loncarski vrh	45.42144	17.97575	18
Hu_W4	Hu: Zákány: Földvár-hegy	46.26653	16.91725	16
Slo_W5	Slo: Vareja	46.36636	15.91733	15
Slo_W6	Slo: Kamnik	46.19994	14.59967	20
Hu_W7	Hu: Csöde	46.83928	16.54169	12
Ro_E1	Ro: Nagyompoly	46.49133	22.55575	20
Ua_E2	Ua: Felsőapsa	48.95196	22.51170	18
Ro_E3	Ro: Dunatölgyes	46.99385	21.98366	20
Ro_E4	Ro: Püspökfürdő	44.60902	22.25246	20
Ua_E5	Ua: Sóslak	48.01554	23.98553	19
Ro_E6	Ro: Nagyompoly	46.14797	23.17179	20



5. ábra: Az európai léptékű filogeográfiai analízis során felhasznált minták. A sötétített terület a szártalan kankalin elterjedési területét mutatja

3.2. Felhasznált módszerek

A DNS-kivonás során CTAB (cetiltrimetilammónium bromid) módszert használtunk (DOYLE & DOYLE 1987). A mintákat folyékony nitrogénnel történő fagyasztás után eldörzsöltük kevés kvarchomokkal és polivinilpolipirrolidonnal (PVPP) a felszabaduló fenolok megkötésére. Az eldörzsölt növényi szövetre 800 µl CTAB oldatot pipettáztunk, amely a CTAB-n kívül β-merkaptó-etanolt és polivinilpirrolidont (PVP) tartalmazott. A polivinilpirrolidonnal a kivonás során felszabaduló poliszacharidokat köthetjük meg. Egy órás inkubáció után a sejttörmelék, kvarchomokot és PVPP-t centrifuga segítségével eltávolítjuk a felülúszó átöntésével új csövekbe. 700 µl 24:1 arányú kloroform:izoamil alkohol hozzáadása után a csöveket átforgattuk, ezután újabb centrifugálási lépés következett, ami után a felülúszót óvatosan új, tiszta eppendorf csőbe pipettáztuk. A lépést megismételtük 550 µl kloroform:izoamil alkohollal, ezután hideg izopropanolt és ammónium-acetátot adtunk a mintákhoz, majd fagyasztóba tettük. Tapasztalataink szerint több DNS nyerhető ki, ha a minták egy éjszakát állnak a fagyasztóban. Erős centrifugálás segítségével pellettizáltuk az oldatban kicsapódott DNS mennyiséget, amely az eppendorf csövek alján gyűlt össze. A felülúszót leöntöttük, majd a pelletteket átmostuk kétszer 400 µl 70%-os etanollal. A mintákat szobahőmérsékleten szárítottuk meg a fennmaradó alkoholtól, majd 8-as pH-jú 10 mM-os Tris-HCl pufferben oldottuk.

Az ITS amplifikációjához ITS 1A és ITS 4 (GULYÁS *et al.* 2005) primereket használtunk (**2. táblázat**), a régióra általánosan használt PCR rezsím segítségével, amellyel sikeres amplifikációt végeztünk. A PCR kondíciók a következők voltak:

- | | |
|----------------|----------------|
| 1) 94°C – 4:30 | 4) 72°C – 0:40 |
| 2) 94°C – 0:30 | 5) 72°C – 7:00 |
| 3) 51°C – 0:30 | 6) 18°C – ∞ |

Az 1) és 2) szakasz folyamán történik a denaturáció, azaz a duplaszálú DNS szétválása, majd a 3) szakasz folyamán a primerek kötődnek a DNS-hez, ezután a 4) és 5) szakasz során történik a polimerizáció, azaz a DNS tényleges amplifikációja. A 2) – 4) szakasz 33 alkalommal ismétlődik. A 4) szakasz minden egyes ciklusban egy másodperccel növekszik.

A *trnL-trnF* spacer amplifikációjánál felhasznált primerek a TABERLET *et al.* (1991) által közöltek, melyeket – mivel etanolba történt a mintagyűjtés, ami a DNS fragmentálódását okozza – belső primerekkel kombinálva két részletben alkalmaztunk, míg az *rpl32-trnL* esetében a SHAW *et al.* (2007) által kifejlesztettek voltak (**2. táblázat**).

A *trnL-trnF* és *rpl32-trnL* régió amplifikálása során alkalmazott PCR kondíciók a következők voltak:

- | | |
|----------------|----------------|
| 1) 94°C – 3:00 | 6) 48°C – 0:30 |
| 2) 94°C – 0:30 | 7) 72°C – 1:30 |
| 3) 58°C – 0:30 | 8) 72°C – 7:00 |
| 4) 72°C – 1:30 | 9) 4°C – ∞ |
| 5) 94°C – 1:30 | |

Ebben az esetben az úgynevezett touchdown rezsimmal növeltük a reakció specifitását. A 2) – 4) és 5) – 7) szakaszok 20-20 alkalommal ismétlődnek egymást követően.

2. táblázat: *A nukleáris és plasztidiális szekvenciák amplifikációjánál felhasznált primerek*

DNS régió	Primer	Primer szekvencia
nrITS	ITS 1A	5'-GAC GTC GCG AGA AGT CCA-3'
nrITS	ITS 4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
<i>trnL-trnF</i>	Tab C	5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3'
<i>trnL-trnF</i>	Tab D	5'-CGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3'
<i>trnL-trnF</i>	Tab E	5'-GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC-3'
<i>trnL-trnF</i>	Tab F	5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3'
<i>rpl32-trnL</i>	rpl32 F	5'-CCA ATA TCC CTT YYT TTT CCA A-3'
<i>rpl32-trnL</i>	trnL R	5'-CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT-3'

Minden itt bemutatott genetikai markerre jellemző a neutrális molekuláris evolúció jelensége, amelynek értelmében a régióra csekély szelekciós erő hat, így a véletlenszerűen létrejövő pontmutációk spontán populációgenetikai folyamatok révén fennmaradhatnak és a filogenetikai mintázat vizsgálatát lehetővé teszik.

A reakciók során felhasznált vegyszerek végkoncentrációját a **3. táblázat** tartalmazza.

3. táblázat: *A PCR során felhasznált vegyszerek törzs-, és végkoncentrációja*

Vegyszer	Törzsoldat koncentrációja	Végkoncentráció	Mértékegység
Reakciópuffer	10	1	X
Dezoxinukleotidok	2	0.2	mM
Magnézium-klorid	25	2	mM
Marha szérumalbu-	10	1	mg/ml
Primerek	10	0.2	μM
DNS-polimeráz en-	5	0.03	U
DNS templát	100	4	ng/μl

A PCR termékeket Polina Volkova-nak küldtük el, aki elvégezte azok szekvenálását. Egyes esetekben azonban szükség volt egy második szekvenálásra is úgynevezett "proofreading", azaz hibák kijavítására alkalmas DNS polimeráz enzimmel a szekvenciákban lévő mikroszatellit motívumok miatt (DEVEY *et al.* 2009). Összesen 124 egyed sejtmagi és 108 egyed plasztidiális szekvenciáit dolgoztuk fel, ezeket a MultAlin online program (CORPET 1988) segítségével illesztettük. A plasztidiális markereket az analízis során kombináltuk, vagyis a két markert egyszerre használtuk fel egy elemzésben. A *trnL-trnF* marker esetében nagy sebességgel evolválódó homoplázikus szakaszokat (mikroszatelliteket) is találtunk, amelyek ugyan nagy variabilitással rendelkeznek, de mivel értelmezhetetlenné tették a struktúrát, az analízis során nem vettük figyelembe. A szekvenciákat a TCS 1.21 programmal elemeztük (CLEMENT *et al.* 2000) úgy, hogy a "gap"-eket 5. karakter-állapotként tekintettük. A program a parszimónia elvén működik, a fennálló pontmutációk alapján számolja ki az egyes csoportok közötti genetikai távolságot, ilyen módon létrehoztuk a vizsgált populációk ribo- és haplotípushálózatát, amelyről megállapítható a valószínűsíthetően legrégebb óta létező ribo- és haplotípus, valamint az egyes populációk között fennálló távolság és leolvashatók a mutációk. A több bázis hosszúságú inzerció/delécioákat úgynevezett "singleton gap"-ek formájában kódoltuk, tehát az ilyen típusú mutációkat egyetlen mutációs eseményként kezeltük. Kulcsoportként oroszországi *Primula veris* L. szekvenciákat használtunk. Térképek szerkesztéséhez a QGIS programot vettük igénybe.

Ludwig Triest segítségével 14 lókuszon alapuló genotipizálás történt mikroszatellit markerek alapján (**4. táblázat**), populációnként legalább 12, legfeljebb 20 egyed alapján (**1. táblázat**). A primerek az ismétlődő motívumok mellett kisebb-nagyobb távolságra elhelyezkedő konzervatívabb szakaszokhoz kötnek a PCR során, mivel így a teljes vizsgálni kívánt szakasz felszaporítható, valamint a biztos amplifikációhoz elegendő hosszúságú szakasz áll rendelkezésre. A primereket célszerű fluoreszcens festékkel jelölni, a termékek így alkalmasak fragmenthosszanalízis céljára. Az így kapott nyers adatokat, melyek esetében a variabilitást a szakasz hossza adja, a GenAlEx 6.5 programmal elemeztük (PEAKALL *et* SMOUSE 2012). Az F-statisztikánál az Fstat 2.9.3.2 (GOUDET 1995), főkoordináta analízisnél és klaszteranalízisnél a Past 2.17c (HAMMER *et al.* 2001) volt segítségünkre.

4. táblázat: *A mikroszatellit analízishez felhasznált primerek (TRIEST et al. 2014)*

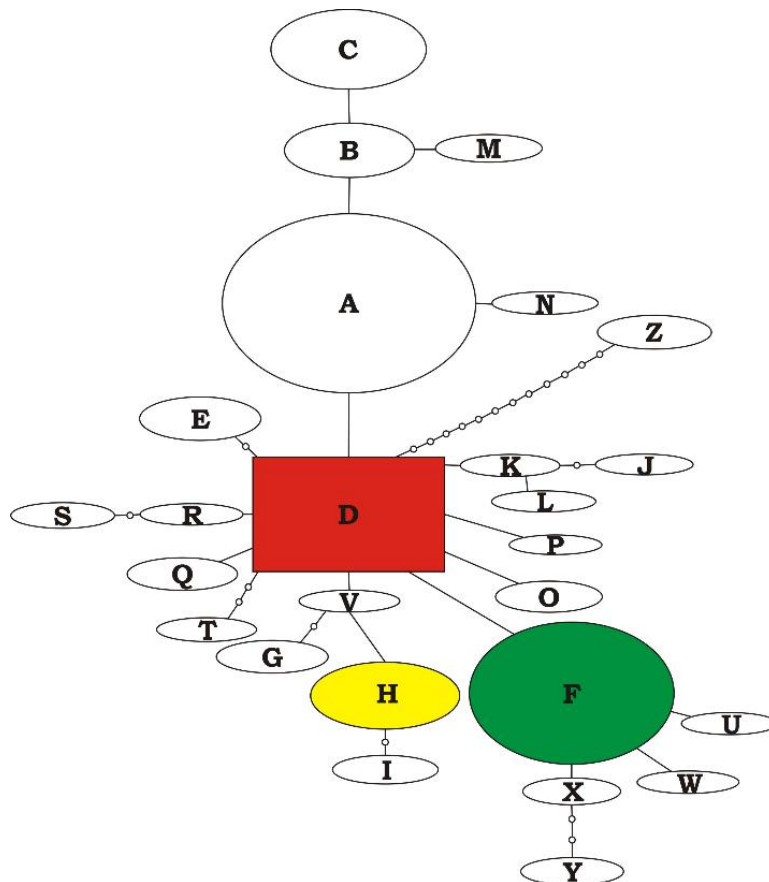
Lókuszt	Primer szekvencia	Ismétlődő motívum	Hossz
Priv4	F: PET-ACTCTTCTTGTTCTCTCCCA R: ACCTAGTTCCTCGCTCCACA	(GT) _n	73-131
Priv6	F: NED-ATCTGTTTCTTAGGTGTGTGG R: ACAAGTAACAACACAATGATG	(GT)3GGG(GT) _n	133-177
Priv7	F: VIC-GATTCCAACAACACTACGGTTCA R: CAATGAAATCTACATGTTACGCT	(GT) _n	193-212
Priv13	F: PET-AGATATTCGGTGGTGGTGA R: AAAAACCAATATTTCCAAGTTT	(GT) _n	165-197
Priv15	F: NED-ACCAGAGCTGGCACAACATA R: GATGGGAGGGGAGACATTTT	(GT) _n	191-208
Priv17	F: 6FAM-GCCGGTAATTA AAAAAGGCTGT R: TAAACGCAACCTTGTT CAGC	(GA) _n +(GA)4AA(GA) _n	414-184
Priv19	F: VIC-CATTGCGTGCGTTACGACT R: TGAAATTGATCGCTCACGAA	(GA) _n	134-164
Priv26	F: 6FAM-GCCTCTTTCTCCCTCTTTCTTC R: CGAATTACTCCTAATGCTTGAAAA	(GA) _n +(GATA) _n	232-262
Priv27	F: PET-AGTCGAGCAGCCTTG TGT TT R: TCCCTTCTTTGTTTGCTCCA	(GA) _n	134-156
Priv29	F: PET-TGAAACAAACAGTTGAAAGCA R: TTATCTGGCGGCTGCTATTT	(GA)4TA(GA) _n	198-220
Priv34	F: VIC-AATCCCATTTTGACCACCAA R: ACCTTGAAATGAGGGGAGAC	(TA) _n (GATA) _n	93-117
Priv35	F: 6FAM-TTGGTAATTCGAGGGAGTTTTT R: AATCCCTTTTTCTCCCAACG	(GA) _n	172-194
Priv36	F: 6FAM-ATACCAAGTGATGGGGCAAG R: TCTCTCCCTAGTATTCCTGAAA	(GA) _n	101-121
Priv39	F: NED-AGGGGGAGAATGCTTTTGAT R: CGTTCGACATTGCTTGAAGA	(GA) _n +(GATA) _n	135-168

4. Eredmények

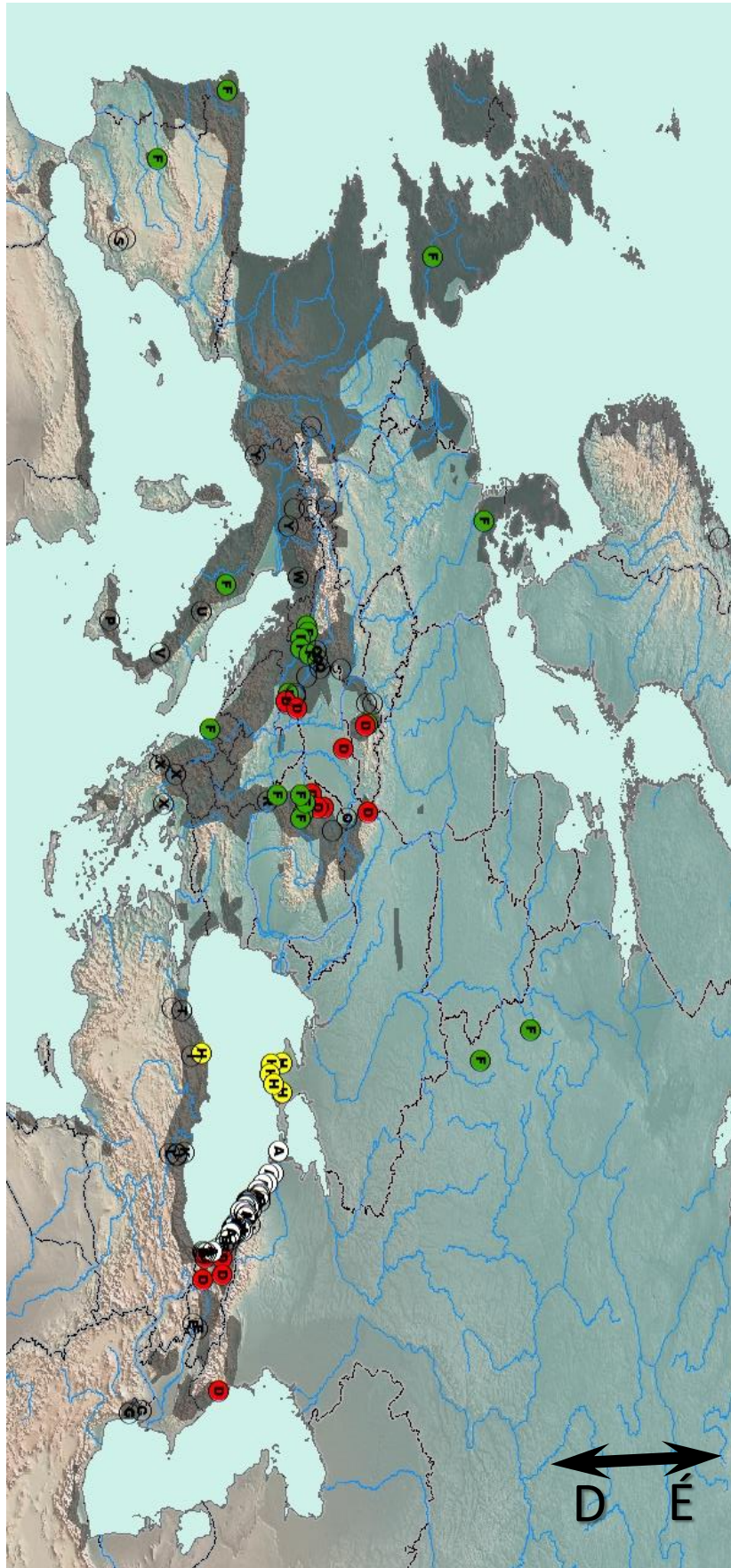
4.1. Nukleáris és plaztidiális szekvenciák analízise

Mind nrITS, mind kombinált plaztidiális szekvenciák alapján előállítottuk a vizsgált populációk ribo- illetve haplotípus hálózatát. A felfedezett mutációk között találhatók tranzíciók, transzverziók és inzerció/deléción is. Az egyes négyzetek és ellipszisek mérete az adott csoportba sorolható minták számára utal (6. és 8. ábra). Az egyértelműség kedvéért mindig ribotípusnak nevezzük az nrITS szekvenciákon alapuló unikális szekvencia-változatokat, míg haplotípusnak a trnL-F és rpl32-trnL régiók kombinálásából származóakat.

Az ITS régió hossza 713 bázispárnak adódott, amelyből 22 volt informatív. A ribotípus hálózaton öt nagy csoport jelölhető ki: a legősibbnek tartott, a Kaukázusra és a Kárpát-medencére is jellemző D, amely közvetlenül kapcsolódik a Z külcsoporthoz az ebből egy-egy mutációval származtatható, Fekete-tenger partjára jellemző A, illetve Európa jelentős részére jellemző F ribotípus. Kiemelhetjük még a Krím térségére jellemző a legősibb D ribotípusból két mutációval létrejött H ribotípust is, valamint az X ribotípust, amely az F-ből jöhetett létre egy pontmutációval és csak a mai Görögország területén jellemző (7. ábra).

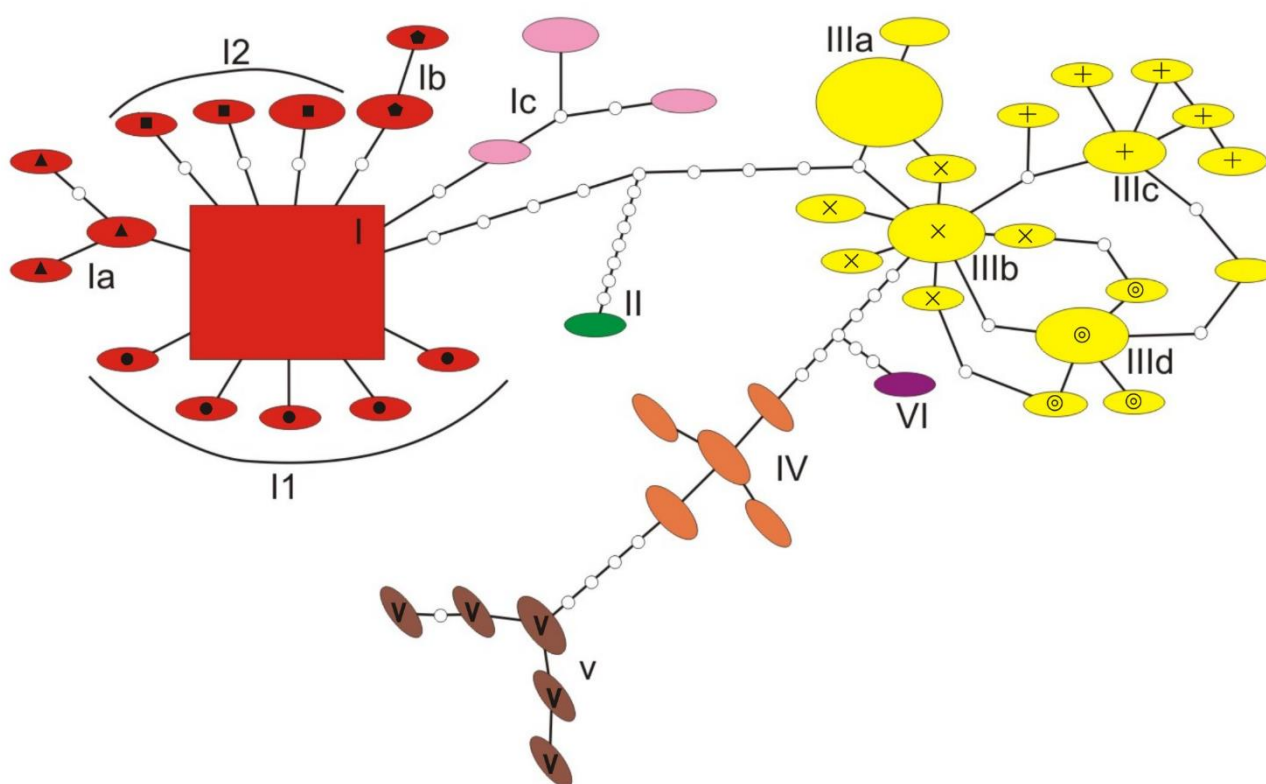


6. ábra: Az nrITS alapján készült TCS ribotípushálózat

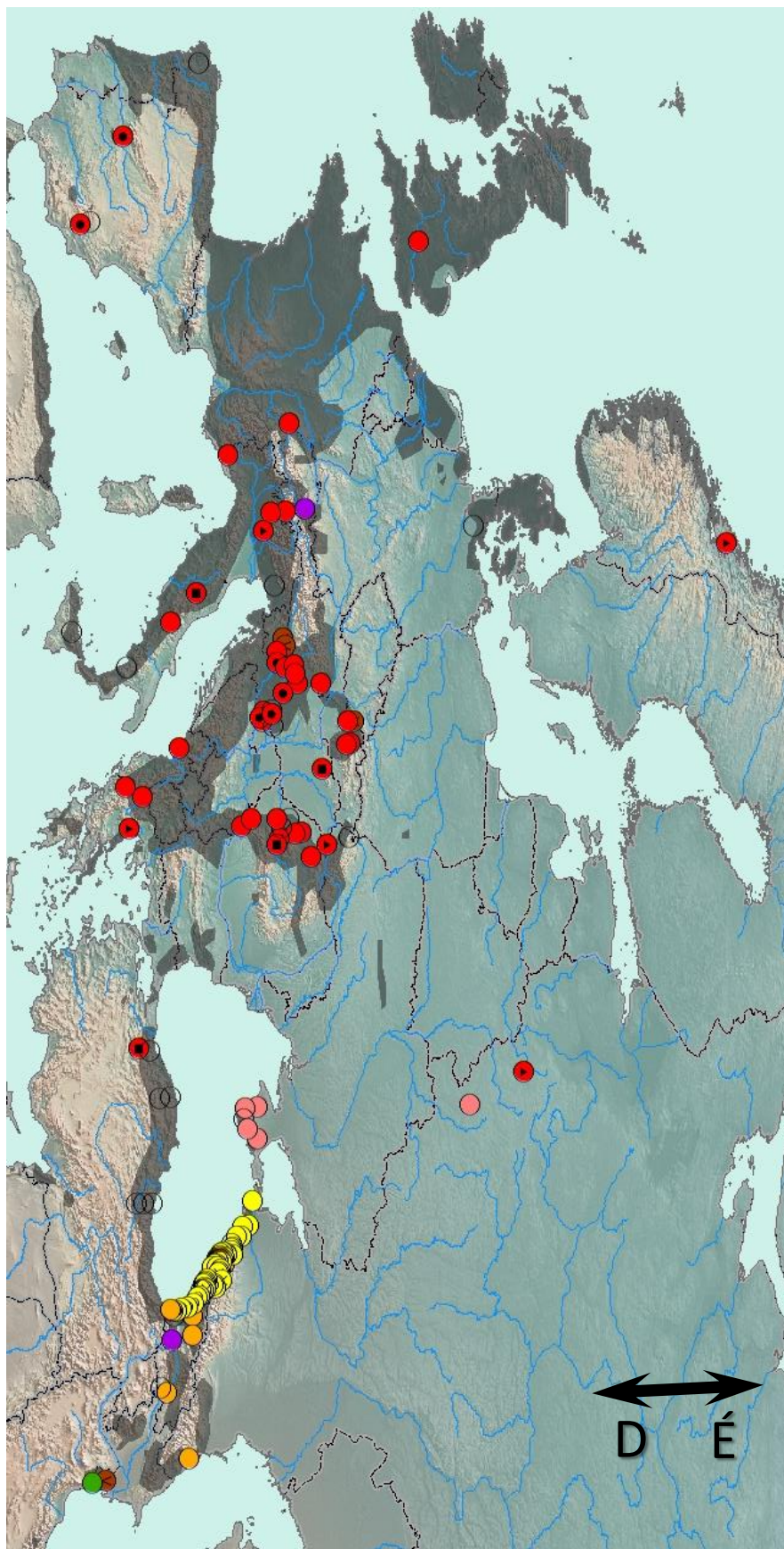


7. ábra: Az nrITS ribotípusok térbeli eloszlása

A kombinált plasztidiális markerek szekvenciáinak hossza 790 bázispár volt, amely 18 informatív karaktert tartalmazott. Az *rpl32-trnL* és *trnL-trnF* markerek alapján rekonstruált TCS haplotípus hálózaton négy nagy csoportot különböztethetünk meg: a narancssárgával jelölt Kaukázusra jellemző IV haplotípuscsoportot, a Fekete-tenger partjára jellemző sárgával jelölt III-as , illetve az Európa nagy részére jellemző vörössel jelölt I-es haplotípuscsoportot. Itt is külön kiemelhetjük a Krím térségét, mivel egyedül itt jellemző a lilával jelölt Ic haplotípuscsoport. Felfedezhetünk kisebb szatellit előfordulásokat, ezek valószínűleg hibridizáció következményei, így filogeográfiai mintázat térképezésére nem alkalmasak (9. ábra).

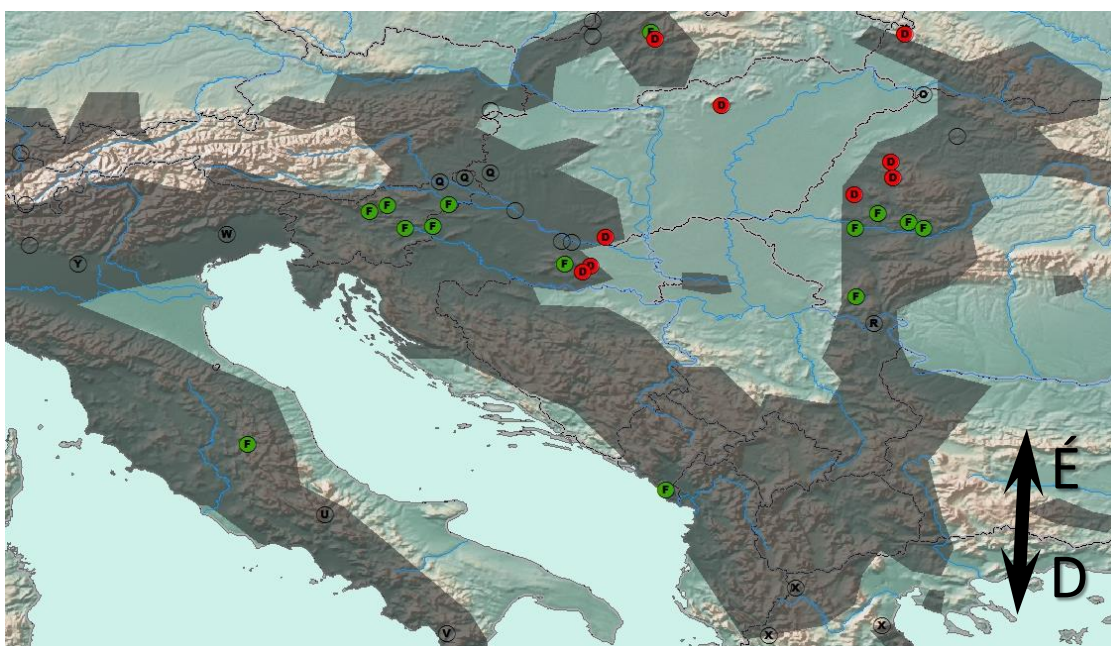


8. ábra: Plasztidiális szekvenciák alapján készült TCS haplotípushálózat

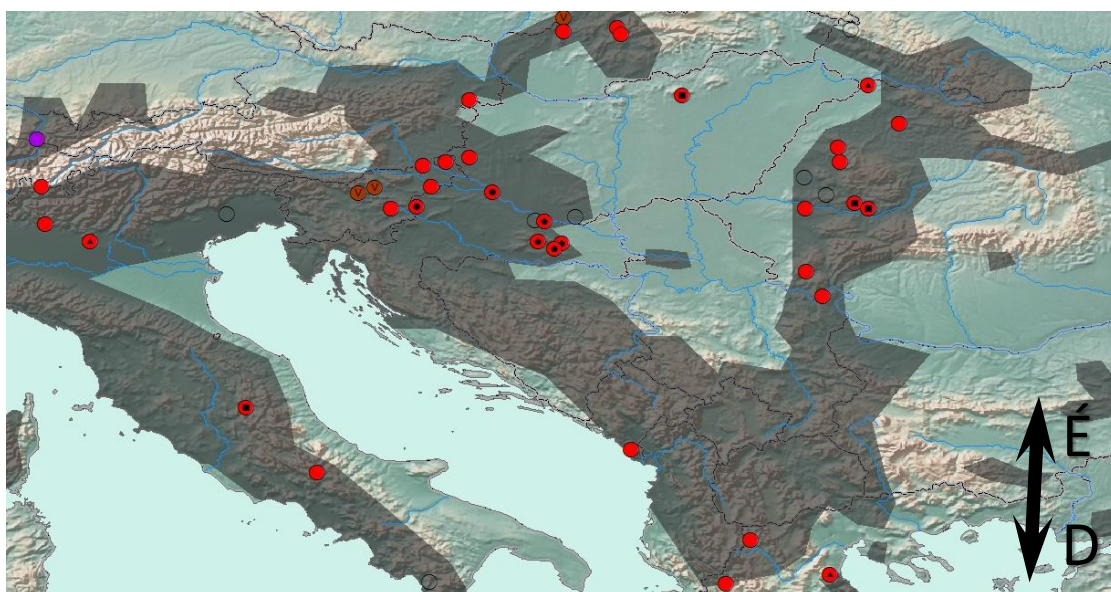


9. ábra: *Plasztidiális haplotípusok térbeli elhelyezkedése*

A Kárpát-medencére vonatkozóan nrITS szekvenciák alapján elmondhatjuk, hogy a Kaukázusra is jellemző, a TCS által legősibbnek tartott D ribotípus itt is előfordul. Megtalálható még az Európa nagy részére jellemző, a D-ből egy mutációval létrejött F ribotípus is, valamint felfedezhetjük a D-ből egy-egy mutációval származtatható Q, O, R ribotípusokat (**10. ábra**). Plasztidiális szekvenciák alapján térségünkre az I-es haplotípuscsoport jellemző. Itt is kiemelhetünk az előbb említett csoporttól nagy genetikai távolságra elhelyezkedő haplotípusokat, ezek valószínűleg szintén szatellit előfordulások és nem alkalmasak filogeográfiai analízis céljára (**11. ábra**).



10. ábra: A Kárpát-medencében található ribotípusok



11. ábra: A Kárpát-medencében található haplotípusok

4.2. Mikroszatellitek analízise

Mikroszatellit adatok alapján a GenAlEx program segítségével elvégeztük a molekuláris varianciaanalízist (AMOVA), amely populációk között 31%-nak, egyedek között 12%-nak, egyedeken belül 57%-nak adódott. Korábbi tapasztalatok alapján kijelenthetjük, hogy a populációk közötti 31%-os érték magasnak számít, vagyis a Kárpát-medencei populációk magas molekuláris varianciával rendelkeznek (12. ábra).



12. ábra: Mikroszatellitek alapján készült molekuláris varianciaanalízis (AMOVA)

A páronkénti F_{st} értékeket (5. táblázat) és azok szignifikanciájának szintjét (6. táblázat) az Fstat programmal számítottuk. A szignifikanciaértékek alapján megállapíthatjuk, hogy habár kisebb-nagyobb mértékben, de minden populáció szignifikánsan különbözik egymástól. Ez meglepő adat, ha figyelembe vesszük azt is, hogy mintázásra kerültek olyan populációk is, amelyek földrajzilag viszonylag kicsi, azonban F_{st} értékek alapján nagy genetikai távolságra helyezkednek el egymástól.

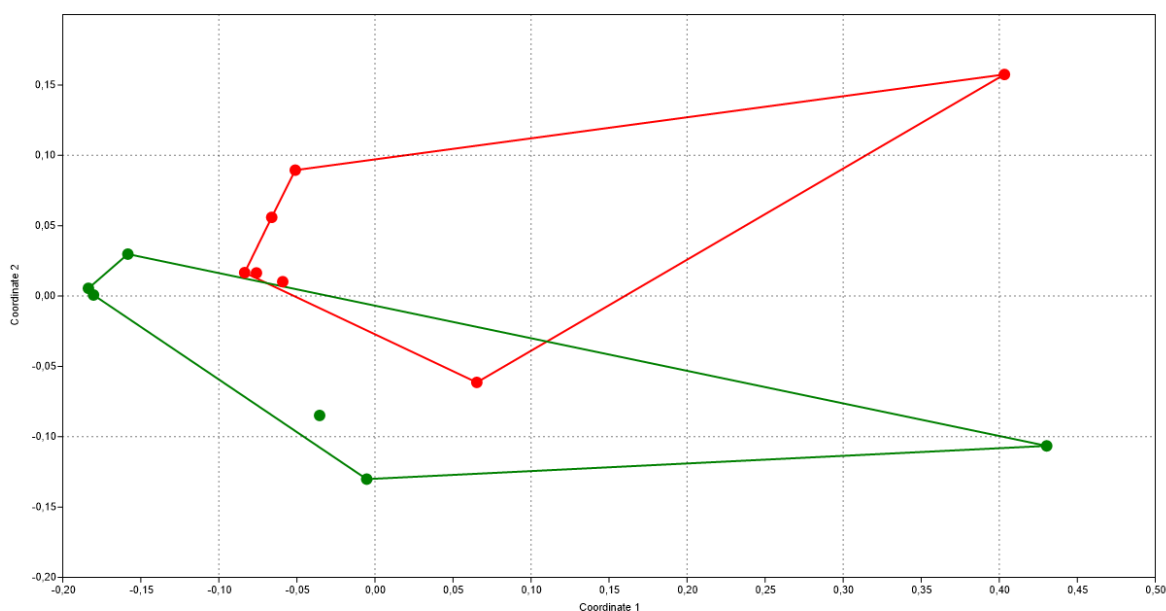
5. táblázat: Páronkénti F_{st} értékek

	Slk_W1	Slk_W2	Cr_W3	Hu_W4	Slo_W5	Slo_W6	Hu_W7	Ro_E1	Ua_E2	Ro_E3	Ro_E4	Ua_E5	Ro_E6
Slk_W1	0	0,3099	0,1882	0,1921	0,1815	0,2151	0,2644	0,2199	0,304	0,2565	0,5158	0,2545	0,2859
Slk_W2	0,3099	0	0,1593	0,1142	0,1418	0,1101	0,1422	0,1573	0,2321	0,1897	0,3458	0,1678	0,2037
Cr_W3	0,1882	0,1593	0	0,0696	0,0569	0,0726	0,1114	0,0921	0,1411	0,1531	0,3691	0,1021	0,1198
Hu_W4	0,1921	0,1142	0,0696	0	0,0409	0,061	0,0973	0,0779	0,1604	0,1437	0,352	0,1083	0,1586
Slo_W5	0,1815	0,1418	0,0569	0,0409	0	0,0549	0,097	0,0648	0,1244	0,1209	0,3337	0,0754	0,1533
Slo_W6	0,2151	0,1101	0,0726	0,061	0,0549	0	0,0745	0,0823	0,1446	0,1167	0,3262	0,096	0,1493
Hu_W7	0,2644	0,1422	0,1114	0,0973	0,097	0,0745	0	0,1393	0,1354	0,1546	0,3584	0,1384	0,1857
Ro_E1	0,2199	0,1573	0,0921	0,0779	0,0648	0,0823	0,1393	0	0,1521	0,0912	0,3186	0,0712	0,1266
Ua_E2	0,304	0,2321	0,1411	0,1604	0,1244	0,1446	0,1354	0,1521	0	0,1728	0,349	0,1385	0,2349
Ro_E3	0,2565	0,1897	0,1531	0,1437	0,1209	0,1167	0,1546	0,0912	0,1728	0	0,3069	0,1129	0,1737
Ro_E4	0,5158	0,3458	0,3691	0,352	0,3337	0,3262	0,3584	0,3186	0,349	0,3069	0	0,3533	0,3975
Ua_E5	0,2545	0,1678	0,1021	0,1083	0,0754	0,096	0,1384	0,0712	0,1385	0,1129	0,3533	0	0,1375
Ro_E6	0,2859	0,2037	0,1198	0,1586	0,1533	0,1493	0,1857	0,1266	0,2349	0,1737	0,3975	0,1375	0

6. táblázat: Páronkénti F_{st} értékek szignifikanciája

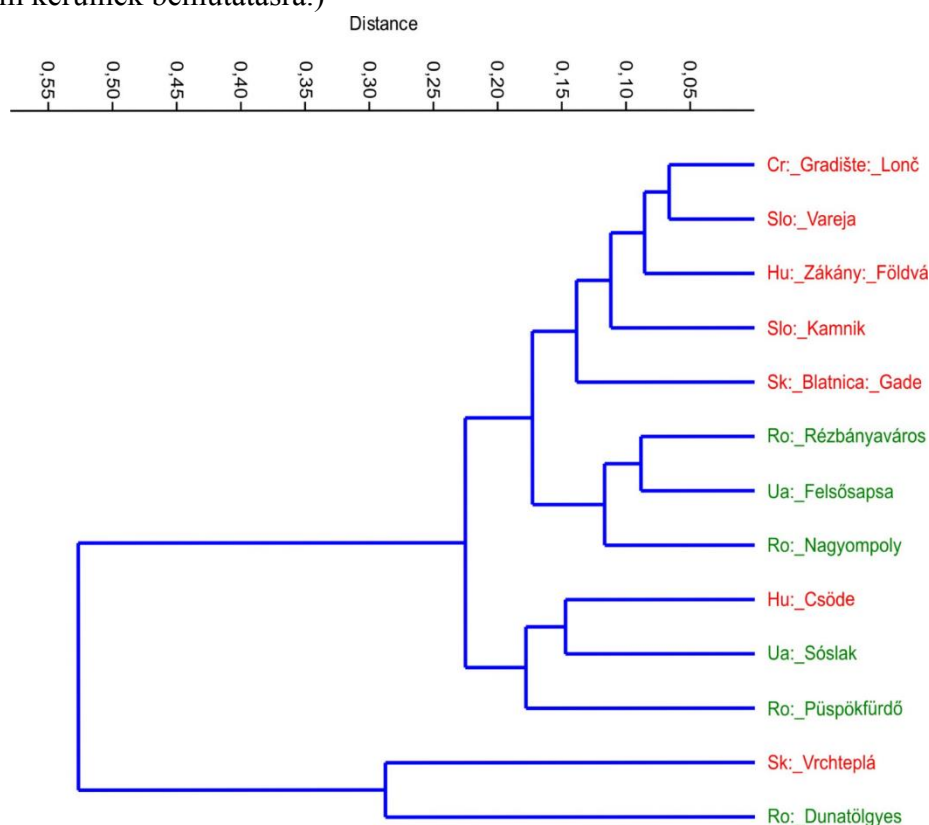
	Slk_W1	Slk_W2	Cr_W3	Hu_W4	Slo_W5	Slo_W6	Hu_W7	Ro_E1	Ua_E2	Ro_E3	Ro_E4	Ua_E5	Ro_E6
Slk_W1		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Slk_W2			**	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**
Cr_W3				**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Hu_W4					*	**	**	**	**	**	**	**	**
Slo_W5						**	**	*	**	**	**	**	**
Slo_W6							**	**	**	**	**	**	**
Hu_W7								**	**	**	**	**	**
Ro_E1									**	**	**	**	**
Ua_E2										**	**	**	**
Ro_E3											**	**	**
Ro_E4												**	**
Ua_E5													**
Ro_E6													

GenALEx használatával létrehoztuk a populációk közötti, kodomináns markeren alapuló genetikai távolságmátrixát, majd tovább elemeztük az adatokat. A Past program felhasználásával a főkoordináta analízist végeztünk, Gower algoritmus normalizációja mellett (**13. ábra**). Az első koordináta az adatok 72,63%-át magyarázza, míg a második 11,92%-ot. Ezek alapján a keleti és nyugati ágak nem válnak el teljesen egymástól, illetve az egyes ágakon belül is rendkívül nagy genetikai távolságot találunk az egyes populációk között. Itt felfedezhetünk két, csoporton belül is kimagasló értékekkel rendelkező populációt, ez a pirossal jelölt nyugati ág esetében a vrchteplá-i, a zölddel jelölt keleti ág esetében a dunatölgyesi növények.



13. ábra: Páronkénti genetikai távolság alapján készült főkoordinátaanalízis (PCoa)

Szintén a Past program használatával Gower algoritmus alapján klaszteranalízist végeztünk (**14. ábra**), ahol az előbb említett két populáció szintén élesen elválik. Észre kell még vennünk, hogy a két ág itt sem különül el teljesen, valamint jelentős genetikai távolságokat fedezhetünk fel. Ki kell emelnünk, hogy a Kárpát-medencén belüli migrációs útvonalak rekonstruálására alkalmas mintázatot nem fedezhetünk fel a kladogramon, mivel például a földrajzilag távol elhelyezkedő csödei és sóslaki populáció genetikai közelebb található egymáshoz, mint bármely földrajzilag közelebb elhelyezkedő populáció. Ezt a jelenséget az adatsor zajosságaként értelmeztük. A probléma megoldásához az analíziseket újrafuttattuk, (i) olyan lókuszok figyelmen kívül hagyásával, amelyek eltértek a Hardy-Weinberg egyensúlytól (ez utóbbit GenAlEx-szel számítottuk ki), (ii) olyan egyedek kihagyásával, amelyek egy, vagy több lókuszon kiugró értékekkel rendelkeztek, illetve (iii) a Hardy-Weinberg egyensúlytól eltérő lókuszok és szélsőséges értékekkel rendelkező egyedek kihagyásával. A genetikai távolság ennek ellenére nem csökkent jelentősen és a struktúra sem változott érdemben. (Ezek az eredmények itt nem kerülnek bemutatásra.)

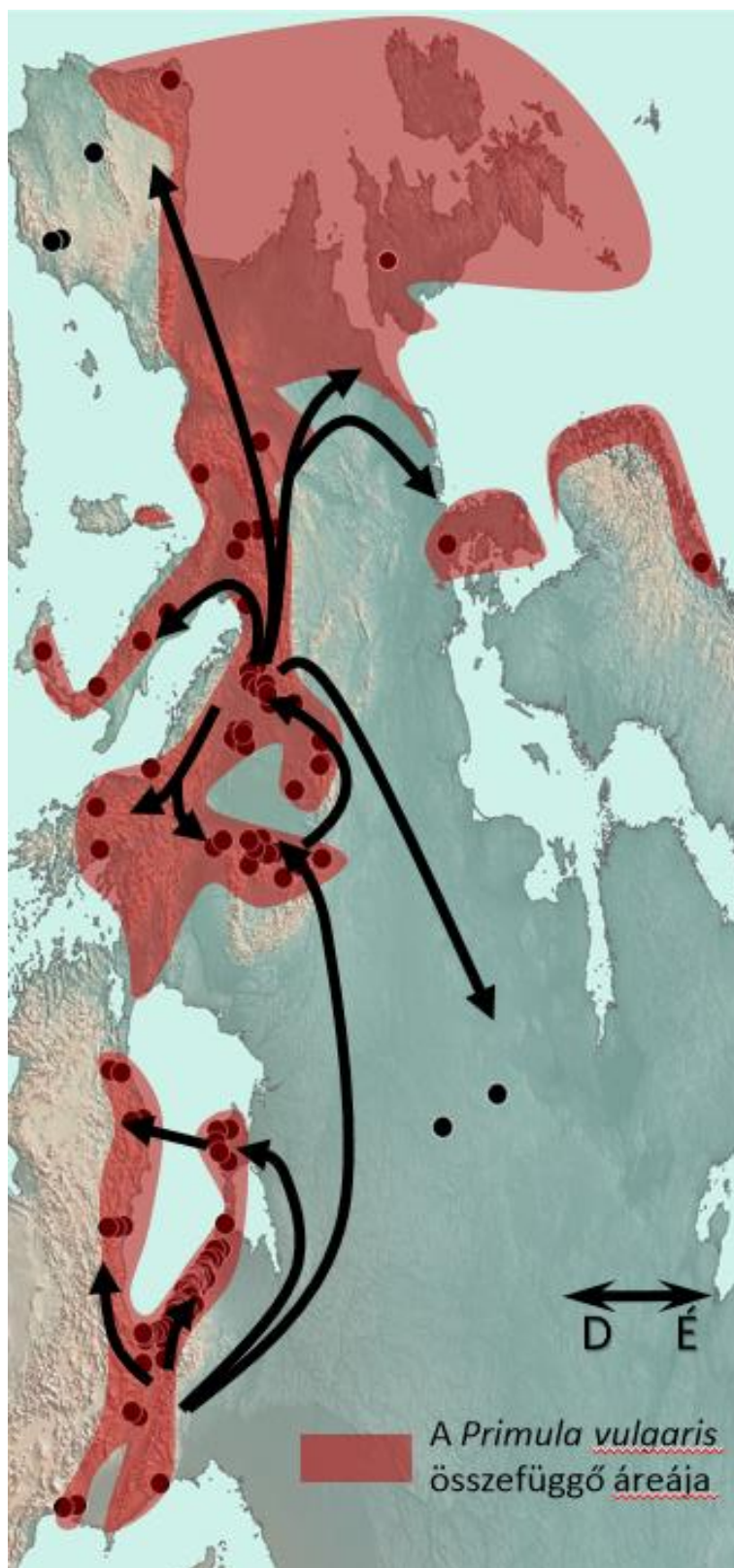


14. ábra: Páronkénti genetikai távolság alapján készült klaszteranalízis

5. Diskusszió

Európai léptékben az illír-dácikus harapófogó kapcsán feltételezett déli-északi irányultságú migrációval ellentétben kelet-nyugati irányú kolonizációs események következhetek be. Adataink alapján rekonstruálhatjuk a feltételezett migrációs útvonalakat a *Primula vulgaris* esetében (**15. ábra**). A sejtmagi és plaztidiális szekvenciák alapján valószínűleg a Kaukázus területén létezett egy ősi populáció, amelyet a IV haplotípus uralt. Kolonizációs események következtében a faj áréája ezután egybefüggő lehetett egészen a Kárpát-medence keleti feléig, ekkor alakulhatott ki az I haplotípus, valamint a teljes áréán uralkodó volt a D ribotípus. Az área felszakadozhatott, a növény fennmaradt a Kaukázusban, a Krímben és a Kárpát-medencében. Ekkor alakult ki a Krímre jellemző H ribotípus. Feltehetőleg régiókban alakult ki a legősibb D-ből származó F ribotípus, amely újabb kolonizációs események után Európa-szerte elterjedté vált, valamint újabb ribotípusok létrejöttét eredményezte. Ebből arra következtetünk, hogy a Kárpát-medence központi szerepet játszhatott a növény elterjedését illetően, mivel az área felszakadozása után a növény itt maradt fent reprezentálva a legősibb ribotípust. További ribotípusok alakulhattak ki a Kaukázusból történő migráció során; itt jöhettek létre a K, L, J ribotípusok. A Kárpát-medencében nem találtunk megfelelő bizonyítékot az illír-dácikus harapófogó hipotézis helyességére, mivel sem az ITS ribotípusok, sem a plaztid haplotípusok elhelyezkedése nem támasztja alá, lévén a feltételezett keleti és nyugati ágakon is megtalálhatók azonos ribo- és haplotípusok.

Mikroszatellitok alapján azt feltételezhetjük, hogy a zajos adatsor háttérében valamilyen biológiai ok áll. Az ilyen nagy variancia és genetikai távolság kialakulásához sok idő szükséges, így azt feltételezhetjük, hogy a Kárpát-medencei populációk régóta jelen vannak a területen, ennek következtében alakult ki közöttük nagy genetikai távolság, amely feltételezést az nrITS adatsor alátámaszt. Az illír-dácikus harapófogó elméletet mikroszatellit adatok alapján sem tudjuk alátámasztani, mivel nem fedeztünk fel olyan struktúrát, amely lehetővé tenné az itt végbe ment kolonizációs események útvonalainak rekonstruálását.



15. ábra: A feltételezett posztglaciális kolonizációs útvonalak

6. Konklúzió

A *Primula vulgaris* esetében európai léptékben kelet-nyugati irányú migráció figyelhető meg, valamint megállapíthatjuk, hogy az área felszakadozásakor Európa kolonizációjában a Kárpát-medencének jelentős szerepe lehetett. Szekvenciális adatok alapján azt valószínűsítjük, a faj a Kaukázus felől települhetett be térségünkbe, illetve a mikroszatellit adatsor alapján azt mondhatjuk, hogy régóta jelen van a területen. Az illír-dácikus harapófogó elméletére nem találtunk megfelelő bizonyítékot, így a hipotézis nem bizonyult igaznak a *P. vulgaris* esetében.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Hűvös-Récsi Annamáriának, Magos Gábornak, Molnár V. Attilának, Könyves Kálmánnak, Tim Sierensnek és Lukács Balázs Andrásnak a minták begyűjtésében nyújtott segítségüket. Külön köszönjük társszerzőink, Polina Volkova és Ludwig Triest együttműködését.

Témavezetőm munkáját a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása és a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

8. Irodalomjegyzék

- BORHIDI, A. (2002) „Borbás és az Ősmátra a Balaton Flórájában” Collecta Clusiana **6** (Borbás Emlékelőadások 2000): 37-40.
- CLEMENT, M, POSADA, D., CRANDALL, K. (2000) „TCS: a computer program to estimate gene genealogies.” Molecular Ecology **9**(10): 1657-1660
- CORPET, F. (1988) „Multiple sequence alignment with hierarchical clustering” Nucleic Acids Research **16**(22): 10881–10890.
- DEVEY, D.S., CHASE, M.W., CLARKSON, J.J. (2009) „A stuttering start to plant DNA barcoding: microsatellites present a previously overlooked problem in non-coding plastid regions” Taxon **58**: 7–15
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. (1987) „A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue” Phytochemical Bulletin **19**: 11–15
- ELLEGREN, H. (2004). „Microsatellites: simple sequences with complex evolution” Nature reviews genetics **5**(6): 435-445.
- GOUDET, J. (1995). „FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics” Journal of Heredity **86**(6): 485-486.
- GULYÁS, G., SRAMKÓ, G., MOLNÁR, A.V., RUDNÓY, SZ., ILLYÉS, Z., BALÁZS, T., BRATEK, Z. (2005). „Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae) ” Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **47**: 61-67.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001. PAST „Paleontological statistics software package for education and data analysis” Palaeontologia Electronica **4**(1)
- HENDRYCH, R. (1996). „*Primula vulgaris* in der Slowakei und in den umliegenden Gebieten” Preslia-Praha **68**: 135-156.
- JACQUEMYN, H., ENDELS, P., BRYN, R., HERMY, M., WOODDELL, S.R.J. „(2009). Biological Flora of the British Isles: *Primula vulgaris* Huds. (*P. acaulis* (L.) Hill) ” Journal of ecology **97**(4): 812-833.
- MEUSEL, H., JÄGER. E. (1965): „Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora” Jena: G. Fischer.

- PEAKALL, R., SMOUSE P.E. (2012) „GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update” Bioinformatics **28**, 2537-2539
- SHAW, J., EDGAR B, L., SCHILLING, E.E., SMALL, R.L. (2007). „Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. ” American Journal of Botany **94**(3): 275-288.
- SRAMKÓ, G. (2004). „Dunántúli” közép-dunai flóraválasztós fajok a Matricum flórájában” Kitaibelia **9**(1): 31-56
- TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A.G., COSSON, J.F. (1998). „Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe” Molecular Ecology **7**(4): 453-464.
- TRIST, L., SIERENS, T., VAN ROSSUM, S. (2014). „Multiplexing 15 microsatellite loci for European primrose (*Primula vulgaris*) ” Conservation Genetics Resources: 1-3
- VARGA, Z. (1964) „Magyarország állatföldrajz beosztása a nagylepke-fauna komponensei alapján” Folia Entomologica Hungarica **17**(8): 119-167.
- VOLKOVA, P. A., SCHANZER, I. A., MESCHERSKY, I. V. (2013). „Colour polymorphism in common primrose (*Primula vulgaris* Huds.): many colours–many species?” Plant Systematics and Evolution **299**(6): 1075-1087

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Laczkó Levente a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- részben a minták begyűjtését
- DNS-kivonatok előállítását
- PCR reakciók összeállítását és futtatását
- a reakciók sikerességének ellenőrzését agaróz-gélelektroforézis segítségével
- az előállított szekvenciák olvasási hibáktól való tisztítását
- a "kontig"-szekvenciák előállítását
- az adatanalízisek előkészítését
- részben az eredmények értékelését

végeztem el.

Debrecen, 2014 december 15.



.....
Laczkó Levente