

A *Sphagnum recurvum* fajcsoport morfológiai és genetikai vizsgálata

BEVEZETÉS

A *Cuspidata* szekció, egyike a tőzegmoha (*Sphagnum*) nemzetség négy nagy monofiletikus szekciójának (Shaw 2000). A szekció egyik al csoportja, amelyet gyakran *S. recurvum* csoportként emlegetnek, a tőzegmohák egyik nehezen határozható taxonómiai alakköre (eg. Stenøien et al. 1997). Kutatásaink során ezzel a csoporttal foglalkoztunk.

A csoport tagjai morfológiailag nehezen megkülönböztethetőek, pontos határozásuk terepen szinte lehetetlen, gyakran mikroszkóp segítségével sem lehetünk biztosak az eredményben. A csoportba, összesen 9 taxont sorolnak: *S. angustifolium*, *S. brevifolium*, *S. fallax* s.s., *S. flexuosum*, *S. isoviitae*, *S. pacificum*, *S. recurvum* s.s., *S. rubroflexuosum* és *S. splendens*. Európában az első öt faj él, Észak-Amerikában mind a kilenc előfordul. Az Európában is élő fajok mellett még a *S. recurvum* s.s. gyakori, a többi észak-amerikai faj ritka, csak néhány előfordulásuk ismert, taxonómiai státuszuk kérdéses. A hat leggyakoribb faj (*S. angustifolium*, *S. brevifolium*, *S. fallax* s.s., *S. flexuosum*, *S. isoviitae*, *S. recurvum* s.s.) taxonómiai besorolása változatos (e.g. Crum 1984, 1997, Daniels and Eddy 1984, Flatberg 1993). Flatberg (1993) mind a hat taxont külön fajnak tekinti, Crum (1984, 1997) szerint a fenti taxonok egyetlen faj alfajai, változatai. A legutóbbi moha illetve *Sphagnum* listákban, a modern vizsgálatok eredményeit is figyelembe véve Európában három fajt különítenek el ebben a csoportban: *S. angustifolium*, *S. flexuosum* és *S. fallax*. Továbbá a a revízió a *S. brevifolium* és a *S. isoviitae* nem külön taxonokat nem különíti ell, hanem a *S. fallax*-ba besorolja (Hill et al 2006, Sénéca és Söderström 2009).

Az OTKA által támogatott kutatásainkban a *S. angustifolium*-ot, *S. flexuosum*-ot és szűkebb értelemben vett *S. fallax*-ot vizsgáltuk, mivel ezek Európa teljes területén megtalálhatók. Az egyértelműen *S. isoviitae* és *S. brevifolium* példányokat nem vontunk be, bár a minták között akadtak problémás *S. fallax* példányok.

A csoport fajainak elkülönítése Észak –Európában is problematikus, pont a bélyegek átfedése miatt, azonban több tanulmányban is úgy vélekedik, hogy a fajok levél morfológiai bélyegek alapján viszonylag jól elkülöníthetőek (pl. Sástad and Flatberg 1994). Közép és Dél-Európai anyagokat tanulmányozva, azonban számos olyan egyeddel akad dolgunk, amelyek nem csak azért határozhatóak nehezen, mert levél méreteik az átmeneti kategóriába esnek, hanem bélyegek keverednek, azaz a főbb bélyegek alapján 2 fajba is besorolhatók lennének.

A problémát feloldandó morfológiai és genetikai vizsgálatokat végeztünk Európa számos pontjáról származó mintákon és hazai, célzott mintavételen alapuló mintasorozaton.

Munkánk elején a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg: Elkülönül-e a 3 faj morfológiai és genetikai alapon az európai és a hazai minták alapján? Hogyan viszonyulnak egymáshoz morfológiailag és genetikailag az Európa eltérő részeiből származó minták? A kevert morfológiájú fajok genetikailag hibridek-e? Mely morfológiai bélyegek a legfontosabbak?

A pályázatban szereplő tervekhez képest, a fő változás, hogy a *Sphagnum recurvum* csoport hazai populációinak részletes vizsgálat mellett, nem csak a környező hegységekből, országokból gyűjtöttünk összehasonlító anyagot, hanem Európa legtöbb országából kértünk egyes helyekről gyűjtöttünk példányokat. Természetesen a mintánk is nagyobb lett a tervezetnél. A munka értékét ez mindenképpen növeli, hiszen így sokkal nagyobb geográfiai régióról lesznek ismereteink. A másik változtatás, az alkalmazott genetikai módszerekben történt. Kisebb mintán kipróbáltunk több módszert, amit használni terveztünk (pl. RAPD, ISSR) valamint az utóbbi években a mohák vizsgálatában is elterjed mikroszatellit analízist is, és végül utóbbi mellett döntöttünk. Ebben nagy segítségünkre volt, hogy 2008-ban publikáltak 30 tőzegmohákra kifejlesztett mikroszatellit primer párt (Shaw et al. 2008a,b). A Módszerek fejezetben, az egyes munkafázisokat is ismertetjük, és hogy mikor és mekkora idő ráfordítással készültek. Az adatgyűjtés ha kicsit lassabban is a tervezettnél, de a tervezett ütemben haladt. Mivel a magyar minták mellett jóval nagyobb számú európai mintával dolgoztunk, ez mind a genetikai mind a morfológiai adagyűjtést lelassította, ezért az adatok feldolgozása és a publikációk elkészülése is csúszott a tervekhez képest.

MÓDSZEREK

A project során 244 mintát dolgoztunk fel az európai változatosság megállapításához és 175 mintát a részletesebb magyar anyag vizsgálata során. Az európai anyagok elsősorban nagyobb herbáriumokból származnak, kisebb részük friss gyűjtés. Az elemzett minták összesen 22 európai országból származnak a minták: Bulgária, Csehország, Dánia, Észtország, Finnország, Franciaország, Nagy-Britannia, Németország, Görögország, Horvátország, Lengyelország, Lettország, Litvánia, Magyarország, Montenegró, Norvégia, Románia, Szlovákia, Szlovénia, Spanyolország, Svédország és Szerbia. Minden mohagyepből 1-1 mohanövénykét választottunk ki a további vizsgálatokhoz. A DNS kivonás a capitulumból (fejecske) történt, míg a növény egyéb részeit a határozáshoz és a morfológiai mérésekhez használtuk.

Terepi mintavétel

A pályázatban szereplő terveknek megfelelően a *Sphagnum recurvum* fajcsoport hazai szinte összes előfordulását felkerestük és a terveknek megfelelően mintát vettünk. A terepi mintavétel 2009-ben és részben 2010-ben zajlott. Tavasszal kijelöltük a mintavételi pontokat, a maximum-minimum vízszintméréshez használt műanyag csöveket kihelyeztük. Tavasszal, nyáron és ősszel mértünk pH-t, konduktivitást és aktuális vízszintet, az őszi mérésnél begyűjtöttük a tőzegmohákat is. A vízszintmérő csöveket 2010 tavaszán szedtük össze, elszíneződésükből állapítottuk meg az egyéves vizsgálati periódusban a maximum és a minimum vízszintet. A tervekben szereplő 250 mintát már nem lehetett begyűjteni, mivel néhány tőzegmohás élőhely elpusztult és/vagy a vizsgált fajok eltűntek vagy megritkultak. Összesen 200 mintavételi pontot jelöltünk ki, amelyből 175 maradt meg, a vadak sok mintavételi pontot tönkretettek. Mintavételi pontjaink: beregi Nyíres-tó és Báltava, keleméri Kis-Mohos és Nagy-Mohos, siroki Nyírjes-tó, szigetszentmártoni úszóláp, kőszegi tőzegmohás lápok, Őrségi lápok és láprétek, Vendvidéki láprétek, a Vasi-hegyhát fűzlápjai. Néhány helyen nem sikerült mintát venni: öcsi_Nagy-tó, szentbékállai Monostori-tó és a nagybárcányi Nádas-tó.

Határozás

Minden példányt meghatároztunk, és elhelyeztünk egy taxonómiai csoportban, amelyek nevét nagybetűkkel adjuk meg (ANG- *S. angustifolium*, FAL – *S. fallax*, FLE – *S. flexuosum*). A határozás során a Daniels és Eddy (1984) „Handbook of European Sphagna” legrészletesebb fajismertetések tartalmazó munkáját használtuk. Számos egyed esetében gondot okozott a fenti taxonómiai csoportokba sorolás, ezért az előbbi munka alapján kiemeltünk 1-1 fő bélyeget, aminek megléte döntésértékű volt. A főbb bélyegek és a kiemelt tulajdonságok az 1. táblázatban találhatóak. A bizonytalan határozások nagy számára való tekintettel bevezettünk minden csoportban egy-egy alcsoportot is, amelybe a problémás egyedek kerültek (ANG_p, FAL_p, FLE_p). A genetikai vizsgálatok alapján kialakuló csoportokat kis betűvel jelezzük: ang, fal, fle.

	<i>S. angustifolium</i>	<i>S. fallax</i>	<i>S. flexuosum</i>
	ANG	FAL	FLE
szárlevél alakja	egyenlőoldalú 3szög	egyenlőszárú 3szög	egyenlőoldalú 3szög
szárlevél mérete	<0.8 mm	>0.8 mm	>0.8 mm
szárlevél csúcsa	lekerekített	hegyes (legalább részben)	szélesen lekerekített, kicsípett
áglevél keresztmetszeti képe	zöld sejtek 3szög alakúak,hasi oldalon bezártak	zöld sejtek 3szög alakúak,hasi oldalon bezártak	zöld sejtek trapéz alakúak, mindkét oldalon nyitottak
csüngő áglevél hyalin sejteinek apikális helyzetű porúsának mérete	>12 µm	10-12 µm	<12 µm

1. táblázat A három faj főbb morfológiai bélyegei **mi alapján?, mit jelent a bold?**

Az európai minták határozása 2009-ben zajlott, folyamatosan ahogy a kért minták beérkeztek. A hazai gyűjtés határozása 2010-ben készült el.

Morfológiai mérések

A morfológiai mérések során összesen 15 bélyeget mértünk le. Az ágakat sztereó mikroszkóp alatt mértük (mm pontossággal) és számoltuk meg kötegenként, a három féle levelet festés után glicerinzselatinba ágyasztunk be. A levelekről mikroszkópos fotókat készítettünk és az UTHSCSAImageTools (v. 3.00) programmal mértük a hosszúságukat és legnagyobb szélességüket illetve a szár levelek esetében a csúcs szélességét is. Adatbázisunk jelenleg egyedenként (244 egyed az európai vizsgálathoz, 144 a magyarországihoz) minden változóból 5-5 adatot tartalmaz, a munkánk során ezek egyedenkénti átlagával dolgoztunk.

Munkánkban a következő rövidítéseket használtuk: ágak száma kötegenként-FN, csüngőágak száma kötegenként-PBN, elálló ágak száma kötegenként-SBN, csüngő ágak hossza-PBL, elálló ágak hossza-SBN, szárlevél hossza-SLL, szárlevél szélessége-SLB, szár levél csúcsának szélessége-SLT, csüngő ág levelének hossza-PBLL, csüngő ág levelének szélessége-PBLW, elálló ág levelének hossza-SBLL, elálló ág levelének szélessége-SBLW, a levelek hsszúság és szélesség arányát is kiszámoltuk: SBL/SBW=SBR, PBL/PBW=PBR, SBLL/SBLW=SBR. Összesen 15 morfológiai változóval dolgoztunk.

2009-ben elkészültek a preparátumok az európai anyagból (egy-egy minta preparálása közel 40 perc) és elkezdtek a fotózásukat is, amelyet 2010-ben fejeztünk be. Minden moha egyedről közel 55 digitális fotó készült: mindhárom levéltípusból 10-10 egész levél felvétel valamint a

kétféle áglevelelről levelenként két részletesebb felvétel és a keresztmetszetről is készült több fotó. A fotózás egyedenként szintén közel 30 perc alatt készült el. A fotózással párhuzamosan elkezdődtek a mérések is, ami egyedenként szintén 30 perces munka. Ezt a munkafolyamatot 2010-ben végeztük. A 176 magyar egyedek preparálása 2010-ben elkezdődött, de csak 2011 nyarán fejeztük be. A fotózás 2011-ben zajlott. A méréseket jelenleg is zajlanak.

Molekuláris módszerek

A genetikai vizsgálatokhoz a mikroszatellit vizsgálat bizonyult a legalkalmasabbnak, mivel viszonylag gyors és olcsó módszernek tekinthető. A mikroszatelliták, rövid 2-6 bázispárnyi, változó számban ismétlődő motívumok a genomban. Információt ugyan nem kódolnak, viszont meglehetősen változatosak, ezért különösen alkalmasak a közeli rokon taxonok vizsgálatára. Az utóbbi évtizedben a mohák és különösen a tőzegmohák vizsgálatában is egyre elterjedtebbek. E módszer segítségével vizsgálták a *Polytrichum formosum* Hedw. ramet-genet szerkezetét Hedw. (Van der Velde 2000, 2001) és ezen módszereket alkalmazták a közeli rokon moha fajok elkülönítésére: pl. *Anastrophyllum joergensenii* Schiffn. és *A. alpinum* Steph. (Long et al. 2006), *Rhytidiadelphus subpinnatus* és *R. squarrosus* (Korpelainen 2008), *Sphagnum comosum*, *S. novo-zealadicum* és *S. inundatum* (Karlin et al. 2008a), valamint a *S. cristatum* Hampe (Karlin et al 2008b) faji elkülönítésére.

A DNS-t a CTAB módszerrel vontuk ki a tőzegmoha fejcskékből, Doyle és Doyle (1987) alapján. A primerek amplifikációja, a PCR reakciók és a fragmenthossz analízis a tőzegmoháknál alkalmazott általános módszerekkel készültek (részletesebb leírás pl. Shaw et al. 2008a,b). A mikroszatellita primerek Shaw és munkatársai (2008a,b) által, tőzegmohákra kidolgozott 30 primerpár közül lettek kiválasztva egy részmintasor elemzése alapján. Összesen 15 primerrel dolgoztunk, amelyek közül 11 adott értékelhető eredményt, számuk Shaw et al. (2008a,b) alapján: 1, 7, 9, 10, 14, 17, 18, 19, 20, 28 and 30. A primerpárok szekvenciái és az ismétlődő motívumokat Shaw és munkatársai (2008a) részletesen ismerteti.

A mikroszatellita analízis kipróbálása 2009 elején megtörtént. A 30 primerből 15-öt választottunk ki, amelyek közül 11 bizonyult használatónak nagyobb mintahalmazon. A 244 európai mintát 2009-ben a 176 hazai mintákat csak 2011-ben tudtuk elemezni.

Adatfeldolgozás

A mikroszatelliták változatosságát a GenAlEx 6.4.1 (Peakall and Smouse 2006). programmal dolgoztuk fel. Azokat a mintákat, amelyekben csak 5 vagy annál kevesebb lókuszt amplifikálása sikerült, a további vizsgálatokból kihagytuk. Habár a vizsgált csoportunk

haploid, néhány egyednél duplikált alléleket találtunk, ezért mintáinkat kodominánsként kezeltük, vagyis ahol egy lókuszon egy allél volt, azokat diploid homozigótának tekintettük.

A GenAlEx program segítségével kiszámoltuk az allélek számát, frekvenciáját, és az egyedek közötti genetikai távolságmátrixot. A további elemzések során molekuláris variancia analízist (AMOVA) és főkoordináta analízist (PCoA) végeztünk.

A populációk genetikai struktúráját a STRUCTURE v. 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) programmal elemeztük. Segítségével megállapítottuk, az egyedek genetikai alapon képezhető legvalószínűbb csoportosítását. Több független futtatás alapján elemeztük a lehetséges csoportok számát ($K=1-6$), ahol megengedtük a keveredést (admixture), A futtatások során 100,000 MCMC iterációt futtatunk, mint burn-in-t, majd 1 millió MCMC iterációt alkalmaztunk az adatgyűjtési periódusban. A szimulációt hatszor ismételtük meg, a beállítások változtatása nélkül. Az optimális csoportszám kiválasztására az ún. deltaK módszert alkalmaztuk, amelyet Evanno és munkatársai (2005) dolgoztak ki.

Az egy-egy egyedről származó morfológiai adatokat változónként átlagoltuk, és a továbbiakban ezzel dolgoztunk. Diszkriminancia analízis segítségével próbáltuk a csoportokat a morfológiai bélyegek alapján elkülöníteni. A genetikai és morfológiai változók közti összefüggéseket Mantel-teszt segítségével vizsgáltuk. A morfológiai adatok között Euklideszi távolságot számoltunk. A Mantel teszt szignifikanciáját 999 permutációval teszteltük. Az elemzéseket az R 2.12.2 (The R Development Core Team 2011) program segítségével végeztük el.

Az adatok feldolgozása 2010-ben megkezdődött és jelenleg is folyik. Először az európai minták adatait dolgoztuk fel, amely 2011-ben elkészült. A magyar adatok feldolgozása folyamatban van. A genetikai adatbázis és ennek elemzése elkészült. A morfológiai mérések még zajlanak ezért azok adatait nem tudtuk feldolgozni, valamint a morfológia és a mért környezeti változók közti kapcsolat megállapítása is később fog elkészülni.

EREDMÉNYEK

Az európai minták egy részéből készült eredményeinket poszteren és előadáson is bemutattuk nemzetközi konferencián. Az európai anyag feldolgozását befejeztük, az ebből elkészült kéziratot a Taxon folyóiratnak benyújtottuk. A kéziratban szereplő eredményeket az alábbiakban részletesen is bemutatjuk.

A magyar anyag elemzésének jelenleg a közepén járunk. Előzetes eredményeink egyenlőre nem nagyon különböznek az európai mintákon tapasztaltaktól. Érdekeségük, hogy a három faj határozottan elválik egymástól a mikroszatellita adatok alapján, a lekerekített szár levelű

két faj (*S. angustifolium* és *S. flexuosum*) elkülönülő pontfelhőt alkot. Az európai mintákban 209 allélt, a csak magyar mintákban mintegy 145 allélt mutatunk ki, a 11 lókuszon. A lókuszonkénti allélszám, a minimum és maximum bázispárok értékei hasonlóak. A morfológiai mérések még folyamatban vannak, ezért értékelésüket nem tudtuk még elvégezni. A terepen a begyűjtés előtti évben 3 alkalommal mértünk pH-t, konduktivitást és aktuális vízszintet, valamint egy éves periódusra vonatkoztatott maximum és minimum vízszintet, amelyekkel a morfológiai adatokat összevetve a fenotípusos plaszticitás mértékéről nyerünk újabb információkat. A már elkészült elemzések alapján azonban megállapítható, hogy a lápok közötti különbség sokkal jelentősebb, mint a lápon belüli, amely korábbi vizsgálatainkkal is összhangban van.

A *Sphagnum recurvum* fajcsoport morfológiai és genetikai változatossága európai léptékben (Eredmények és értékelésük)

A 244 európai mintából legalább 6 mikroszatellita lókuszt kiértékelésére 1 210 esetben került sor. A legtöbb DNS-t az 1-2 éves anyagokból sikerült kivonni, míg a legöregebb amplifikálható minta 15 éves volt

A legtöbb vizsgált egyed haploid volt mind a 11 lókuszon, de 11 egyed esetében találtunk egyértelműen diploid lókusztokat. Ezek közül 5 egyed esetében egy, 3 egyed esetében két és egy-egy egyed esetében, 3, 4 és 7 lókuszt volt diploid. A 11 vizsgált lókuszt közül 3 a teljes mintán haploidnak bizonyult.

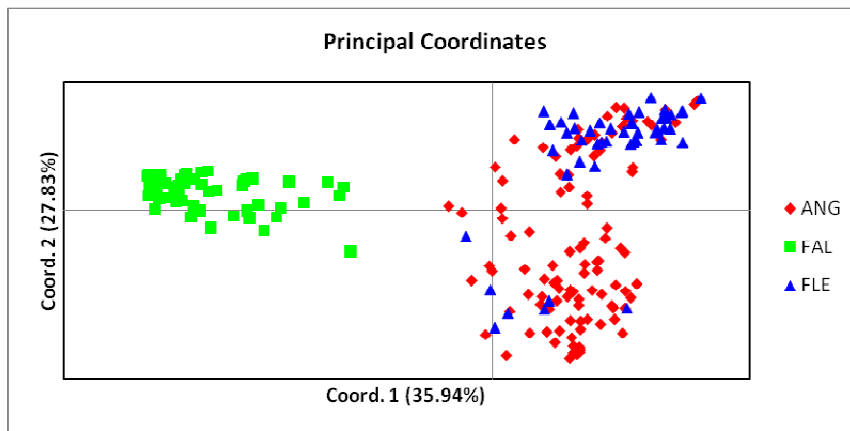
A 11 lókuszon összesen 209 allélt detektáltunk a 210 egyed alapján. A lókuszonkénti átlagos allélszám 19 volt, a minimum 4 és a maximum 44. A 14-es lókuszt bizonyult a legváltozatosabbnak, a 18-as és a 30-as a legkevésbé változatosnak. Részletesebb adatokat a 2. táblázat tartalmaz.

Primerek	1	7	9	10	14	17	18	19	20	28	30
Minta szám	176	172	152	206	205	179	209	194	207	199	210
Minta szám	15	23	30	32	44	10	4	8	17	21	5
Min bp	246	181	166	227	188	150	124	263	282	216	141
Max bp	283	215	213	276	280	170	139	279	304	259	155

2. táblázat A lókusztok genetikai változatossága

Először a genetikai távolságmátrixon alapuló PCoA-t analízist végeztünk a 3 morfológiai csoport elkülönítésére (1. ábra). Az első két koordináta összvariancia közel 64 %-át fedte le

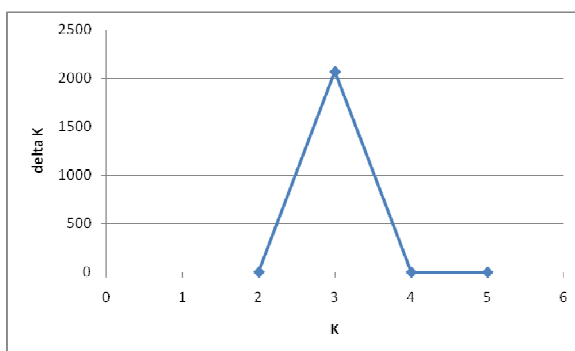
(első 35.94% második 27.83%). Az 1. ábrán jól látható, hogy a *S. fallax* egyedei jól elkülönülnek, míg a *S. angustifolium* és *S. flexuosum* egyedei keverednek.



1. ábra Főkoordináta analízis (PCoA) a három morfológiai csoport alapján.

A főkoordináta analízist elvégeztük úgy is, hogy megjelöltük a problémás egyedeket, hátha a problémás egyedek okozzák a két lekerekített szárlevelű taxon keveredését (hely hiányában ezt az ábrát nem mutatjuk be). Az analízis azt mutatta, hogy a *S. flexuosum* (FLE) minták szinte teljesen átfednek a problémás *S. angustifolium* (ANG_p) egyedekkel, míg a problémás *S. flexuosum* (FLE_p) minták szétszórtan helyezkednek el. A problémás *S. fallax* minták az egyértelműen *S. fallax* egyedektől nem válnak el.

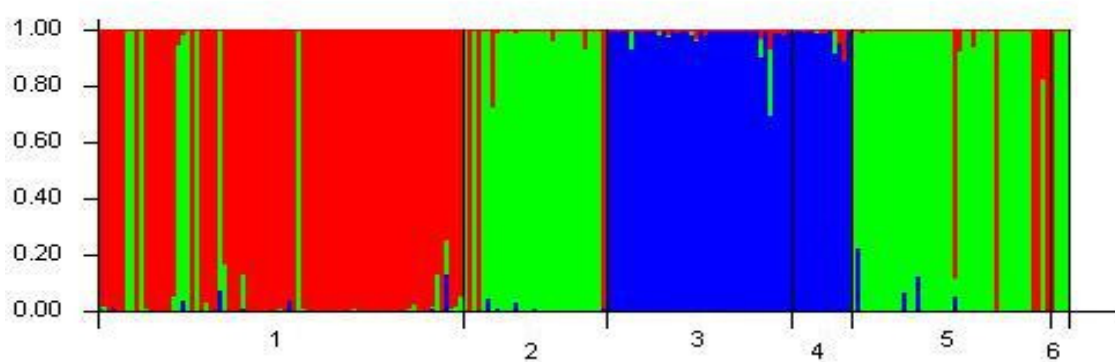
A STRUCTURE analízis alátámasztja a fenti eredményeket. A deltaK analízis (Bayesian admixture method) segítségével megállapítottuk, hogy a mikroszatellita adatok alapján egyértelműen 3 csoportba sorolhatók a mintáink (2. ábra).



2. ábra A legvalószínűbb K érték. K a csoportok lehetséges száma,

A 3. ábra alapján látható, hogy a három genetikai csoport nagyjából átfed a három morfológiai taxonnal, de ezek nem feleltethetők meg teljesen a Daniels és Eddy (1984)

alapján meghatározott fajoknak, habár az átfedés jelentős. Az ábra azt is jól mutatja, hogy a problémás egyedek nem tekinthetők hibridnek.



3. ábra A STRUCTURE analízis eredménye K=3 csoport esetében. A mintákat a hat lehetséges morfológiai csoport alapján rendeztük sorba: 1-ANG, 2-ANG_p, 3-FAL, 4-FAL_p, 5-FLE, 6-FLE_p. Az oszlopok színei a STRUCTURE elemzés alapján elkülönített három gén pool részesedését ábrázolják a vizsgált egyedekben: piros-ang, zöld-fle, kék-fal.

Ezt követően molekuláris variancia analízist (AMOVA) végeztük, hogy a három taxonómiai és három genetikai csoport elkülönüléséről kvantitatív információt szerezzünk. A populációk közti variancia 28% volt amikor a csoportokat a STRUCTURE elemzés alapján definiáltuk míg, 21% ha a morfológiai besorolást használtuk. Hasonlóan a populáción belüli variancia 71% volt amikor a csoportokat a STRUCTURE elemzés alapján definiáltuk és 79% ha a morfológiai besorolással dolgoztunk. A 3. táblázat mutatja a az AMOVA PhiPT (analóg az Fst értékkel) értékeit. A genetikai csoportok közti különbség nagyobbak bizonyult, mint amit a morfológiai csoportok között találtunk.

A	ANG	FAL	FLE	B	ang	fal	fle
ANG	0.000			ang	0.000		
FAL	0.266	0.000		fal	0.302	0.000	
FLE	0.073	0.333	0.000	fle	0.215	0.355	0.000

3. táblázat PhiPT értékek a csoportok között. Minden érték szignifikáns.

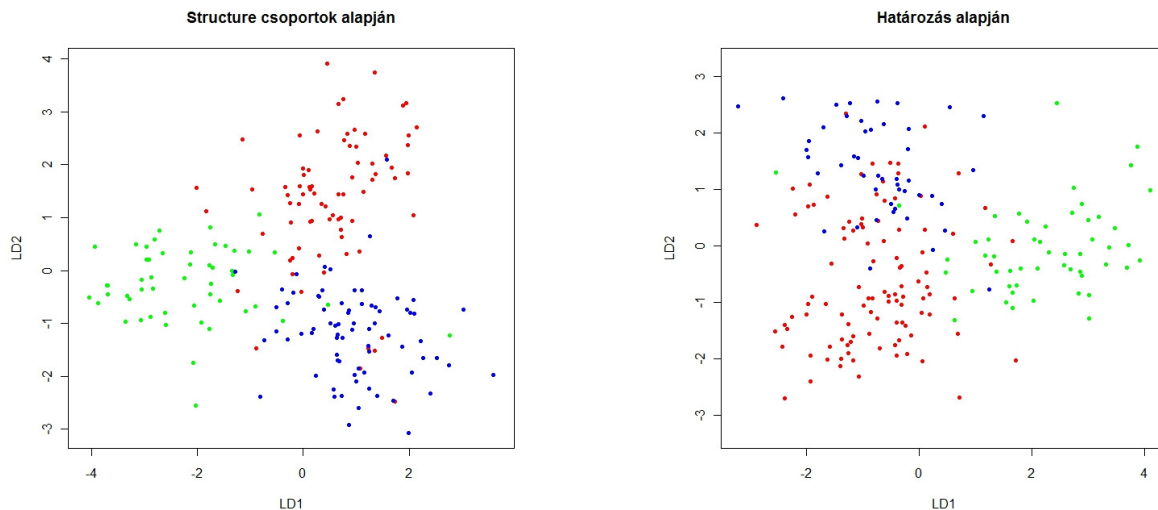
A: taxonómiai csoportok között, B: genetikai csoportok között

A morfológiai mérések eredményei

Az átlag, szórás, minimum és maximum értékek változónkénti adatait, mind a taxonómiai mind a genetikai csoportokra a 4. táblázat tartalmazza. A táblázatból jól látható, hogy a csoportok közti különbség kicsi, köztük az átfedés jelentős.

		ANG	ang	FAL and fal	FLE	fle
PBLL	mean (SD)	91.62 (18.38)	91.14 (20.65)	118.26 (27.35)	111.66 (15.94)	104.85 (16.55)
	min/max	63.46/183	63.46/183	81.78/203.27	88.78/163.17	75.11/163.17
PBLW	mean (SD)	33.14 (6.8)	32.9 (7.97)	44.26 (9.6)	40.59 (7.29)	38.12 (6.57)
	min/max	22.33/69.28	22.33/69.28	29.01/78.02	28.72/59.01	26.73/55.29
PBLR	mean (SD)	2.78 (0.29)	2.79 (0.28)	2.68 (0.29)	2.79 (0.34)	2.78 (0.34)
	min/max	1.91/3.62	2.12/3.62	2.16/3.41	2.23/3.55	1.91/3.55
SBLL	mean (SD)	138.25 (19.61)	141.69 (22.77)	163.49 (29.72)	150.06 (23.19)	142.17 (20.08)
	min/max	103.19/225.23	104.12/225.23	98.52/250.29	112.99/223.43	103.19/223.43
SBLW	mean (SD)	45.64 (8.25)	45.54 (10.59)	59.8 (12.22)	54.56 (11.33)	51.41 (8.81)
	min/max	30.15/83.88	30.15/83.88	38.76/104.75	38/83.07	38/83.07
SBLR	mean (SD)	3.07 (0.39)	3.17 (0.36)	2.76 (0.29)	2.79 (0.31)	2.8 (0.32)
	min/max	2.1/3.9	2.28/3.9	2.24/3.51	2.18/3.53	2.1/3.53
SLL	mean (SD)	82.03 (12.02)	78.85 (13.84)	96.96 (10.57)	99.66 (10.92)	96.54 (7.46)
	min/max	55.05/107.15	55.05/128.49	81.51/128.28	67.27/128.49	70.22/113.39
SLW	mean (SD)	71.19 (9.48)	70.55 (9.49)	84.5 (10.68)	75.91 (11.14)	74.85 (10.57)
	min/max	48.89/101.78	48.89/96.7	56.13/99.92	54.33/100.64	54.33/101.78
SLT	mean (SD)	7.95 (3.08)	7.13 (2.77)	3.61 (2.93)	10.8 (3.28)	10.62 (3.08)
	min/max	1.15/16.8	1.15/15.44	0.69/7.94	3.28/18.02	3.28/18.02
SLR	mean (SD)	1.16 (0.19)	1.13 (0.18)	1.16 (0.17)	1.33 (0.2)	1.31 (0.19)
	min/max	0.82/1.72	0.82/1.67	0.92/1.73	0.9/1.87	0.93/1.87
SBL	mean (SD)	19.46 (8.71)	19.83 (8.34)	23.77 (9.16)	24.37 (7.98)	22.19 (9.1)
	min/max	5/46.5	5/38.1	10.4/44.5	10/39.7	8.8/46.5
PBL	mean (SD)	12.23 (2.55)	12.2 (2.6)	12.97 (2.5)	12.82 (2.73)	12.63 (2.62)
	min/max	5.69/20.1	5.69/20.1	7.64/18.4	6.6/20.6	6.6/20.6
FN	mean (SD)	4.43 (0.42)	4.45 (0.42)	4.52 (0.42)	4.65 (0.45)	4.55 (0.46)
	min/max	4/6	4/6	4/5	4/6	4/6
SBN	mean (SD)	2.01 (0.1)	2.01 (0.11)	2 (0)	2.03 (0.16)	2.02 (0.13)
	min/max	2/3	2/3	2/2	2/3	2/3
PBN	mean (SD)	2.42 (0.4)	2.44 (0.39)	2.52 (0.42)	2.61 (0.4)	2.53 (0.42)
	min/max	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3

4. táblázat Átlag, szórás, maximum és minimum adatai a 15 morfológiai változónak, a morfológiai és genetikai csoportok alapján.



4. ábra A diszkriminancia analízis eredménye a morfológia adatok alapján a morfológiai csoportok és a genetikai csoportok alapján. Jelmagyarázat: piros-ANG és ang, kék- FAL és fal, zöld-FLE és fle

A 15 morfológiai változó alapján diszkriminancia analízist készítettünk, egyszer a genetikai másszor a morfológiai csoportosítás figyelembe vételével (4. ábra). Az egyes csoportok pontfelhői nem válnak el egymástól élesen, de az elkülönülésük az ábrán jól látható.

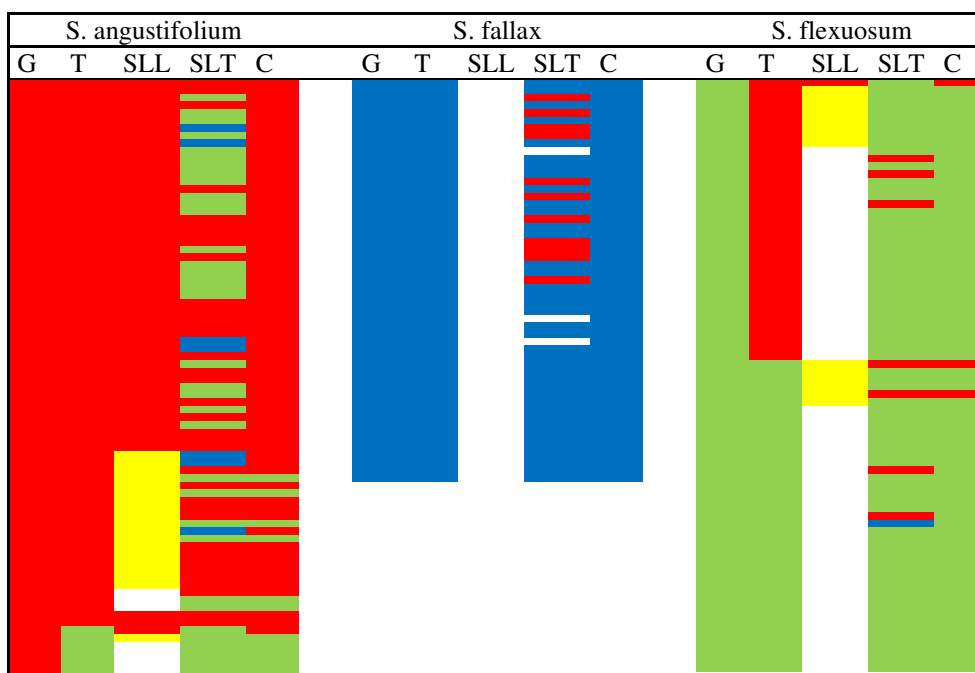
Megfigyelhető az is, hogy a genetikai csoportokat használva a csoportok kevésbé keverednek. A mikroszatellita adatokkal ellentétben a *S. fallax* elválása nem egyértelmű, ami nem meglepő, hiszen a mért bélyegek közti átfedés jelentős.

A morfológia és genetikai távolság mátrixok közti korrelációt Mantel-teszt segítségével számoltuk ki. Az analízist minden változóra külön végeztük el. A korrelációs koefficiens minden esetben nagyon alacsony, és csak a szár levél hossz (SLL) esetében szignifikáns. Volt néhány változó, amelyek éppen nem adtak szignifikáns eredményt (SLT, SLW, SBLW, PBLW, PBLL). A korrelációt kiszámoltuk ezen változók és az SLL különféle kombinációira is meghatárooztuk. Az eredményeket a 5. táblázat mutatja. Amennyiben a szár levél változókat kombináltuk az eredmény továbbra is szignifikánsnak bizonyult.

	Correlation coefficient	Significance	
PBLR	0.006635	0.621	ns
PBLL	0.03981	0.056	ns
PBLW	0.04592	0.045	ns
SBLR	-0.003656	0.535	ns
SBLL	0.02055	0.178	ns
SBLW	0.03515	0.08	ns
SLR	-0.03699	0.97	ns
SLL	0.06287	0.005	*
SLW	0.03697	0.033	ns
SLT	0.04532	0.014	ns*
PBL	-0.0218	0.812	ns
SBL	0.005755	0.357	ns
PBN	-0.006247	0.748	ns
SBN	-0.01479	0.668	ns
FN	-0.009829	0.738	ns
SLL & SLT	0.06315	0.003	*
SLL & SLT& PBLL	0.05385	0.019	ns
SLL & SLT & PBLW	0.06364	0.004	*
SLL & SLT & SBLW	0.05417	0.015	ns
SLL & SLT & SLW	0.05923	0.002	*
SLL & SLT & SLW&PBLW	0.06357	0.007	*
SLL & SLT & SLW&SBLW	0.0564	0.006	*
SLL & SLT & SLW&PBLL	0.05725	0.012	ns
SLL & SLT & SLW&PBLW&SBLW	0.05793	0.006	*
SLL & SLT & SLW&PBLW&SBLW&PBLL	0.05487	0.024	ns

5. táblázat A Mantel-tesztek eredményei.

A 22 európai országból származó mintát csoportosítottuk taxonómiai bélyegek és genetikai bélyegek alapján is (T és G az 5. ábrán). A két féle módszer közti különbség jelentős, az egyedek 18.7%-ka a nem neki megfelelő csoportba került a teljes adatbázishoz viszonyítva, de ha figyelembe vesszük, hogy a *S. fallax* genetikai és taxonómiai elkülönítése egymással teljesen egyező csoportot hozott létre, a maradék mintáknak 28%-a lett tévesen meghatározva. Megállapíthatjuk, hogy, a mért morfológiai bélyegek közül a szár levél hossza és a szár levél csúcsi szélességének a kombinációja adja a genetikai csoportosításhoz leghasonlóbb eredményt (5. ábra).



5. ábra A különféle csoportosítások összevetése

Jelmagyarázat:

G: Genetikai csoportok. piros: ang, kék: fal, zöld: fle

T: Taxonómiai csoportok (három) Daniels and Eddy (1984) alapján. piros: ANG, kék: FAL, zöld: FLE

SLL: Szár level hossz.: piros: <0.8 cm, sárga a0.8 és 0.9cm között (utóbbi csak a *S. angustifolium* és *S. flexuosum* csoportban, a hosszabbak nem lettek jelölve, vagyis fehérek)

SLT: Szár level csúcsa: : kék <0.4mm, piros : 0.4-0.7 mm között, zöld>0.07 mm

C. Módosított taxonómia csoportok. piros-*S. angustifolium* (szár level rövidebb, mint 0.8 cm, szár level 0.8 cm és 0.9 cm között ha a szár levél csúcs 0,7 mm alatti, kék -*fallax* (szár level hosszabb, mint 0.8 cm és hegyes), zöld-*S. flexuosum* (szár level hosszabb, mint 0.9 mm és lekerekített csúcsú, 0.8 cm és 0.9 cm között csak ha a csúcs szélesebb, mint 0.7 mm)

A határozáshoz használandó legjobb, bár nem tökéletes bélyeg kombináció a következő:

- | | | | |
|----|----|--|-------------------------|
| 1. | a. | A szár levél hossza kisebb, mint 0.8 cm | <i>S. angustifolium</i> |
| | b. | a szárlevél hosszabb, mint 0.8 cm | 2 |
| 2. | a. | A szár levél csúcsa hegyes, legalább részben | <i>S. fallax</i> |
| | b. | A szár levél lekerekített | 3 |
| 3. | a. | A lekerekített szár levél 0.8 és 0.9 cm közötti hosszúságú | 4 |
| | b. | A lekerekített szárlevél hosszabb, mint 0.9 cm | <i>S. flexuosum</i> |
| 4. | a. | A szárlevél csúcsa nem szélesebb 0.7 mm-nél | <i>S. angustifolium</i> |
| | b. | A szárlevél csúcsa szélesebb 0.7 mm-nél. | <i>S. flexuosum</i> |

Ezzel a módszerrel a minták jelentős része jól, a genetikai mintázattal közel megegyezően meghatározható. A hibásan határozott egyedek a teljes adatbázis csupán 7.6%-át teszik ki.

ÖSSZEGÉS

A *Sphagnum recurvum* fajcsoport tagjainak elkülönítése egy régóta fennálló taxonómiai probléma. A 90-es években, amikor az ide sorolt fajok száma Európában ötre emelkedett megindultak a különféle összehasonlító vizsgálatok. Készültek tanulmányok, melyek a fajok morfológiáját meggyőzően különbözőnek mutatták ki (pl. Flatberg 1993, Sástad and Flatberg 1994, Stenøien et al. 1997). Ezt követően a csoport genetikai vizsgálata is megindult (pl. Sástad et al. 1999, Stenøien and Sástad 1999). A legtöbb tanulmányban elsősorban észak-európai mintákat dolgoztak fel, de néha észak-amerikai mintákat is bevontak. A problémásabb Dél- és Kelet-Európából származó minták azonban nem kerültek bele a vizsgálatokba. Ebben, a tőzegmohák számára sokszor klimatikusan szuboptimális régióban, számos olyan gyept találunk, ahol a bélyegek keverednek, a határozás nem egyértelmű. Egy-egy fontos bélyeg két típusa között gyakran folyamatos átmenetet találunk, pl. hegyes-lekerekített levélcsúcs, egyenlőoldalú-egyenlőszárú háromszög valamint a különböző hosszúság és szélesség bélyegek is határozott átfedést mutatnak (5. táblázat).

A taxonómiai elkülönítés során, a problémás egyedek nagy száma miatt nem három hanem hat csoportot hoztunk létre, a problémás egyedeket külön jelölve. Feltételeztük, hogy ezek a nehezen határozható, kevert vagy nem egyértelmű bélyegeket mutató egyedek hibridek. Ezt a feltételezésünket a mikroszatellita adatbázison alapuló STRUCTURE vizsgálatok nem támasztották alá. Az adatok alapján egyértelműen három taxon különíthető el, és a legtöbb egyed közel 90%-ban az egyik csoportra jellemző genetikai mintázatot tartalmazza. Elmondható tehát, hogy a 11 vizsgált mikroszatellita lókuszt alapján a három faj elkülönül egymástól. Az AMOVA eredményei alapján azonban láthatjuk, hogy ez az elkülönülés relatíve gyenge. A három *S. recurvum* faj közti PhiPT értékközepes, 0.215, 0.301, 0.335. Más tőzegmoha csoportok közti PhiPT értékekhez viszonyítva, mindenképpen alacsony. Karlin és munkatársai (2008a) a *S. comosum* és *S. novo-zealandicum* között 0.4 feletti PhiPT értékeket közöl mikroszatellita vizsgálatok alapján, Shaw és munkatársai (2008b) a *S. subsecundum* csoportot vizsgálva RAPD lókusztok alapján, szintén jóval magasabb PhiPT értékeket kapott, a haploid csoportok között 0.12 és 0.89, igaz minden lókuszt külön elemeztek, ami, mivel kisebb az összvariancia, lényegesen megemelheti a PhiPT értéket (PhiPT=csoporthoz tartozó közti variancia/összvariancia). Ezzel ellentétben, jelen vizsgálatban az allélok nagy száma is növelte az összvarianciát, ami tovább csökkenti a PhiPT értéket. A PhiPT értékek összevetésével tehát óvatossá kell lenni. Ezek alapján is megállapítható, hogy a *S. recurvum*

fajcsoport tagjai genetikailag elkülönülnek egymástól, de az alacsonyabb PhiPT értékek a közeli rokonságukat is jelzik.

Eredményeink részben ellentmondanak néhány korábbi vizsgálatnak. Sástad és Flatberg (1994) a *S. recurvum* fajcsoportot vizsgálta levélmorfológia alapján, elsősorban norvég minták alapján. A levélbélyegek alapján a fajok egy része jól elkülönült, a legjobban elváló fajnak a *S. angustifolium* bizonyult. A mi vizsgálatunkban elsősorban a szárlevél volt csak kiemelhető, és jelentős morfológiai elválást egyik faj esetében sem tapasztaltunk. Az általuk megadott fajonkénti átlag értékek a hasonlóak az általunk mértekhez, de esetükben a szórás minden esetben kisebbnek bizonyult. Ez, úgy tűnik, alátámasztja azt a hipotézist, hogy a tőzegmohák Közép-és Dél-Európában nehezebben elkülöníthetők a nagyobb morfológiai plaszticitásuknak köszönhetően.

Stenøien és kollégái (1997) *S. angustifolium*, *S. fallax* és *S. isoviitae* morfológiai bélyegeinek plaszticitását vizsgálták, különböző vízszint és tápanyag tartalom mellett nevelt mintákba. A legtöbb bélyeget a vízszint befolyásolta, a szárlevél és a csüngő-eláló ágak hosszának aránya változott a kísérlet során a legkevésbé.

Habár a *S. recurvum* csoport esetében mikroszatellita vizsgálatok nem készültek, eredményeinket a csoporton végzett eltérő módszerű genetikai vizsgálatok eredményeivel is összevethetjük. Sástad és kollégái (1999) egyértelmű elkülönülést mutatott ki izoenzim és RAPD vizsgálatok alapján a barna spórájú, lekerekített levelű három faj (*S. angustifolium*, *S. flexuosum* és *S. recurvum* s.s.) és a sárga spórájú hegyes szár levelű fajok (*S. fallax*, *S. isoviitae* és *S. brevifolium*) között. A lekerekített szárlevelű fajok egymástól is elkülönültek, de a hegyes levelűek közti különbség nem volt egyértelmű. Stenøien és Sástad (1999) szintén izoenzim és RAPD markerek alapján hasonlított össze a *S. angustifolium*, *S. lindbergii*, *S. fallax* and *S. isoviitae* fajokat. A mi eredményeinkhez hasonlóan a *S. angustifolium* bizonyult a legváltozatosabbnak, és nem találtak különbséget a *S. fallax* és *S. isoviitae* között.

A korábbi vizsgálatok alapján a *S. recurvum* csoport tagjai egyértelműen haploidnak bizonyultak (Sástad et al. 1999, Stenøien and Sástad 1999), amit a mi eredményeink is alátámasztanak. Csupán 11 minta bizonyult 1 vagy néhány lókuszon diploidnak. Elképzelhető, hogy ez okozza a határozási nehézségeket, mint a *S. subsecundum* csoport esetében, ahol a nehezen határozható fajokról kiderült, hogy diploidok (alloploiploidok). Ez azonban a *S. recurvum* csoport esetében nem valószínű, mert az egyértelműen besorolható és a problémás csoportokban is ugyanúgy előfordultak a diploid lókuszt hordozó egyedek

A különféle határozó könyveket tanulmányozva láthatjuk, hogy más-más bélyeget emelnek ki, amelyek a fajok elválasztására a legalkalmasabbak. A szárlevél alakja, nagysága, csúcsa általában kitüntetett szerepet kapott. Mivel a levél nagyság bélyegek meglehetősen plasztikusak, ezért a taxonómusok újabb és újabb bélyegeket kerestek a fajok elválasztására. Daniels és Eddy (1984) az Európában élő *Sphagnum* fajokat részletesen bemutató művében két a taxonómiai csoportosítás (határozás) során általunk is kitüntetett bélyeget javasol: a *S. angustifolium* csüngő ágának levelein található hyalin sejtek hatalmas csúcsi pórusát, ami nagyobb, mint 12 μm illetve a *S. flexuosum* elálló ágain elhelyezkedő levele keresztmetszeti képén a fotoszintetizáló sejtek morfológiáját (trapéz alakúak és mindkét oldalon szabadon állnak a hyalin sejtek között). Vizsgálataink során kiderült, hogy ezek a bélyegek sajnos nem jelölik ki egyértelműen a genetikai fajokat, a szár levél tulajdonságai a legjobban használható bélyegek.

FELHASZNÁLT IRODALMAK

- Crum H.A. 1984. North American flora. Series II, part 11, Sphagnopsida, Sphagnaceae. New York, NY: New York Botanical Garden.
- Crum, H.A.:1997. A seasoned view of North American Sphagna.- J. Hatt. Bot. Lab. 82:77-98.
- Daniels, R. E. és Eddy, A. 1984. *Handbook of European Sphagna*. Institute of Terrestrial Ecology, Huntingdon.
- Doyle, J.J. & Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Flatberg, K.I. 1993. The European taxa in the *Shagnum recurvum* complex. 2. *Sphagnum brevifolium* and *S. fallax*. – *Lindbergia* 17:96-110.
- Flatberg, K.I. 1993. The European taxa in the *Shagnum recurvum* complex. 2. *Sphagnum brevifolium* and *S. fallax*. – *Lindbergia* 17:96-110.
- Hill, M.O. Bell, N. Bruggeman-Nannenga, M. A., Brugué's, M., Cano, M.J., Enroth, J., Flatberg, K.I., Frahm J-M., Gallego, M.T., Garilleti, R., Guerra, J., Hedenas, L. Holyoak, D.T., Hyvönen J, Ignatov, M.S., Lara, F., Mazimpaka, V., Munoz, J. and Söderström, L. 2006. An annotated checklist of the mosses of Europe and Macaronesia.- *J. Bryol.* 28:198-267.
- Karlin, E.F., Boles, S.B. and Shaw, A.J. 2008a. Resolving boundaries between species in *Sphagnum* section *Subsecunda* using microsatellite markers. – *Taxon* 57: 1189–1200.
- Karlin, E.F., Boles, S.B. and Shaw, A.J. 2008b. Systematics of *Sphagnum* section *Sphagnum* in New Zealand: a microsatellite-based analysis. *New Zealand J. Bot.* 45: 105–118.
- Korpelainen, H., Virtanen, V., Kostamo, K. and Karttunen H. 2008. Molecular evidence shows that the moss *Rhytidiadelphus subpinnatus* (Hylocomiaceae) is clearly distinct from *R. squarrosus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:372–376.

- Long, D.G., Paton, J.A., Squirrell, J., Woodhead, M. and Hollingsworth, P.M. 2006. Morphological, ecological and genetic evidence for distinguishing *Anastrophyllum joergensenii* Schiffn. and *A. alpinum* Steph. (Jungermanniopsida: Lophoziaceae). *J. Bryol.* 28: 108–117.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959 .
- Såstad, M.S., Pedersen, B. and Digre, K. 1999a. Habitat-specific genetic effects on growth rate and morphology across pH and waterlevel gradients within a population of the moss *Sphagnum angustifolium* (Sphagnaceae). – *Am. J. Bot.* 86:1687-1698. Shaw és Renzagl 2004
- Såstad, S.M., Stenøien, H.K. and Flatberg, K.I. 1999b. Species delimitation and the relationships in the *Sphagnum recurvum* complex (Bryophyta) – as revealed by isozyme and RAPD markers. – *Systematic Botany* 24: 95-107.
- Såstad, S.M. 1999. Genetic and environmental sources of variation in leaf morphology of *Sphagnum fallax* and *Sphagnum isoviitae* (Bryopsida): comparison of experiments conducted in the field and laboratory. – *Canadian journal of Botany* 77:1-10.
- Såstad, S.M. and Flatberg, K.I. 1994. Leaf size and shape in the *Sphagnum recurvum* complex: taxonomic significance and habitat variation. – *J. Bryol.* 18:261-275.
- Séneca, A. and Söderström, L. 2009. Sphagnophyta of Europe and Macaronesia: a checklist with distribution data. *J. Bryol.* 31:243-254.
- Shaw, A. J., L. Pokorny, B. Shaw, M. Ricca, S. Boles, & P. Szövényi. 2008a. Genetic structure and genealogy in the *Sphagnum subsecundum* complex (Sphagnaceae: Bryophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 304-317.
- Shaw, A.J. 2000. Phylogeny of the Sphagnopsida based on nuclear and chloroplast DNA sequences. – *Bryologist* 103:277-306.
- Shaw, A.J., Cao, T., Wang, L.S., Flatberg, K.I., Flatberg, B., Shaw, B., Zhou, P., Boles, S. & Terracciano, S. 2008b. Genetic variation in three Chinese peat mosses (*Sphagnum*)
- Stenøien, H.K. and Såstad, S.M. 1999. Genetic structure in three haploid peat mosses (*Sphagnum*). – *Heredity* 82:391-400.
- Stenøien, H., Bakken, S. and Flatberg, K.I. 1997. Phenotypic variation in the *Sphagnum recurvum* complex: a cultivation experiment. – *J. Bryol.* 19:731-750.
- The R Development Core Team 2011. R version 2.13.0 (2011-04-13). <http://www.r-project.org/>
- Van der Velde, M. and Bijlsma, R 2001. Genetic Evidence for the Allopolyploid Origin of the Moss Species *Polytrichum longisetum*. - *Plant Biology* 3:379–385.
- Van der Velde, M. and Bijlsma, R 2000. Amount and structure of intra- and interspecific genetic variation in the moss genus *Polytrichum*. - *Heredity* 328±337