

Szakmai jelentés

„Az *Ophrys fuciflora* komplex filogeográfiai vizsgálata” című,

K69224 számú OTKA pályázathoz

A finanszírozás kezdetének csúszása miatt a vizsgálatokat is némi csúszással kezdtük meg.

2007. év második fele:

- a munka kezdetén a steril fülke használatát nem feltételező DNS kivonásokra koncentráltunk. Ennek eredményeként a teljes genomiális DNS-t kivontuk 119 bangó (*Ophrys*) populációt reprezentáló 230 egyedből. Ezek közül 105 populáció a vizsgált poszméhbangó alakkörbe (*O. fuciflora* complex) tartozott, míg a fennmaradó minták az összehasonlító kulcsoportként alkalmazott argóliszi-bangó (*O. argolica* complex) alakkörbe, valamint a méhbangó (*O. apifera*) fajba tartoztak. A nagyszámú minta kivonásával járó munka során némileg eltértünk a munkatervtől, mert a tervezett populációnkénti 5 minta helyett inkább több populáció két egyeddel reprezentált vizsgálatára koncentráltunk. Ennek oka egyrészt, hogy a kutatási tervhez képest új populációkról származó mintákat sikerült beszerezniük (részben önköltségesen begyűjtenünk), részben pedig azért, mert ez jobban megfelel egy filogeográfiai munka céljának. Lowe, Harris és Ashton (2004: 34.) szerint: „...investigations should aim to collect the geographical and ecological range of the species and [...] more populations and fewer individuals per population should be sampled.”.

- a kivonások után, az év vége felé elkezdődött az nrITS szelektív amplifikálása a mintákból. Hozzávetőleg 50 direkt szekvenciát kaptunk meg az év végéig, melyek között számosan eltérő paralógok jelenlétére utaló kettős csúcsokat találtunk egyes ismétlődő nukleotid helyeken.

2008. év első fele:

- az év folyamán teljes mértékben a direkt szekvenálásokra és a klónozásokra összpontosítottunk. Az év végéig 119 populáció 230 mintáját szekvenáltuk meg, így igazodtunk a korábban leírt 2 egyed / populáció tervhez.

- a 119 populáció közül 105 a poszméhbangó alakkör fajaihoz tartozott, a mintázott fajok száma (40) az alakkörből leírt 77 faj (Delforge 2005) 52%-át fedte le!

- az nrITS direkt szekvenálások eredményeként 59 populációban mutattunk ki eltérő paralógok jelenlétére utaló kettős csúcsokat.

- meglepetésünkre az *O. fuciflora* alakkörbe tartozó köldökbangó (*O. umbilicata*) rokonsági körében a többi poszméhbangó rokontól eltérő szekvenciákat kaptunk, melyek mindegyikének nrITS direkt szekvenciája eltérő paralógok jelenlétére utaló kettős csúcsokat

hordozott. Ezen fajok további vizsgálata egy értékes, új részeredményre, a köldök bangók rokonsági körének újradefiniálásához vezethet.

- a direkt szekvenciák elemzésével kimutattuk, hogy az európai jelentőségű, védett („Natura 2000-es”) Kotschy-bangó jelenlegi taxonómiai értelmezése hibás, mert polifiletikus taxont képeznek monográfusai egyéb alakok alfaji rangú idevonásával. Ezen eredményekről írt kéziratunk (Sramkó et al., mscr.) bírálókat alatt áll.

- az nrITS szekvenálása során kapott megfigyeléseinket, eredményeinket a „Molekuláris taxonómiai, filogenetikai és filogeográfiai kutatások Magyarországon” című műhelytalálkozón mutattuk be (Sramkó *et al.* 2008).

2008. év második fele:

- a köldökbangók mellett a maradék *O. fuciflora* komplexből származó minták közül 45, a Fuciflora komplexre jellemző kettős csúcsokat tartalmazó minta (populáció egyedének) klónozását végeztük el.

- a klónozások során 479 klón szekvenciát kaptunk, így egyedenként $10,1 \pm 1,93$ klón nrITS szekvenciával dolgoztunk tovább.

- a nagyszámú klón szekvenciát 52 ribotípussá vontuk össze, melyek mennyiségi eloszlása alapján – LaJeuness és Pinzón (2007) útmutatása alapján – kiválasztottuk a domináns és szubdomináns klón ribotípusokat, melyeket a fajok közti leszármazási viszont tükröző ortológoknak tekintettünk, és ezekkel dolgoztunk tovább.

A klón ribotípusok vizsgálatával az alábbi eredményeket vontuk le:

1. Kimutattuk a poszméhbangó fajkomplexben jellemző erőteljes hibridizációból eredő közép-európai varrat zónát, és az ahhoz kapcsolódó jelentős génáramlás az nrITS régió szekvenálásával.

2. Az nrITS régió intenzív klónozásával és az ortológ ribotípusok kiszűrésével megállapítottuk a varrat zónát kialakító fő leszármazási vonalakat.

3. Az ortológ ribotípusokra alapozva a fő leszármazási vonalak földrajzi elhelyezkedése alapján kimutattuk azok földrajzi eredetét.

4. Filogenetikai módszerekkel megállapítottuk az ortológ ribotípusok alapján a fő leszármazási vonalak egymáshoz való viszonyát, így a jelenleginél (Devey *et al.* 2008) mélyebb betekintést nyújtottunk a poszméhbangó alakkör filogenetikai viszonyaiba.

5. Megállapítottuk a fő leszármazási vonalak közti földrajzi izolációt, illetve a szimpatikus leszármazási vonalak esetén populációgenetikai módszerekkel igazoltuk egy fenológiai izoláció létezését.

6. Ezen eredmények tükrében a nemzetségben jelenleg alkalmazott, mások által is vitatott

proliferáló fajfogalomhoz újabb kritikát adtunk.

- a fenti tézisekre alapozva a kutatáshoz társult Sramkó Gábor PhD hallgató 2008. december 3-án sikeresen megvédte doktori (PhD) disszertációját (Sramkó 2008). Ezután már nem tudott részt venni a kutatásokban.

- a 2007-2008-as években a laboratóriumi munkához csatlakozott Nagy Szabolcs és Pénzes Csaba graduális hallgatók egyetemi tanulmányaik befejezéséig vettek részt a munkában. Ugyanakkor 2008-tól Bata Kinga levelező PhD-hallgató kapcsolódott be a munkába.

2009. év első fele:

A pályázat befejezése előtt a téma vizsgálata közben felmerült, korábban minden szerző által az *O. fuciflora* komplexbe sorolt, de nrITS szekvenálásaink eredményei alapján attól jócskán elkülönülő köldökbangók alakkörének molekuláris tisztázását kezdtük el. Elsőként a természetvédelmi szempontból kiemelt jelentőségű („Natura 2000-es”) Kotschy-bangó (*O. kotschyi*) vizsgálatával, valamint a csoport névadó köldökbangóval (*O. umbilicata*) foglalkoztunk. Ehhez a mintákat nem csak az eredetileg kiválasztott nrITS-sel, hanem a nukleáristól eltérő genomból származó DNS-szakasszal, a kloroplaszt DNS Rrn5-TrnR cpIGS-sel is vizsgáltuk.

- Ezen részmunka során 11 populáció 26 egyedét szekvenáltuk meg a fent említett két lókusza (direkt szekvenálások). Mivel számos esetben génáramlásra utaló kettős csúcsokat találtunk, 9 reprezentatívnak ítélt egyedét klónoztunk is, melyekből 86 klón nrITS szekvenciát kaptunk.

- A direkt szekvenciák filogenetikai vizsgálatával megállapítottuk, hogy a köldökbangó és a Kotschy-bangó jól elkülönül mind a poszméhbangók közé sorolható szarvas bangótól (*O. oestrifera*), mind a pókbangókhoz tartozó Reinholdi-bangótól (*O. reinholdii*), és az Ariadnae (*O. ariadnae*), valamint krétai bangóktól (*O. cretica*). A Kotschy-bangó ez utóbbiaktól való elkülönülése meglepő eredmény, ugyanis a jelenleg alkalmazott (Pedersen & Faurhold 2007) taxonómiai értékelés szerint a nevezett három alakot egy fajnak tekinthetjük. Eredményünk rámutat ennek a taxonómiai értékelésnek hibás voltára, így hozzájárul ennek az EU-ban védett bangófajnak helyes természetvédelmi kezeléséhez.

A kiemelt jelentőségű Kotschy-bangóhoz kapcsolódó természetvédelmi-filogenetikai eredményünk publikálása folyamatban van [Sramkó G., Gulyás G., Molnár V. A.: Convergent evolution in *Ophrys kotschyi* (Orchidaceae) revisited: a study using nrITS and cpIGS sequences. – *Annales Botanici Fennici* (bírálat alatt)]. A kézirat köszönetnyilvánításában feltüntettük az OTKA támogatás tényét: „The work was supported by the grant of Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K69224)”

A vizsgálataink eredményét a „Conservation Genetics Meeting 2009” című nemzetközi műhelytalálkozón (Debrecen, 2009. január 31.) is bemutattuk: „Sramkó G., Gulyás G., Molnár V. A.: Conservation phylogenetics of *Ophrys kotschyi* (Orchidaceae), and the question of ESUs in the genus *Ophrys*.” Erről a témáról emellett a 8. Magyar Ökológus Kongresszus Természetvédelmi ökológia I. szekciójában (Szeged, 2009. augusztus 28.), előadás formájában is beszámoltunk: „Sramkó G., Gulyás G., Bata K., Molnár V. A.: A Kotschy-bangó (Orchidaceae) természetvédelmi filogenetikája nrITS és cpSSR szekvenciák alapján”. Mindkét előadásban feltüntettük az OTKA támogatás tényét: „The work was supported by the grant of Hungarian Scientific Research Fund (OTKA nr. K69224)”, illetve „Ezt a munkát az Országos Tudományos Kutatási Alap K69224. sz. pályázata támogatta”.

Erről a témáról – részben az OTKA népszerűsítését is szem előtt tartva – egy ismeretterjesztő munka is készült: Sramkó G., Gulyás G., Molnár V. A. (2009): Konvergens evolúció a bangó nemzetségben. – Természet Világa (Természettudományi Közlöny) 141(9):419-421. A cikk végén feltüntettük az OTKA támogatás tényét: „A munkát anyagilag az OTKA K69224 sz. pályázata támogatta.”

A köldökbangókkal folytatott vizsgálatok mellett kiegészítettük a poszméhbangók (s.l.) mintáit is, illetve újabb direkt szekvenálásokat végeztük. Ezekkel a mintákkal 59 bangófaj 142 populációjáról jutottunk direkt nrITS szekvenciákhoz. Az összes vizsgált fajból 47 a *Fuciflora* fajkomplexbe sorolt, azaz a teljes fajsám (Delforge 2005) 63%-át sikerült lefednünk! A maradék fajok (13 faj, 16 populációja) az összehasonlító külcsoportként alkalmazott argóliszi bangó (*O. argolica* complex) alakkörbe, valamint a méhbangó (*O. apifera*) fajba tartoztak.

- Az újonnan szerzett mintákkal kiegészített adatmátrixszal a korábban (Sramkó 2008) már elvégzett vizsgálatokat végeztük el (haplotípusok megállapítása, TCS haplotípus-hálózat építés, filogenetikai törzsfarekonstrukció), illetve Dr. Péntes Zsolt (SzTE Ökológiai Tanszék) bekapcsolódásával azok filogeográfiai elemzését tervezzük még elvégezni.

Ez utóbbi szempontból az adatok feldolgozása jelenleg is folyamatban van. Közös munkánkból az alábbi munkacímen létezik előkészületben lévő kéziratunk: Sramkó G., Gulyás G., Ari E., Bata K., Péntes Zs, Molnár V. A.: Main nrITS lineages in the intensively reticulating *Ophrys fuciflora* (Orchidaceae) species-complex revealed by ortholog sorting. A filogenetikai analízissel kiegészített munkát a Molecular Phylogenetics and Evolution című lapba tervezzük ezen év őszén benyújtani. A kézirat köszönetnyilvánításában feltüntetjük az OTKA támogatás tényét: „The work was supported by the grant of Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K69224)”

Habár a tudományos cikkek részben bírálati, részben kimunkálási fázisban vannak, kérjük tisztelettel figyelembe venni, hogy a finanszírozás csúszása miatt a munkát csak 2007. második félévében tudtuk megkezdeni!

Publikációk:

Sramkó G. (2008) Az nrITS szekvencia változatosság a mediterrán bangó (*Ophrys L.*) nemzetség poszméhbangó (*O. fuciflora*) fajkomplexében. Doktori (PhD) disszertáció. DE TTDT Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Debrecen. 106 pp.

A munkát anyagilag az OTKA K69224 számú pályázata támogatta.

Sramkó G, Gulyás G, Bán Á, Nagy Sz, Péntes Cs, Molnár VA (2008) Az nrITS használatának nehézségei egyes orchidea csoportokban. *Kitaibelia* **13**(1): 214. – A munkát az OTKA K69224 sz. pályázata támogatja.

Sramkó G, Gulyás G, Bata K, Molnár VA (2009) A Kotschy-bangó (Orchidaceae) természetvédelmi filogenetikája nrITS és cpSSR szekvenciák alapján. 8. Magyar Ökológus Kongresszus. Előadások és Poszterek Összefoglalói. p.: 200.

Sramkó G, Gulyás G, Molnár VA (2008): Konvergens evolúció a bangó nemzetségben. – Természet Világa (Természettudományi Közlöny) 140 (9): 419-421.

A munkát anyagilag az OTKA K69224 sz. pályázata támogatta.

Sramkó G, Gulyás G, Molnár VA: Convergent evolution in *Ophrys kotschy* (Orchidaceae) revisited: a study using nrITS and cpIGS sequences. – *Annales Botanici Fennici* (MS nr.: 34810; recieved: 19 Jan 2009; under revision)

Sramkó G, Gulyás G, Ari E, Bata K, Péntes Zs, Molnár VA: Main nrITS lineages in the intensively reticulating *Ophrys fuciflora* (Orchidaceae) species-complex revealed by ortholog sorting. – *Mol. Phylogen. Evol.* (in prep.)