PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Biológia Doktori Iskola
Botanika Program

Levélanatómiai és molekuláris filogenetikai módszerek értékelése kritikus *Rubiaceae* taxonokon

Ph.D. értekezés tézisei

Stranczinger Szilvia

PÉCS, 2007

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Botanika Program

Levélanatómiai és molekuláris filogenetikai módszerek értékelése kritikus *Rubiaceae* taxonokon

Ph.D. értekezés tézisei

Stranczinger Szilvia

Témavezetők:

Prof. Dr. Borhidi Attila

MTA rendes tagja, emeritusz professzor

Dr. Varróné dr. Darók Judit

egyetemi docens

PÉCS, 2007

Stranczinger Szilvia
Pécsi Tudományegyetem, Növényrendszertani és Geobotanikai Tanszék
H-7624 Pécs, Ifjúság u. 6.
Tel: 72/503-600/4862
Fax: 72/501-520
e-mail: sziszi55@gamma.ttk.pte.hu

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a növényfajok rendszerezésében a hagyományos morfológiai vizsgálatok mellett egyre nagyobb teret hódítanak a DNS alapú filogenetikai analízisek. A Rubiaceae család, mely a virágos növények családjai közt az egyik legnagyobb és egyben a kétszikűek evolúciójának csúcsálló taxonja, ezen kutatások középpontjában áll.

A modern taxonómiai eljárások közül a morfológiai alapokon történő kladisztikai analízist követően egyre több, molekuláris adatokon alapuló filogenetikai rendszer született. A különböző DNS régiók vizsgálata ellenére, szinte minden tanulmányban találunk olyan eredményeket, amelyeket nem tudunk az egyes taxonok eddig ismert leírása alapján magyarázni.

A Rondeletieae tribuszba tartozó fajgazdag *Rondeletia* nemzetség kutatása során kiderült, hogy a tág értelmezésű fajcsoportot több, már a múlt században leírt nemzetségre kellene osztani. A fajok nagy részét rendszertanilag átsorolták, fejlődéstörténetének leírását módosították. A DNS szekvencia adatok filogenetikai vizsgálata alátámasztotta a *Rondeletia* nemzetség kisebb nemzetségekre való felosztását.

Az *Exostema* nemzetség fajainak és szekcióinak elkülönítésére számos, morfológiai és molekuláris alapú kísérlet történt. A kombinált morfológiai és filogenetikai vizsgálatok ellenére sincs egységes nézet a csoport rendszerezésében.

A *Randia* nemzetség rendszertani helyzete, és belső tagolódása mind a mai napig tisztázatlan. Kezdetben morfológiai jellemzők alapján, majd később filogenetikai vizsgálatokkal próbálták világossá tenni a nemzetség taxonómiáját.

Munkánk során a fent említett taxonok rendszertani vizsgálatát végeztük egyrészt levélerezet mikromorfológiai (*Exostema* és *Rondeletia* nemzetség), másrészt filogenetikai alapokon (*Rondeletia*, *Randia* és *Hintonia* taxonok).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A korábbi flóraművek a növényeket elsősorban külső morfológiai bélyegek alapján tárgyalták. A korszerűbb rendszertani munkákban a taxonómusok arra törekednek, hogy egyre több szempont alapján jellemezzék az egyes növényfajokat és magasabb rendszertani egységeket. A zárvatermők rendszerezésében a florális karakterek használata a leggyakoribb. A vegetatív bélyegeket sokáig kockázatos bizonyítékoknak tekintették, mivel sok esetben nemrokon növényekre is lehetnek jellemzőek látszólag hasonló tulajdonságok. Mindezek ellenére a legjobb rendszerekben mind a reproduktív, mind a vegetatív vonásokat figyelembe veszik.

A nem reproduktív szervek közül a levél vizsgálata terjedt el a legszélesebb körben, mivel széles taxonómiai körben összehasonlíthatóak és általában sokkal hosszabb ideig vannak jelen a növényen. Ezért a Rubiaceae család rendszerezésében eddig még nem használt, levélerezet mikromorfológiai tulajdonságok taxonómiai értékét vizsgáltuk.

Napjainkban a rendszertani kutatások új irányát a DNS alapú filogenetikai vizsgálatok jelentik. Számos vitatott helyzetű növénycsoport került új megvilágításba a különböző DNS régiók szekvencia analízisével. Kutatásunk célja, hogy csatlakozzunk ehhez a nemzetközi irányvonalhoz olyan molekuláris filogenetikai rendszer kidolgozásával, amely választ ad a Rubiaceae család egyes tribuszaihoz tartozó nemzetségek és fajok filogenetikai helyzetének tisztázásához.

A filogenetikai vizsgálatokkal három kérdés megoldásához kívántunk hozzájárulni: 1. A Rondeletieae tribuszban a Rondeletia komplex 3 nemzetségének elválasztása; 2. A Cinchoneae tribusz *Hintonia* nemzetségén belül egy faji szintű különbség igazolása; 3. A Gardenieae tribuszban a *Randia* nemzetség belső tagolódásának pontosabb megismerése.

A fenti kérdések tisztázása a Flora Mesoamerica nemzetközi projekt célkitűzésének részét képezi.

3. ANYAG ÉS MÓSZER

3.1. A levél erezetének vizsgálata

Az *Exostema* és *Rondeletia* nemzetséghez tartozó fajok levélerezetének vizsgálatához szükség volt egy új levélderítési módszer kikísérletezésére. Az alkalmasnak bizonyult eljárást több, ismert módszer kombinációjaként kaptuk, a fajok herbáriumi levélanyagát használva. A mintavétel fajonként 5–5 db levélből történt. A vizsgálandó leveleket, illetve levéldarabokat kb. 10 cm átmérőjű bepárló csészében azbesztháló fölött 15 ml desztillált vízben néhány percig lassan forraltuk, míg a víz mennyisége kb. a felére csökkent. Az előkészített levéldarabokra 8 ml 10 %-os alkoholos kálilúgot (lúg-alkohol térfogat-arány 7:3) adtunk és tovább forraltuk még 4–5 percig.

A lúgos forralás végén a forrásban levő anyagra kb. 4 ml 5%-os hidrogénperoxidot öntöttünk, és újbóli felforrásig a csészét a láng felett hagytuk. Az azbeszthálóról levéve annyi 10%-os alkoholos kálilúgot öntöttünk a levelekre, hogy azokat éppen ellepje. Ebben az oldatban hagytuk a mintákat kb. 24 órát. Az áztatott levéldarabokról a folyadékot leöntöttük, majd az anyagot desztillált vízzel 2–3-szor jól átöblítettük. A kimosott levéldarabokhoz annyi 10%-os alkoholos kálilúgot adtunk, hogy azokat éppen ellepje. Ebben az oldatban lassan forraltuk 3–4 percig. A lúgos forralás végén a forrásban levő anyagra kb. 10 ml 96%-os alkoholt öntöttünk, majd addig forraltuk, míg a levéldarabok teljesen el nem színtelenedtek. A tisztított levelekről a folyadékot leöntöttük, majd az anyagot desztillált vízzel 2–3-szor jól átöblítettük. Az elszíntelenedett leveleket Petri-csészébe helyeztük, majd a maradék desztillált vizet itatóspapírral eltávolítottuk. Az így elkészített minták 1–2 napos száradás után mikroszkóppal vizsgálhatók. Az ismertetett műveletek idejére a bepárló csészében levő levéldarabkákat ún. derítősapkával fedtük le.

A derített levél levélerezetének vizsgálatát LEICA WILD M 420 sztereomikroszkóppal 10×-es nagyítással végeztük. A derített levelek 3 pozíciójában (a levél alapi, középső és csúcsi részén) 20–20 db felvételt készítettünk, ahol a felvételi egységek 2×2 mm, illetve 1×4 mm területnek felelnek meg. Az így kapott eredmények átlagát, illetve az értékek egymástól való szórását Windows Excel program segítségével számítottuk ki és ábrázoltuk. A Rondeletia fajok esetében a kész preparátumok vizsgálata NIKON ECLIPSE 80i típusú mikroszkóppal történt. A morfológiai paramétereket Image Tool 1.27 program segítségével mértük.

A levélerezet vizsgálatának szempontjai a következők voltak: areolaszám, érvégződés-szám, érvégződés típusok, érvégződés divergencia, érszigetek morfológiája, érvégződések morfológiája, érszigetek mérete, a levélerezet sűrűsége.

3.2. Filogenetikai analízis

A totál DNS tisztítást FCME herbáriumból származó levél anyagból végeztük. A vizsgált DNS szakaszok (*rps*16 kloroplaszt intron és ITS nukleáris DNS) felszaporítása PTC-200 GradientCycler (MJ Research, INC.) készülékben történt. A teljes ITS szakasz amplifikálásához ITS4 és ITS5, míg az ITS1 régió felszaporításához ITS2 és ITS5 primereket használtunk. Az *rps*16 intron felszaporítása rpsF és rpsR2 primerekkel történt. A PCR reakcióban résztvevő elegy végtérfogata 50 µl volt. A PCR reakció eredménye egy megközelítőleg 800 bp hosszú *rps*16 intron, egy kb. 700 bp nagyságú ITS régió és egy 300 bp ITS1 fragment lett. A PCR termékek tisztítása után a szekvenálási reakciót BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems) állítottuk elő a gyártó cég leírása alapján. A vizsgált DNS szakaszok szekvenálásához az amplifikálásuknál használt primereket használtuk. Az elektroforézis ABI

PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) géppel a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben történt a gyártó intézet leírása szerint.

A szekvenciák analízisét három nagy csoportra osztottuk: 1. a Rondeletia komplex nemzetségeinek elkülönítése, 2. a *Randia* nemzetség belső tagolódásának megismerése, 3. a *Hintonia latiflora* és *H. standleyana* taxonok faj szintű elválasztásának szekvencia alapú igazolása. Mindhárom vizsgálat esetében a saját szekvenciákat kiegészítettük az NCBI GenBank-ban szereplő szekvenciákkal.

A filogenetikai fa „gyökeresítésére" olyan, a vizsgált taxonokhoz rendszertanilag kapcsolódó külső csoportot választottunk, amely evolúciósan távolabb áll a belcsoporttól, mint annak tagjai egymástól. A szekvenciák összerendezését (alignment) elsőként ClustalW v1.7 program segítségével végeztük el. A DNS szekvenciákat ezután GeneDoc v2.3 programmal újrarendeztük és javítottuk, a megfelelő DNS szekvenciát alapul véve. Az alignmentek optimalizálása után kialakult réseket (gap) a végső filogenetikai analízisek során, mint hiányzó karakterek kezeltük. A kladisztikai analíziseket PAUP* 4.0 szoftver Windows® XP® verziójával készítettük a „legnagyobb takarékosság" (Maximum Parsimony) módszerét alkalmazva. Így olyan fát kaphatunk, amely a lehető legkisebb számú karakterállapot változást (evolúciós lépés) teszi szükségessé a leszármazási viszonyok megmagyarázásához. A kapott filogenetikai fa pontosságának és megbízhatóságának tesztelését bootstrap vizsgálattal végeztük. A kapott bootstrap érték %-ban fejezi ki, hogy hány esetben egyezett az adott elágazásban a kapott filogenetikai fa az eredetivel. A 85–100% bootstrap értékeket magasnak tekintettük, az adott elágazás topológiáját alátámasztottnak vettük. A 75–84% bootstrap érték mérsékelten, míg az 50–74% csak alacsonyan támogatja az adott elágazás kapott topológiáját.

A kapott filogenetikai fa statisztikai értékelése magában foglalja a konzisztencia-indexet (CI; consistency index) és az összetartozási-indexet (RI; retention index) is. Mindkét index a homoplázia mértékét mutatja az adott filogenetikai fában.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A vizsgált taxonok levélerezetének jellemzői

Az egyes *Exostema* és *Rondeletia* taxonok jellemzését az érszigetek és érvégződések kvantitatív és kvalitatív vizsgálata alapján végeztük el. Ezt követően a vizsgálati eredményeket a fajok, szekciók és a két genusz közötti összefüggésben értékeltük. A levelek csúcsi részeit vizsgálva az areolaszám értékei sem nemzetség, sem szekció szinten nem mutatnak egységes képet. Legnagyobb értéket a különböző szekcióba és eltérő élőhelyen előforduló *E. myrtifolium* (45,45 db)

és *E. purpureum* (45,2 db) esetében kaptuk. Legkisebb areolaszám a *Rondeletia* nemzetséget, azon belül viszont a különböző szekcióba és eltérő élőhelyen előforduló *R. ekmanii* (8,7 db) és *R. brigandiana* (11,6 db) fajokat jellemzi. A levelek ezen pozíciójában vizsgált érvégződésszám értékek közül kiugrik az *E. velutinum* (108,4 db) és *E. lineatum* (105,8 db). A levél csúcsi részének érvégződésszám értékei a két nemzetséget elkülönítik, amelyek alacsonyabbak a vizsgált *Rondeletia* fajok esetében. Átlagértékben 29,98 db a *Rondeletia*, 77,24 db az *Exostema* fajok esetében. A levél csúcsi részének terminális ereit tekintve jelentős különbségek vannak az egyes fajok között.

A levél középső részének areolaszámait vizsgálva legalacsonyabb az *E. parviflorum* (12,1 db) és *R. brigandiana* (11,6 db) esetében, míg legtöbb érsziget az azonos szekcióba tartozó *E. selleanum* (31,2 db) és *E. velutinum* (34,8 db) leveleinek ezen pozíciójában van. A levél középső részén, a *R. ekmanii* kivételével, szintén az alacsonyabb érvégződések száma jellemzi a *Rondeletia* fajokat (35,06 db), míg az *Exostema* fajok esetében az érvégződések átlagos száma 73,53 db. Legmagasabb érvégződésszámot az *E. acuminatum* (104,5 db) levelén láthatunk, míg az *R. stereocarpa* esetén ez csak 6,7 db.

A levél alapi részén mind a legmagasabb, mind a legalacsonyabb érszigetszámot az *Exostema* nemzetségen belül találjuk: *E. myrtifolium* 40,2 db, *E. ellipticum* 6,65 db. A vizsgált *Rondeletia* fajok érsziget számai a levél alapi részén kisebb szórást (6,3) mutatnak, mint az *Exostema* fajok esetében (10,04). A levél alapi részén, hasonlóan a középső részen tapasztaltakhoz, a *R. ekmanii* kivételével a *Rondeletia* fajokat az alacsonyabb érvégződésszám értékek jellemzik. Átlagértékekben kifejezve: *Exostema* fajok 73,15 db, *Rondeletia* fajok 31,63 db érvégződés területegységenként.

A levél különböző részein a vizsgált fajok között eltéréseket találtunk mind az érsziget, mind az érvégződések számát tekintve. A kapott értékek közötti szórás minden esetben a *Rondeletia* nemzetség vizsgált fajainál alacsonyabb volt, mint az *Exostema* nemzetségen belül. A *Rondeletia* fajok terminális ereinek átlagos száma a felvételi helyek pozíciójától függetlenül alacsonyabb az *Exostema* fajokénál. Az érvégződések száma alkalmasabb a levelek megkülönböztetésére. A *Rondeletia* fajokat az alacsonyabb érvégződésszám értékek jellemzik. Abban az esetben, ha a vizsgált fajoknál a levél különböző részein mért érsziget- és érvégződésszámok átlagát nézzük, elmondhatjuk, hogy ezek az értékek igen hasonlóak a vizsgált nemzetségeken belül. Érszigetszám tekintetében nincs különbség a genuszok között, viszont, ahogy korábban említettük, a terminális erek átlagos száma nemzetségre jellemző.

Az érvégződések száma minden egyes vizsgált *Exostema* fajnál magasabb, mint az érszigetek száma, függetlenül a mintavételi helyektől. A *Rondeletia* fajok esetében a két érték

között kisebb a különbség, és a *R. stereocarpa* és *R. longibracteata* esetében magasabb az érszigetek száma, mint az érvégződések száma. Az érszigetek- és érvégződések száma, valamint a vizsgálati helyek között nem találtunk korrelációt, azok a vizsgált fajok többségénél változnak a levél különböző részein. Egyes esetekben az értékek állandóak, máskor nőnek vagy csökkennek a levél csúcsi, alapi vagy középső része felé.

A két nemzetséget jól el lehet különíteni az érsziget- és érvégződés kategóriák vizsgálatával. A *Rondeletia* nemzetség alacsonyabb érvégződésszámait az eredményezi, hogy leginkább a 2, 3 és 4 db terminális eret tartalmazó érszigetek dominálnak, egyik vizsgált fajnál sem találunk sok (akár 10, 12 db) érvégződéssel areolát. Ezek az érsziget kategóriák (érszigetek sok érvégződéssel) viszont jellemzőek a tanulmányozott *Exostema* fajokra.

Az érvégződést tartalmazó areolák százalékos aránya egyes esetekben viszonylag állandó, a vizsgálati helyektől független (pl.: *E. purpureum*, *E. selleanum*, *R. peduncularis*, *R. ekmanii*), viszont más esetekben igen nagy a változás a levél különböző részein (pl.: *R. clarendonensis*, *E. spinosum*). Nem találtunk összefüggést ezen százalékos arányok és a felvételi helyek, illetve a különböző rendszertani kategóriák között. A lombhullató erdőből, a magas hegyvidékről és az esőerdőből származó taxonok esetében ezek az arányok magasabbak, mint a mészkő és szerpentin cserjések fajainál.

A vizsgált *Rondeletia* fajok levélerezet sűrűségei között nem találtunk jelentős különbségeket. A fajok levélerezetének vizsgálata során megállapítottuk, hogy az erezet sűrűsége a levelek csúcsi részétől az alapi rész felé csökken. A levélerezet sűrűsége egyik esetben sem érte el a 100 cm/cm^2 értéket, amely a xeromorfia jelének tekinthető.

A vizsgált két *Rondeletia* nemzetséget jellemezhetjük a négy vagy ötoldalú érszigetekkel, és az egyszerű, elágazás nélküli egyenes, vagy hajlított érvégződésekkel. Az *Exostema* nemzetség általunk vizsgált fajaira a három vagy négyszögű és köralakú areolák, illetve az egyszeresen és kétszeresen elágazó érvégződések jellemzőek. A morfológiai tulajdonságokban nemcsak a vizsgált két nemzetség, de az egyes szekciók és a fajok között is voltak különbségek. Egységes képet az érszigetek, illetve az érvégződések morfológiája alapján az *Exostema* nemzetségen belül találtunk:

Érszigetek morfológiája

A *Floribundae* szekció általunk vizsgált képviselőit a szabálytalan alakú areolák gyakorisága, valamint a levél alapi részén a háromszögű érszigetek hiánya jellemzi. Az *Oliganthae* szekciót képviselő fajokat egyöntetűen jellemzik a levél csúcsi részén gyakori háromszögű, valamint szórványosan található ötszögű areolák. Az *Exostema* szekció vizsgált fajainak közös jellemzője az egész levél területén nagy számban előforduló négyszögű, valamint a levél középső részén kis

számban található kör alakú érszigetek. A szekción belül különbség mutatkozik az ötszögű areolák eloszlásában. Az *E. myrtifolium* esetében a levél alapi részén ez az areola típus jelentős mennyiségű, míg a szekció más fajainál csak kis számban van jelen a levél egész területén.

Érvégződések morfológiája

A *Floribundae* szekció vizsgált fajait a levél csúcsi részén nagy mennyiségben található egyszeresen elágazó, valamint a 2. és 3. pozícióban előforduló, többszörösen elágazó érvégződések jellemzik. Ugyancsak ezen fajok jellemzője az érvégződés nélküli érszigetek kis száma. Az *Oliganthae* szekció fajainak leveleit az alapi- és csúcsi részeken előforduló érvégződés nélküli, valamint hajlított érvégződést tartalmazó érszigetek kis száma jellemzi. A többszörösen elágazó érvégződések ugyan a levél egész területén megtalálhatók, de kisebb számban. Az *Exostema* szekció fajaira a szórványosan előforduló egyenes és hajlított, valamint az egyszeresen és kétszeresen elágazó érvégződések jellemzőek.

A *Rondeletia* fajok esetében megnéztük a leggyakrabban előforduló érszigetek méretét is. Az érszigetek mérete több esetben is változott ugyanazon levélen, ezért nagy rendszertani jelentőséget nem tulajdonítottunk ennek az értéknek. A vizsgált szekciókon belül is igen változatosak voltak az érszigetek méretei, így sem nemzetség, sem szekció szinten nem találtunk összefüggést az eredményekben. Ahogy az várható volt, a magasabb érszigetszám hátterében kisebb érsziget méret áll. Azon fajok esetében, amelyeknél magas a szabálytalan érszigetek száma, azok mérete is nagyobb, mint a négy, vagy ötoldalú areoláké.

Az *Exostema* és *Rondeletia* nemzetség vizsgált képviselői neotrópusi elterjedésű növények. Leveleiknek morfológiája jelzi a trópusi éghajlat hatását. Elterjedésük során az alapkőzet egyes tulajdonságainak felerősödése, a domborzat által megváltoztatott klímatényezők hatással voltak a levélerezet kialakulására, így eltéréseket eredményeztek a fajok venációja között. A levélerezet vizsgált kvantitatív és kvalitatív tulajdonságainak termőhelyi befolyásoltsága egyes esetekben (levélerezet sűrűsége, érvégződések száma, érvégződést tartalmazó érszigetek százalékos aránya) kimutatható. Azonban ennek ellenére sem tudtuk bizonyítani a levélerezet mikromorfológiai tulajdonságainak termőhelyi befolyásoltságát. A vizsgált tulajdonságok változhatnak az azonos élőhelyeken előforduló, de más rendszertani kategóriákba tartozó fajok esetében, illetve egyetlen levélen belül is.

4.2. Az vizsgált taxonok filogenetikai analízise

4.2.1. A Rondeletia komplex fajainak ITS régió vizsgálata

A teljes ITS (internal transcribed spacer) régió (ITS1-5,8S rDNS-ITS2) felszaporítása a Rondeletia komplex mindössze 10 fajánál volt sikeres, mivel az idős herbáriumi anyagból kinyert DNS igen degradálódott, töredezett volt. A 10 teljes ITS szekvencia illesztéséből kapott alignmentet megvizsgálva kiderült, hogy ezen fajoknál — ahogy várható is volt — a szekvenciák közötti különbségek döntő többsége a két intergenikus szakaszra (ITS1 és ITS2), illetve ezek közül is leginkább az ITS1-re korlátozódik. Következő lépésben megpróbáltuk csak ezt a DNS szakaszt (ITS1) az ITS2 és ITS5 primerek segítségével felszaporítani. Így a filogenetikai vizsgálatokba már 16 fajt — mint a belcsoport tagjai — tudtunk bevonni. A teljes ITS régió a vizsgált fajoknál igen nagy G/C arányt mutat, minden fajnál 60%-nál magasabb értéket kaptunk.

A két, különböző helyről (Mexikó és Nicaragua) származó *Rondeletia deamii* taxon között nem találtunk szekvencia különbséget. Az *Arachnothryx leucophylla* és *Arachnothryx leucophylla* var. *virgata* nom. prov. között mindössze két pozícióban (95. bp. és 217. bp.) találtunk különbséget az ITS szekvenciákban. A szekvenciák hossza igen tág határok között mozog (*Arachnothryx monteverdensis* 642 bp, *Rondeletia deamii* Nicaraguából származó egyedénél 558 bp). Az elsődleges szekvencia illesztés után szükség volt az alignment utólagos optimalizálására.

A teljes ITS régió filogenetikai analízisébe az öt *Arachnothryx*, két *Rogiera* és két *Rondeletia* taxonon kívül négy *Randia* fajt — mint a külcsoport tagjait — is bevontunk. A *Randia* nemzetség ugyan a Rubiaceae család tagja, de a Rondeletia komplexszel ellentétben nem a család Cinchonoideae, hanem Ixoroideae alcsaládjához tartozik. Így a választott fajok rendszertanilag szorosan kapcsolódnak a belcsoport tagjaihoz, de evolúciósan távolabb állnak a belcsoporttól, mint annak tagjai egymástól. A végső, filogenetikai analízisbe bevont mátrix 569 karaktert tartalmazott, amelyek közül 434 (76,3%) konstans, 23 (4,1%) változó, de parszimóniailag nem informatív, és 112 (19,6%) a parszimónia vizsgálatban informatív volt. A Rondeletia komplex tagjai egy magasan alátámasztott (94% bootstrap érték) csoportot képeznek. Ezen belül ugyan az *Arachnothryx*, *Rogiera* és *Rondeletia* fajok különváltak, de csak alacsony bootstrap támogatás mellett. Az Arachnothryx klád 69%, míg a *Rondeletia* és *Rogiera* együttes csoportja 59%-os bootstrap értéket mutat. Ez utóbbi kládon belül azonban a két *Rogiera* és a két *Rondeletia* taxon magas támogatást mutat (97% és 100%). Az alacsony bootstrap értékek, és a vizsgált szekvenciák kis száma ellenére is a tág értelmezésű *Rondeletia* nemzetség polifiletikusnak tűnik.

A Rondeletia komplexen belüli pontosabb filogenetikai kapcsolatok megismeréséhez 16 taxon internal transcribed spacer 1 (ITS1) szekvenciáját vizsgáltuk. Három fajt — amelyek a Rondeletieae tribusztól távoli genuszokat képviselnek (egy afrikai és kettő neotrópusi) — választottunk külső csoport tagjainak a GenBankból. A végső, analizált mátrix 306 karakteréből 168 állandó, amelyek közül 50 (16%) variábilis, de nem informatív, míg 88 (29%) informatív

volt. A végső, konszenzus fa a Rondeletia komplex vizsgált taxonjain belül három nagy csoportot mutat. Az *Arachnothryx* klád magas bootstrap értéket (86%) mutat, és magában foglal két erősen támogatott alcsoportot (88% és 92%). A *Rogiera* és *Rondeletia* taxonok egy magas bootstrap értéket (98%) mutató kládot alkotnak, amelyen belül a *Rondeletia* genusz 100% bootstrap támogatást kap. A két vizsgált *Rogiera* faj egy mérsékelten alátámasztott (75%) kládot alkot.
A teljes ITS és az ITS1 régió filogenetikai analízise alátámasztja a Rondeletia komplexen belül az *Arachnothryx*, *Rondeletia* s. str. és *Rogiera* nemzetségek létjogosultságát.

4.2.2. A *Randia* nemzetség filogenetikai analízise

A közép-amerikai *Randia* taxonok közötti filogenetikai kapcsolatok kimutatására az ITS régiót és az *rps*16 intront (kloroplaszt DNS szakasz) — amelyet még nem használtak a nemzetség vizsgálatában — választottuk. Külcsoport tagjának 5, a Rondeletia tribuszt képviselő taxon szekvenciáját használtuk. Az *rps*16 intron hossza a vizsgált fajoknál igen széles határok között mozog, 683 bp-tól (*Arachnothryx guerrerensis*) 850 (*Randia thurberi*) bp-ig. Ennek ellenére, a szekvenciák nagy hasonlóságának köszönhetően az illesztésük könnyű volt. A végső, filogenetikai analízisbe bevont mátrix 734 pozícióból állt, amelyből 622 állandó, 28 (4%) változó, de információt nem hordozó, 84 (11%) informatív volt. Az *rps*16 intron vizsgálata során a kapott konszenzus törzsfán a Randia kládon belül két, erősen támogatott (87% és 99% bootstrap értékekkel) alcsoport különült el.

A teljes ITS régió, amely magában foglalja az ITS1, ITS2 és 5,8S rDNS szekvenciákat, megközelítőleg 571 bp hosszúságú volt a tanulmányozott taxonoknál. A belcsoport 16 taxont tartalmazott, ezek közül 7 olyan szekvencia volt, amelyeket mi határoztunk meg elsőként, a többit — beleértve a 3 külcsoportot képező taxon szekvenciáit — a GenBankból választottuk. A filogenetikai analízisbe bevont végső mátrix 571 pozíciót tartalmazott, amelyből 397 állandó, 55 (10%) variábilis, de az MP vizsgálatban információt nem hordozó, 119 (21%) informatív volt.

A végső, konszenzus filogenetikai fa elsődlegesen három nagy főcsoportra osztja a vizsgált *Randia* fajokat. Egy csoport, amely főleg az alacsonyabban fekvő területekről származó, dél-amerikai fajokat foglalja magában (*Randia altiscandens*, *R. wigginsii*, *R. carlosiana*, *R. longifolia*, *R. pubistyla*), 75% bootstrap értékkel mérsékelten támogatott. Három, Mexikóból származó faj (*R. guerrerensis*, *R. capitata*, *R. induta*) egy erősen alátámasztott (97%) kládot képez. A harmadik főcsoportot Közép-Amerikában és Mexikóban honos *Randia* fajok alkotják, a klád kevésbé alátámasztott (58%). A két utóbbi csoport együtt erősen alátámasztott (95%).

Mind az *rps*16 intron, mind az ITS régió vizsgálata az mutatja, hogy a *Randia* s. l. jelenleg használt kiterjedtsége bizonytalan. Számos irodalom foglalkozik Mexikó, Közép-Amerika és az Antillák *Randia* fajainak leírásával, de csak egyetlen morfológiai karaktert mutattak ki, amely

alapján megkülönböztették a közép-amerikai fajokat a dél-amerikaiaktól. Mindkét szekvencia adat (*rps*16 intron és ITS régió) analízise során az általunk vizsgálat *Randia* fajok, amelyek Közép-Amerikában honosak, két jól elkülönült csoportot alkottak. Úgy tűnik, hogy a molekuláris különbségek összhangban állnak a levélmérettel és a termésfal szerkezetével. Kislevelű fajok vékony exokarpiummal a következők: *Randia nelsonii*, *R. aculeata*, *R. cookii* és *R. malacocarpa*, míg nagylevelű fajok lignifikálódott exokarpiummal a *R. tetracantha*, a *R. induta*, a *R. guerrerensi* és a *R. capitata*. Egy kivételt találtunk a vizsgált fajok között, a *R. thurberi* kislevelű faj, de exokarpiuma erősen lignifikálódott. Azt mondhatjuk, hogy az exokarpium szerkezete döntő karakternek mutatkozik a *Randia* fajok fenti két csoportjának elkülönítésében.

4.2.3. *Hintonia latiflora* és *H. standleyana* ITS, *rps*16 és *trn*L-F szekvencia vizsgálata

A *Hintonia latiflora* és *Hintonia standleyana* taxonok három DNS szakaszának vizsgálatát végeztük el: a teljes ITS (internal transcribed spacer) régió, a kloroplaszt *rps*16 intron és a kloroplaszt *trn*F-L intron és spacer. A vizsgált taxonok esetében az *rps*16 intron felszaporítás és szekvenálás után eltérő hosszúságú lett: 746 bp a *H. latiflora* esetében 738 bp a *H. standleyana* taxonnál. A hosszúságbeli különbség magyarázata a *H. standleyana rps*16 szekvenciájának 193 és 198 bp közötti szekvenálási hiba. A két taxon szekvencia különbsége 1,1% volt, de a hibás szakaszokat kihagyva az elemzésből mindössze két, jól meghatározható pozícióban volt nukleotid differencia. Mindkét esetben pirimidin bázisok között történt a változás (T vagy C), így tranzícióról beszélhetünk.

Az ITS régió a Mexico, Guerrero, Rio Zopilote-ból gyűjtött *H. standleyana* taxonnál 599 bp, míg a *H. latiflora* Mexico, Guerrero, San Valentino-ból származó mintájánál 577 bp volt. Az illesztés és az alignment optimalizálása után a két fenti szekvencia közötti különbség mindössze 0,9% volt. A legfőbb, jól meghatározható nukleotid változás ebben az esetben egy tranzíció (T vagy C) és egy tranzverzió (A vagy C) volt. Ezek a változások tekinthetők az evolúciós különválás kezdeti lépéseinek. Két ITS szekvenciát a Gén-Bankból választottunk, a fajokat Guatemalá-ból (*H. standleyana*) és Mexico, Sonora, Rio Mayo-ból (*H. latiflora*) gyűjtötték. A két ITS szekvencia hossza 620 bp és egymástól 1,5%-ban különböznek. A *trn*L-F szekvenciákat szintén az adatbankból töltöttük le. A 935 bp hosszú *trn*L-F szekvenciák 99,4%-os hasonlóságot mutattak. A különbségeket mutató szekvencia részletekben egyaránt találunk tranzíciót (T és C), illetve tranzverziót (A és T, C és A, G és T).

Szekvencia különbségeket határoztunk meg az *rps*16, ITS és *trn*L-F DNS régiók esetében két *Hintonia* taxonnál. Az *rps*16 szekvencia különbségek szintje hasonló volt a vizsgált taxonoknál, mint a széleskörben fajokként elfogadott Cinchonideae alcsalád tagjai és az általunk

analizált *Randia* fajok között. Ezért úgy gondoljuk, hogy a *Hintonia latiflora*-t és *H. standleyana*-t, mint külön fajokat kellene kezelni. A teljes ITS régió DNS szekvencia különbségei függnek a két faj gyűjtési helyétől. Ezek az eltérések ugyan alacsonyak, de ugyanakkorák, mint a Catesbaeeae-Chiococceae komplex — amelynek a *Hintonia* nemzetség is tagja — fajokként elfogadott taxonjai között.

5. AZ ÚJ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

Az *Exostema* és *Rondeletia* nemzetség egyes fajainak levélerezet mikromorfológiai tanulmányozása során kiderült, hogy a vizsgált tulajdonságok az esetek többségében egyetlen levélen belül is változnak, így rendszertani jelentőségük fenntartással kezelendő. Ezek a változások azonban a fajokra jellemzőek lehetnek, így azok, illetve egyes rendszertani kategóriák jellemzésénél kiegészítő információként szolgálhatnak.

A területegységenkénti érvégződések száma — amennyiben a vizsgált taxonok átlagértékeit vesszük figyelembe — nemzetség szinten diagnosztikus különbségeket mutatott. Hasonló megközelítésben a területegységenkénti érszigetek számában nincs különbség a nemzetségek között.

A *Rondeletia* nemzetség fajaira a 2, 3 és 4 db terminális eret tartalmazó érszigetek jellemzőek, míg az *Exostema* fajoknál ezen kategóriákon kívül dominálnak azok az areolák, amelyekben sok (akár 10–12 db) érvégződés van (az ilyen érszigetek a *Rondeletia* fajoknál teljesen hiányoznak).

A *Rondeletia* nemzetség vizsgált fajaira a négy vagy ötoldalú érszigetek, és az egyszerű, elágazás nélküli egyenes, vagy hajlított érvégződések, míg az *Exostema* nemzetség esetében a három vagy négyszögű és köralakú areolák, illetve az egyszeresen és kétszeresen elágazó érvégződések jellemzőek. Szekció szinten csak az *Exostema* nemzetségen belül találtunk egységes képet érsziget és érvégződés morfológia alapján.

A Rondeletia komplex filogenetikai vizsgálatába egy új, eddig még nem tanulmányozott DNS szakaszt, az ITS régiót vontuk be. Az eredmények megerősítették a komplexen belül három csoport (*Rondeletia*, *Rogiera*, *Arachnothryx*) nemzetség szintű elkülönítését.

A *Randia* nemzetség belső tagolódásának pontosabb megismerése érdekében két DNS szakasz, az ITS régió és a kloroplaszt *rps*16 intron filogenetikai analízisét végeztük el. Bizonyítást nyert, hogy a vizsgált fajok két csoportra válnak szét, amelyek létét a morfológiai jellemzőkben tapasztalható különbségek (levélméret és exocarpium) is alátámasztanak.

A *Hintonia* nemzetségen belül a *Hintonia latiflora* és *Hintonia standleyana* taxonok között különböző DNS szakaszok vizsgálatával faj szintű különbségeket találtunk.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

STRANCZINGER SZ., DARÓK J. (2001): *Exostema* (*Rubiaceae*) fajok levélerezetének összehasonlító vizsgálata. **–** In: DARÓK J.: Taxonómiai és anatómiai tanulmányok a *Rubiaceae* családban. Pécs, 129-149.

STRANCZINGER SZ., DARÓK J. (2002): *Exostema* fajok (*Rubiaceae*) levélerezetének makro- és mikromorfológiai vizsgálata. **–** In: SALAMON-ALBERT É. (szerk.): Magyar Botanikai kutatások az ezredfordulón. Tanulmányok Borhidi Attila 70. születésnapja tiszteletére. PTE Növénytani Tanszék Pécs, 227-234.

BORHIDI A., DARÓK J., KOCSIS M.., **STRANCZINGER SZ.** (2004): Critical revision of the *Omiltemia* complex (Rubiaceae, Hamelieae). – *Acta Botanica Hungarica* **46** (1-2): 69-76.

BORHIDI A., DARÓK J., KOCSIS M., **STRANCZINGER SZ.**, KAPOSVÁRI F. (2004): Critical revision of the *Deppea* complex (Rubiaceae, Hamelieae). – *Acta Botanica Hungarica* **46** (1-2): 77-89.

BORHIDI A., DARÓK J., KOCSIS M., **STRANCZINGER SZ.,** KAPOSVÁRI F. (2004): El *Rondeletia* complejo en México. **–** *Acta Botanica Hungarica* **46** (1-2): 91-135.

STRANCZINGER SZ., BORHIDI A., SZENTPÉTERI J. L. (2006): The phylogenetic relationships among some species of the Rondeletia complex (Rubiaceae). **–** *Acta Botanica Hungarica* **48** (3-4): 427-433.

STRANCZINGER SZ., SZENTPÉTERI J. L., BORHIDI A. (2006): Sequence differentiation between some DNA regions of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana.* **–** *Acta Botanica Hungarica* **48** (3-4): 435-440.

STRANCZINGER SZ., BORHIDI A., SZENTPÉTERI J. L., JAKAB F. (2007): The phylogenetic relationships among some *Randia* (Rubiaceae) taxa. **–** *Acta Biologica Hungarica* **58** (2). in press.

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia poszterek és tudományos előadások:

STRANCZINGER SZ. (1999): Venációvizsgálat *Exostema* (Rubiaceae) fajokon. "Tavaszi Szél" 99 Fiatal Magyar Tudományos Kutatók és Doktoranduszok III. Világtalálkozója. 53. o.

STRANCZINGER SZ., DARÓK J. (1999): Összehasonlító levélerezet vizsgálatok *Exostema* és *Rondeletia* (Rubiaceae) fajokon. X. Magyar Növényanatómiai Szimpózium. Fiatal anatómusok pályadíja, díjnyertes előadás.

STRANCZINGER SZ. (1999): Venációvizsgálat *Exostema* (Rubiaceae) fajokon. XXIV. OTDK. III. helyezés 141. o.

STRANCZINGER SZ. (2000): Venációvizsgálat *Exostema* és *Rondeletia* (Rubiaceae) fajokon. Botanikai Szakosztály és az MTA Botanikai Bizottsága által szervezett előadói verseny I. helyezett előadása.

STRANCZINGER SZ., DARÓK J. (2001): A *Rondeletia* nemzetség (Rubiaceae) fajainak levélerezet vizsgálata. XI. Magyar Növényanatómiai Szimpózium, Keszthely, 84-85. o.

STRANCZINGER SZ. (2001): Néhány Rubiaceae faj levélerezetének jellemzése. Botanikai Szakosztály ülése.

STRANCZINGER SZ. (2002)**:** Molekuláris filogenetikai és levélerezet vizsgálatok a Rubiaceae családban. A Magyar Tudomány Napja, MTA Pécsi Területi Bizottsága, Biológiai Szakbizottság rendezvénye. A PTE Növénytaxonómia–vegetációtudományi Doktori Program kutatási eredményei.

STRANCZINGER SZ. (2003): Molekuláris filogenetikai és levélerezet vizsgálatok a Rubiaceae családban. A PAB Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma.

STRANCZINGER SZ., SEBERG O., BORHIDI A. (2003): DNS-szekvenciaelemzés a növény-rendszertan szolgálatában. A DNS 50 éve. A PAB Sejtbiológiai Munkabizottságának rendezvénye.

STRANCZINGER SZ., SZENTPÉTERI J. L., BORHIDI A. (2004): Molecular phylogenetic studies of the Rubiaceae. 14th FESPB Congress. Cracow, Poland, 63. o.

STRANCZINGER SZ., SZENTPÉTERI J. L., BORHIDI A. (2005): The molecular approach of different taxonomical levels in Rubiaceae. XVII International Botanical Congress Vienna, Austria, 439. o.

Egyéb tudományos közlemények:

TÓVÖLGYI ZS., SZABÓ L. GY., **STRANCZINGER SZ.** (2005): *Datura stramonium* és *Datura arborea* DNS- és tropanoid mintázatának néhány jellemzője. – *Magyar Tájökológiai Lapok* **3** (2): 275-280.

SZENTPÉTERI J. L., SZENTE SZ., SZEGŐ B., **STRANCZINGER SZ.**: Morphological studies and taxonomical review of Preonantus (DC.) Schur. – *Acta Botanica. Hungarica* (elfogadva).

Egyéb konferencia poszterek és tudományos előadások:

TÓVÖLGYI ZS., **STRANCZINGER SZ.**, SZABÓ L. GY. (2003): Adatok toxikus Datura taxonok genetikai és fitokémiai mintázatához. A DNS 50 éve. A PAB Sejtbiológiai Munkabizottságának rendezvénye.

SZENTPÉTERI J. L., **STRANCZINGER SZ.**, BORHIDI A. (2004): Molecular phylogenetic studies of some *Pulsatilla* taxa. 14th FESPB Congress. Cracow, Poland, 65. o.

PAPP N., KOCSIS M., SZENTPÉTERI J. L., **STRANCZINGER SZ.** (2004): Molecular biological studies on *Euphorbia cyparissias* L. populations. 14th FESPB Congress. Cracow, Poland, 62. o.

TÓVÖLGYI ZS., **STRANCZINGER SZ.** (2004): Datura és Brugmansia DNS- és tropanoid-mintázatának néhány jellemzője. Botanikai Szakosztály ülése, A gyógynövénykutatás aktuális kérdései.

SZENTPÉTERI J. L., **STRANCZINGER SZ.**, BORHIDI A. (2005): *Preonanthus*: an independent genus formed by alpine *Ranunculaceae* taxa. XVII International Botanical Congress Vienna, Austria, 432. o.

FARKAS Á, **STRANCZINGER SZ.**, KOCSIS M., BORHIDI A. (2005): Comparative morphological, histological and molecular studies of Hungarian wheatgrass (*Elymus* and *Agropyron*) taxa. XVII International Botanical Congress Vienna, Austria, 433. o.

SALAMON-ALBERT É., CSETE S., **STRANCZINGER SZ.**, FARKAS Á. (2006): New additions to in situ conservation of Primula farinosa subsp. alpigena as an endangered species in Hungary. 1st ECCB Eger, Hungary. Abstracts 663. p. 153.