

Az *Iris nyaradyana* Prod. taxonómiai elkülönítése molekuláris markerekkel

SISA János^{1,2*}, MAJOR Enikő Ibolya^{2#}, HÖHN Mária^{2§}

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem – Kertészettudományi Doktori Iskola,
1118 Budapest, Villányi út 29–43.

²Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növénytermesztési-tudományok Intézet,
Növénytan Tanszék, 1118 Budapest, Villányi út 29–43.;

*janos.sisa@phd.uni-mate.hu; #major.eniko93@gmail.com; §hohn.maria@uni-mate.hu

Elfogadva: 2024. szeptember 2.

Kulcsszavak: filogenetika, haplotípus, *Iris aphylla*, *Iris* szekció, kloroplasztisz DNS, nukleáris DNS.

Összefoglalás: A Nyárády Erazmus Gyuláról elnevezett Nyárády-nőszirmot (*Iris nyaradyana* Prod.) Romániából, a Felső-Maros völgyének szikláiról írták le 1934-ben. A faj taxonómiai helyzete máig vitatott, morfológiája alapján egyes szerzők az *I. aphylla*, más szerzők pedig az *I. × germanica* fajjal azonosítják. Kutatásunk során elsőként vontuk be molekuláris vizsgálatba a Nyárády-nőszirmot, és célunk volt a faj rokonságának elemzése és értékelése molekuláris markerek alapján. Munkánk során a nukleáris ITS régiót és öt kloroplasztisz DNS markert (matk5–matk6, psbA5'R–matk8F, petL–psbE, psbM–trnD, trnL5^{UAA}F–trnF^{GAA}) alkalmaztunk, melyek segítségével összesen 9 *Iris* faj mintáit hasonlítottunk össze és további két faj (*Crocus* sp., *Gladiolus* sp.) szekvenciáját kulcsoportként használtunk fel. Az egyik kloroplasztisz marker, a matk5–matk6 nem volt variábilis ezeknél a fajoknál, amit ezért a további vizsgálatokból kihagytunk. A szekvenciák elemzésével megállapítottuk, hogy az *Iris nyaradyana* az *I. × germanica*, *I. pallida*, *I. variegata* és *I. aphylla* fajokkal áll legközelebbi rokonságban, de a molekuláris mintázat alapján egyértelműen egyik fajjal sem azonos. Egyes szerzők vélekedésével ellentétben a molekuláris összehasonlítás alapján a Nyárády-nőszirm nem az *I. aphylla* egyik populációja, attól több tulajdonságban is különbözik, annak ellenére, hogy az *I. aphylla* faj nagyfokú morfológiai variabilitásáról korábbi publikációk említést tesznek. A kloroplasztisz DNS szekvenciákból készült Templeton-Crandall-Sing (TCS) analízis a Nyárády-nőszirm haplotípusait az *I. × germanica* és *I. variegata* egyes haplotípusaival találta leginkább hasonlónak. A kloroplasztisz törzsfán a három *I. nyaradyana* egyed közösen alkotott egy nagy támogatottságú, önálló kládot.

Idézés: Sisa J., Major E. I., Höhn M. 2024: Az *Iris nyaradyana* Prod. taxonómiai elkülönítése molekuláris markerekkel. Bot. Közlem. 111(2): 131–146.
<https://doi.org/10.17716/BotKozlem.2024.111.2.131>

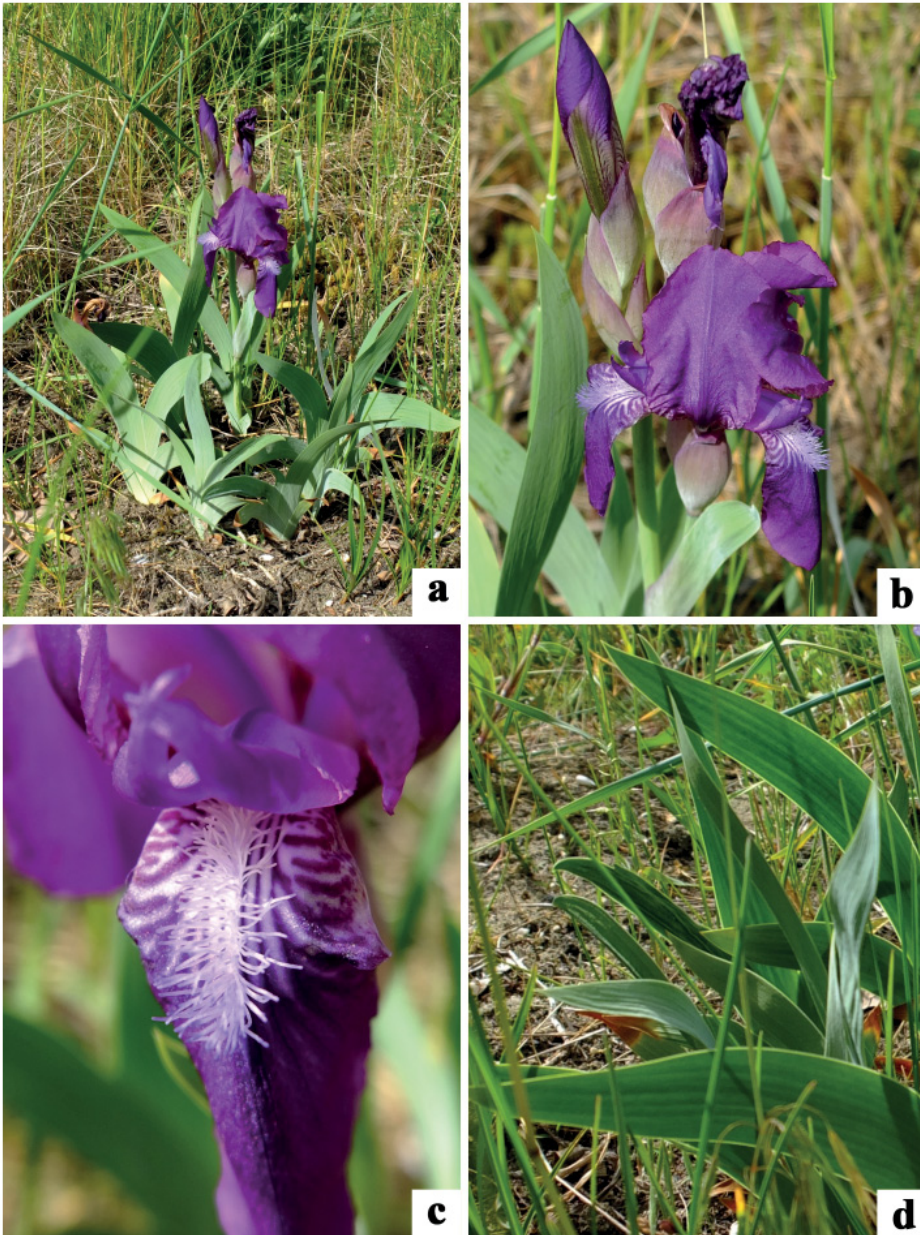
Bevezetés

Az északi mérsékelt égövön honos *Iris* (nőszirm) nemzetség 312 fajt foglal magában (POWO 2024), amivel az *Iridaceae* család legnépesebb tagja (WILSON

* Levelező szerző

2003). Jelentős díszítőértéke miatt a nőszirmok számtalan fajtájával és változatával találkozunk a kertekben. A Magyarországon őshonos nyolc *Iris* fajból hét természetvédelmi szempontból is jelentős (13/2001. (V. 9.) KöM rendelet). A Nyárády-nőszirmot (*Iris nyaradyana*, a nemzetközi adatbázisokban *I. × nyaradyana* névvel is, 1. ábra) Iuliu Prodan (korai műveiben Prodan Gyula néven; 1875–1959) erdélyi származású botanikus írta le *Iris Nyárádyana* névvel 1934-ben a Felső-Maros völgyének délies kiettségű szikláiról, a Gödemesterháza (Stánceni) közelében lévő Leul- (Oroszlán-) csúcs környékéről. Jelen ismereteink alapján ez a taxon egyetlen ma ismert előfordulása. Leírása (PRODAN 1934) alapján a növény kard alakú levelei a végükön hegyesek, gyakran hátrahajlók, 19–29 (–49) cm hosszúak, 12–21,5 mm szélesek, kiemelkedő erezzel. A szár 30–45 cm magas, 3–6 mm vastag, első (alacsonyabban lévő) elágazása 6 cm-rel van a talajfelszín felett és 11,5 cm hosszú. A következő ág 3,5 cm-rel található a végálló virág alatt és 3,5 cm hosszú. Ez az ág az alján két egyforma, 4,5 cm hosszú és 11 mm széles levéllel rendelkezik, melyek nagyon hasonlítanak a virágzati buroklevelekhez. Mindkét ág és a főhajtás is egy-egy virágban végződik, így a növény 3 (ritkán 2 vagy 4) virágú. A virágzati buroklevelek kezdetben halványzöldek és kissé mértékben eltérnek egymástól: a külső hossza 37–52 mm, szélessége 12–15 mm, a belső 45–50 mm hosszú és 18–20 mm széles. Az elszáradt buroklevelek nagyon vékonyak, áttetszőek, legnagyobb szélességüket közéjükön vagy kissé alatta érik el és gyakran egyfajta csőrrel záródnak. A magház 11–12 (–13) mm, a bibeszál 5 mm, a lepelcső 20–25 mm hosszú. A lepel színe lila, a külső lepelcimpák hossza 65 mm, szélességük 30 mm, szakállasak, körmük kb. 20 mm hosszú, ami a felső részén 12–13 mm, az alján pedig 4 mm széles. A belső lepelcimpák ellipszis formájúak, 61 mm hosszúak és 30 mm szélesek.

A Nyárády-nőszirmot nevét eredeti felfedezőjéről, a híres erdélyi magyar botanikusról, Nyárády Erazmus Gyuláról kapta, akivel Prodan állandó tudományos kapcsolatban állt (VÁCZY és BARTHA 1988). Nyárády a növényt 1912-es felfedezésekor *I. furcata*-ként azonosította Marschall von Bieberstein leírása és ábrázolása (BIEBERSTEIN 1832), valamint BERNÁTSKY (1911) összehasonlító munkája alapján, PRODAN (1934) azonban több morfológiai eltérésre hivatkozva ezt revideálta. Ezek szerint az *I. furcata* virágzati buroklevelei csak 5–6 mm szélesek, keskenyebbek és vékonyabbak is, mint az *I. nyaradyana* esetében. Az *I. furcata* általában 2, ritkán 1, de az *I. nyaradyana*-val ellentétben sosem 3 virágú. További fő különbségként a belső lepelcimpákat nevezte meg, melyek az *I. nyaradyana* esetében többnyire ellipszis alakúak és 30 mm szélesek, az *I. furcata*-nál pedig lánzdza formájúak és 20 mm-nél is keskenyebbek. PRODAN (1934) szerint a növény morfológiailag átmenetet képez a magyar nőszirm (*I. aphylla* subsp. *hungarica*) és az *I. sambucina* – jelenleg elfogadott nevén: *I. × germanica* (POWO 2024) – között. Utóbbival közös jellemzői az 1 virágban végződő ágak, a portoknál hosz-



1. ábra. Az *Iris nyaradyana* virágzó példánya (a), virágai (b), szakállas külső lepelcimpája (c) és kard alakú levelei (d). (fotó: Sisa János, 2021, Soroksári Botanikus Kert)

Fig. 1. Flowering individual of *Iris nyaradyana* (a), flowers (b), sepal beard (c), sword-shaped leaves (d). (photo: János Sisa, 2021, Soroksár Botanical Garden)

szabb porzószáll, a hatszögletű magház és a belső lepelcimpák hasonló formája, ezzel szemben a tőkocsány elágazása és a levelek alakja viszont a magyar nőszirommal mutat hasonlóságot (PRODAN 1934).

Az *I. nyaradyana* taxonómiai helyzete tisztázásra vár (HÖHN 1998). A jelentősebb adatbázisok az *I. × germanica*-val azonosítják (POWO 2024, WFO 2024), SĂMĂRGIȚAN et al. (2016), valamint VAS és MÓCSY (2017) azonban *I. aphylla*, illetve *I. aphylla* subsp. *hungarica* néven hivatkozik a Leul-csúcs sziklagyepeiben élő nősziromokra. Kutatásunk célja az *Iris nyaradyana* rokonsági körének és taxonómiai helyzetének értékelése molekuláris markerek felhasználásával, DNS szekvenciák összehasonlító elemzése alapján.

Anyag és módszer

A vizsgált *Iris* taxonok közül 12 minta származott a Soroksári Botanikus Kertből, ahová eredeti termőhelyről származó egyedeket telepítettek. Az *Iris pallida* mintát a Szász ÍriszKert Bt.-től, Szász Sándor dokumentált gyűjteményéből szereztük be. A taxonok kiválasztásának elsődleges szempontja az *I. nyaradyana*-val feltételezett minél közelebbi rokonság volt. A leszármazási kapcsolatok értelmezése érdekében további taxonokat is bevontunk a vizsgálatba (1. táblázat), valamint az NCBI adatbázisban tárolt *Iris*, *Crocus* és *Gladiolus* fajok szekvenciáit is felhasználtuk, ami a korábbi vizsgálatokkal való összehasonlíthatóságot is szolgálta (http1).

1. táblázat. A DNS kivonás alanyául szolgáló növényminták listája.

Table 1. List of taxa used for DNA extraction in this study. (1) species; (2) origin.

Faj (1)	Származás (2)
<i>Iris nyaradyana</i> Prod.	Leul-csúcs: coll: Höhn M. (3 példány)
<i>Iris pallida</i> Lam.	Szász ÍriszKert Bt., Szenna
<i>Iris sibirica</i> L.	Soroksári Botanikus Kert, <i>in situ</i> pannon láprét
<i>Iris sibirica</i> L.	M0 nyomvonal, Soroksár
<i>Iris spuria</i> L.	M0 nyomvonal, Soroksár
<i>Iris × germanica</i> L.	Soroksári Botanikus Kert
<i>Iris pseudacorus</i> L.	Soroksári Botanikus Kert, <i>in situ</i> vizes élőhely
<i>Iris pumila</i> L.	Soroksári Botanikus Kert, eredeti termőhelyről származó génanyag: Tata (2 példány)
<i>I. aphylla</i> L. subsp. <i>hungarica</i> (Waldst. et Kit.) Hegi	Soroksári Botanikus Kert, eredeti termőhelyről származó génanyag: Füzéri Várhegy
<i>Iris variegata</i> L.	Soroksári Botanikus Kert, eredeti termőhelyről származó génanyag: Sümeg
<i>Gladiolus communis</i> L.	Etter Kft., Budapest

A teljes genomi DNS-t levélmintákból vontuk ki az E.Z.N.A.[®] SP Plant DNA Kit izolációs készlet használatával a gyártó (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA) által megadott protokoll szerint. A molekuláris taxonómiai vizsgálathoz szükséges univerzális kloroplasztisz primereket (cpDNS, 2. táblázat) WILSON (2017), illetve GUO és WILSON (2013) munkái alapján választottuk ki. A kloroplasztisz régiók mellett a nukleáris ITS1-5,8S-ITS2 régió (nDNS) vizsgálatát is elvégeztük. Polimeráz lánreakció (PCR) eljárással felszaporítottuk a primerek által meghatározott lókuszek DNS szakaszait, majd a reakció eredményességét gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A sikeres felszaporítás után a DNS fragmentumok szekvenciájának meghatározása Sanger típusú szekvenálással történt.

A DNS amplifikációt Aeris[™] Thermal Cycler (Esco Micro Pte. Ltd., Singapore) készülékben végeztük. A PCR keveréket 26 µl végtérfogatra mértük össze, ami tartalmazott 18,7 µl Milli-Q ultratiszta vizet (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), 2,5 µl (10x) Dream Taq Green PCR puffert (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA), 0,5 µl (10mM) dNTP-t (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA), 1 µl (2,5 mM) MgCl₂-t, 0,5–0,5 µl (10–10 mM) forward és reverz primert (Biocenter Kft., Szeged), 0,25 µl (1%) BSA-t (Bovine Serum Albumin) (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA), 0,5 µl (2%) DMSO-t (Dimethyl sulfoxide) (Reanal Laborvegyszer Kft, Budapest), 0,05 µl (0,5 unit) Dream Taq GREEN (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) DNS polimeráz enzimet és 1,5 µl DNS-t (20–40 ng/µl).

2. táblázat. A nőszirm és a külcsoporként használt taxonok molekuláris vizsgálata során alkalmazott primerek.

Table 2. Primer pairs and amplification conditions used for the molecular analysis of *Iris* and outgroup taxa. (1) primer name; (2) forward/reverse; (3) sequence; (4) annealing temperature.

Primer név (1)	Forward/ Reverz (2)	Szekvencia (5'→3') (3)	Bekötési hőmérséklet (T _a) (°C) (4)
matk5	F	TGTCATAACCTGCATTTTCC	50
matk6	R	TGGGTTGCTAACTCAATGG	
psbA5'R	F	AACCATCCAATGTAAAGACGGTTT	50
matk8F	R	TCGACTTCTTGTGCTAGAACTTT	
petL	F	AGTAGAAAACCGAAATAACTAGTTA	50
psbE	R	TATCGAATACTGGTAATAATATCAGC	
psbM	F	AGCAATAAATGCRAGAATATTTACTTCCAT	50
trnD	R	GGGATTGTAGYTCAATTGGT	
trnL5 ^{UAAF}	F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	52
trnF ^{GAA}	R	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
ITS5	F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	57
ITS4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

A cpDNS régiók felszaporítása SHAW et al. (2005), az nDNS régiók felszaporítása pedig WHITE et al. (1990) munkája alapján valósult meg néhány módosítással. Egyes primerek esetében a protokollokat gradiens PCR alkalmazásával optimalizáltuk. A végleges PCR protokollok leírása a 3. és 4. táblázatban található.

A PCR vizsgálatot követően gélelektroforézissel ellenőriztük, hogy a reakció során megfelelő mennyiségű PCR termék képződött-e. Ennek érdekében a terméket 1,5%-os TBE agaróz gélen választottuk szét, aminek első lépéseként 100 ml pufferhez 1,5 g agarózt és 5 μ l GelRed (Biotium Inc., Ferment, CA, USA) festékanyagot adtunk. A gél szilárdulása után a fésűvel képzett zsebekbe 5 μ l PCR terméket adagoltunk. Az ismeretlen fragmentumhossz meghatározásához az első zsebbe DNS-létrát tettünk, 1 μ l GeneRuler 100 bp (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) és 2 μ l DNA LoadingDye (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) felhasználásával. Folyamatos ellenőrzés mellett, 110 V-os feszültségen, 55 percen át futtattuk a termékeket. A fotókat 2000-es expozíció készítettük.

3. táblázat. A nőszirm és a külsoportként használt taxonoknál alkalmazott PCR protokoll az ITS marker esetében.

Table 3. Description of PCR protocol for ITS nuclear marker used for the *Iris* and outgroup taxa. (1) step; (2) temperature; (3) time; (4) number of cycles.

	Folyamat (1)	Hőmérséklet (°C) (2)	Idő (sec) (3)	Ciklusok száma (4)
1.	Elődenaturáció	95	150	1
2.	Denaturáció	95	30	} 30
3.	Primerek kötődése (T_a)	57	30	
4.	Lánchosszabbítás	72	120	
5.	Extra lánchosszabbítás	72	600	1
6.	Hűtés	4	∞	

4. táblázat. A nőszirm és a külsoportként használt taxonoknál alkalmazott PCR protokoll a kloroplasztisz markerek esetében.

Table 4. Description of PCR protocol for chloroplast markers used for the *Iris* and outgroup taxa. (1) step; (2) temperature; (3) time; (4) cycles.

	Folyamat (1)	Hőmérséklet (°C) (2)	Idő (sec) (3)	Ciklusok száma (4)
1.	Elődenaturáció	94	300	1
2.	Denaturáció	94	30	} 35
3.	Primerek kötődése (T_a)	50–52	40	
4.	Lánchosszabbítás	72	150	
5.	Extra lánchosszabbítás	72	420	1
6.	Hűtés	4	∞	

A PCR termékeket ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) felhasználásával tisztítottuk. 14 µl PCR termékhez 4 µl tisztító reagenst adtunk és az így kapott elegyen alkalmaztuk a gyártó által megadott protokollt. A továbbiakban 4 percig 37 °C-on inkubáltuk a mintákat, majd 1 percen át 80 °C-on tartottuk az elegyet a reagens inaktiválása érdekében.

A tisztított amplifikátumokat ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) automata DNS-szekvenátor segítségével szekvenálták a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpontban. A fragmentumok hossza miatt a szekvenálás 2 irányból történt (forward és reverz), melynek indító szekvenciái a PCR amplifikálás 10 mM-os (5 µl) primerei voltak.

Ahol szükséges volt, a szekvenciák egyéb részein található bizonytalan nukleotidokat javítottuk a kromatogramok alapján. A hibáktól mentes reverz szekvenciákat ezután komplementerré fordítottuk a forward szakaszokkal történő illesztés érdekében. Az ilyen módon szerkesztett szakaszokból minden minta esetén konszenzus szekvenciákat hoztunk létre, melyek ezáltal illeszthetővé váltak egymáshoz és a génbankból letöltött szekvenciákhoz is. A szekvenciák szerkesztéséhez és illesztéséhez a BioEdit 7.2.6.1 (HALL 1999) szoftvert használtuk. A Függelékben feltüntetett génbanki szekvenciák a kloroplasztisz markerek esetében GUO és WILSON (2013), WILSON (2017), PARNIKOZA et al. (2017), illetve NEMATİ et al. (2019), az ITS markert illetően pedig HARPKE et al. (2013) és SINGH és RANA (2016) munkáiból származnak. A gap-eket az egyszerű indel kódolási algoritmus (SIMMONS et al. 2001) alapján kódoltuk a FastGap 1.2 programmal (BORCHSENIUS 2009). A kódolt szekvenciákat a Seaview 4.7 (GOUY et al. 2010) szoftverrel phylip formátumba konvertáltuk. A törzsfá elkészítését a RAxML 8.2.10 (STAMATAKIS 2014) és a raxmlGUI 1.5 (SILVESTRO és MICHALAK 2012) szoftverek segítségével, a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) módszerrel végeztük el, ahol a törzsfágak statisztikai támogatottságának meghatározásához 10 000 bootstrap-es értéket állítottunk be. A kapott fák megjelenítése a MEGA 10.0.5 (KUMAR et al. 2018) szoftverrel történt.

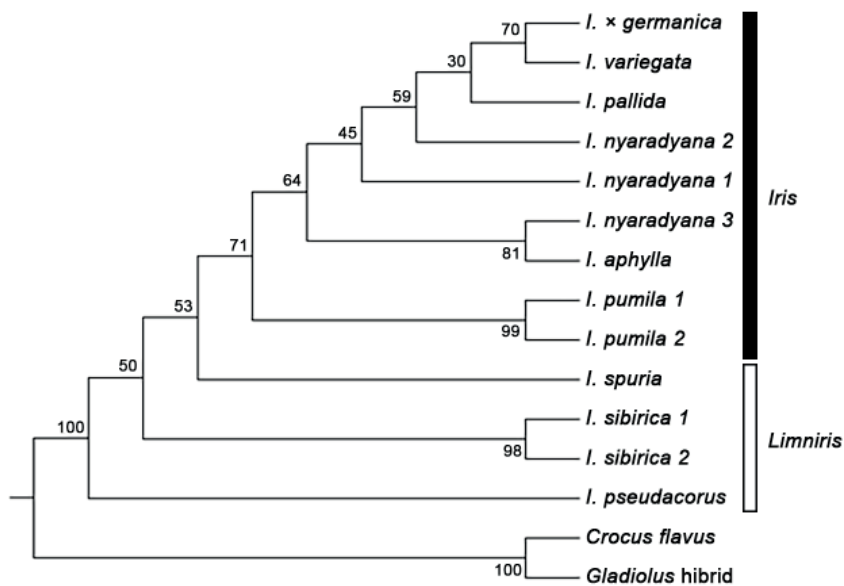
Eredmények

A sikeres DNS kivonás, szekvenálás és a szekvenciák szerkesztése után nyert információk a vizsgált DNS szakaszokról az 5. táblázatban láthatók. Az ITS és négy kloroplasztisz marker esetén kapott szakaszok egyaránt alacsony fokú (4,9–7,4%) polimorfizmussal rendelkeztek, a matk5–matk6 primer párral amplifikált régió viszont egyáltalán nem mutatott variabilitást, ezért azt nem vontuk be a filogenetikai analízisbe.

5. táblázat. A kapott nőszirm és külcsoport szekvenciák jellemzői primer páronként összesítve.
Table 5. Characteristics of the aligned *Iris* and outgroup sequences summarized according to primer pairs. (1) region; (2) length; (3) number of variable nucleotides; (4) number of informative nucleotides.

Primer párok (1)	Illesztett szekvenciák hossza (bp) (2)	Variábilis nukleotidok száma (3)	Informatív nukleotidok száma (4)
matk5–matk6	656	0	0
psbA5'R–matk8F	410–456	20 (4,9%)	14 (3,4%)
trnL5' ^{UAA} F–trnF ^{GAA}	687–802	43 (6,3%)	25 (3,6%)
petL–psbE	1119–1284	63 (5,7%)	42 (3,8%)
psbM–trnD	670–756	49 (7,4%)	31 (4,7%)
ITS5–ITS4	369–422	20 (5,4%)	12 (3,3%)

A nukleáris ITS régiók illesztése alapján készített kladogramon (2. ábra) az *Iris* taxonok monofiletikus csoportot alkotnak a *Crocus* és *Gladiolus* külcsoportokhoz képest. A nemzetség egyetlen nagy kládot alkot, amelyen belül először fajonként külön-külön ágaznak le a *Limniris* szekció tagjai, majd egy kládot

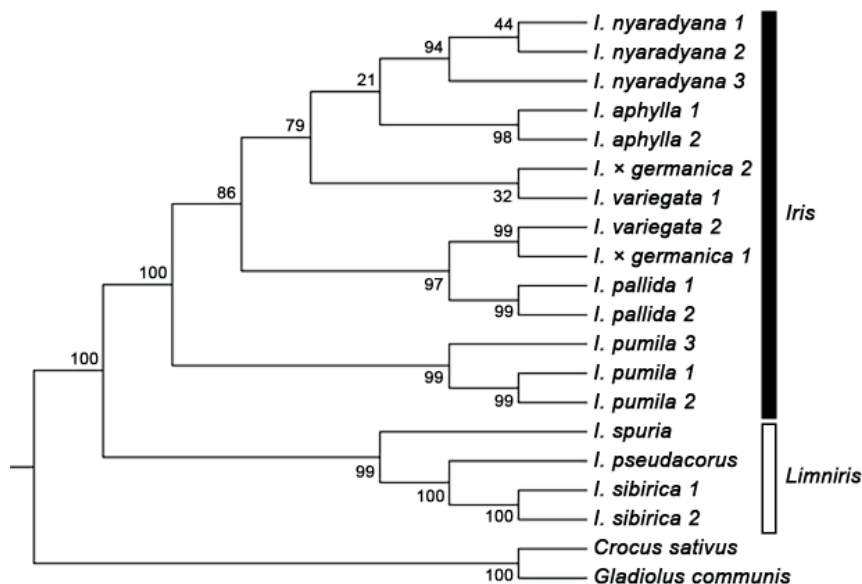


2. ábra. *Iris* fajok törzsfája nukleáris ITS régiók illesztésével, maximum likelihood módszer alkalmazásával. A támogatottsági értékeket 10 000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptuk. Az ágakon feltüntetett számok a támogatottságot tükröző százalékos értékek. A szekciók jelzése jobb oldalon látható (fehér: *Limniris*, fekete: *Iris*).

Fig. 2. Maximum likelihood tree of *Iris* species based on nuclear DNA sequence data. Ten thousand replicates were performed for bootstrap analysis. Bootstrap percentage values are given above branches. Sections are shown on the right (white: *Limniris*, black: *Iris*).

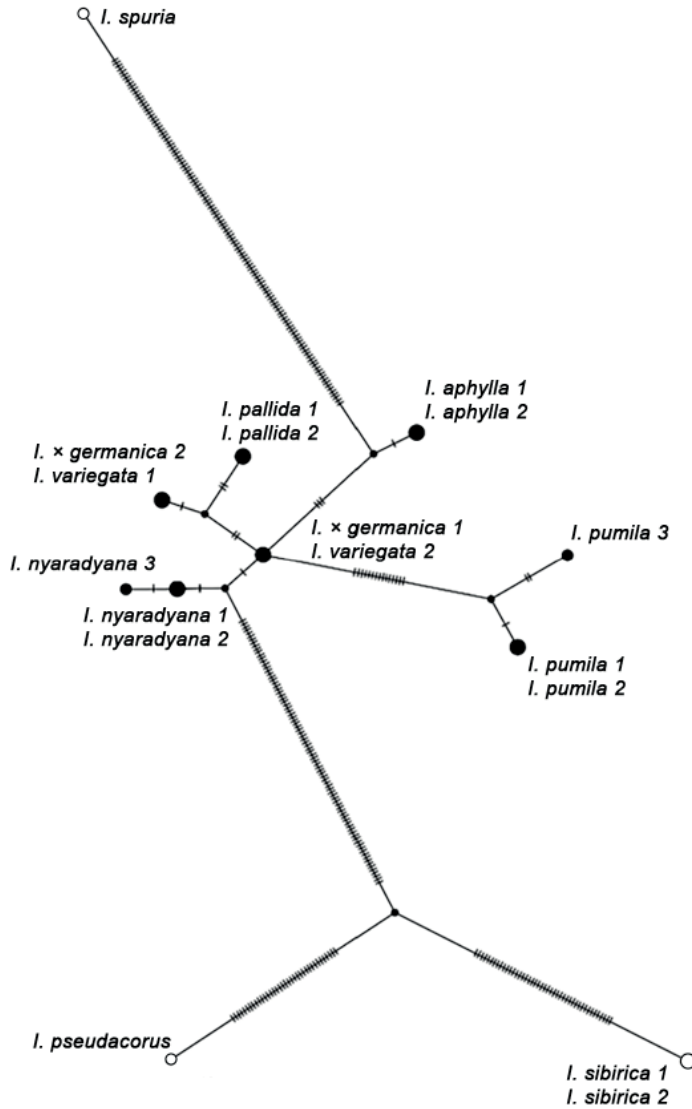
alkotva az *Iris* szekció fajai. Az *Iris* klád belső szerkezetére jellemző, hogy nincsenek benne nagyobb csoportok, és a minták többnyire nem képeznek fajonként külön kládokat. Ez alól kivételt jelentenek az *I. pumila* minták, jól elválva a többi *Iris* szekcióba tartozó taxontól. Az egyik *I. nyaradyana* minta az *I. aphylla*-val alkot egy kéttagú kládot, míg a másik két *I. nyaradyana* minta annak a kisebb kládnak a része, amiben ezeken kívül az *I. pallida*, *I. variegata* és *I. × germanica* minták is találhatóak. E csoporton belül egymáshoz legnagyobb rokonságot az *I. variegata* és az *I. × germanica* mutat, hozzájuk csatlakozik az *I. pallida* mintája, valamint a két *I. nyaradyana* minta.

Akárcsak az ITS alapú törzsfán, a négy kloroplasztisz régió illesztésével előállított konszenzus törzsfán (3. ábra) az összes *Iris* taxon monofiletikus csoportot képez a *Crocus* és a *Gladiolus* külső csoportokhoz képest. Különbség viszont, hogy itt monofiletikus csoportot alkot a *Limniris* szekció, 100%-os támogatottsággal elválva az *Iris* szekciótól. A *Limniris* csoportban először az *I. spuria*, majd az *I. pseudacorus* minta válik el a klád magját alkotó két *I. sibirica* mintától. A *Limniris* kládon belül az összes elágazás igen nagy támogatottságú. Az *Iris* szekció csoportján belül az *I. pumila* minták igen erős támogatottsággal elkülönülnek a többi faj-



3. ábra. A vizsgált *Iris* fajok törzsfája 4 kloroplasztisz DNS régió illesztésével, maximum likelihood módszer alapján. A támogatottsági értékeket 10 000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptuk. Az ágakon feltüntetett számok a támogatottságot tükröző százalékos értékek. A szekciók jelzése jobb oldalon látható (fehér: *Limniris*, fekete: *Iris*).

Fig. 3. Maximum likelihood tree of *Iris* species based on four plastid markers. Ten thousand replicates were performed for bootstrap analysis. Bootstrap percentage values are given above branches. Sections are shown on the right (white: *Limniris*, black: *Iris*).



4. ábra. A vizsgált nőszirm minták haplotípus hálózata 4 kloroplasztisz DNS szekvencia alapján készült TCS analízise eredményeképpen. A fekete pontok a hiányzó köztes haplotípusokat jelölik, amelyek nem szerepeltek az elemzett mintasorban. Az ágakon lévő vonalak a haplotípusok közötti mutációs lépéseket mutatják. A taxonokat jelző köröknél a színek a szekciókat jelölik (fehér: *Limniris*, fekete: *Iris*).

Fig. 4. The haplotype network obtained based on TCS analysis of the four chloroplast markers of the *Iris* samples studied. Black dots indicate missing intermediate haplotypes that were not observed in the analyzed sample set. Dashes on branches indicate mutational steps between haplotypes. For taxa circles, colours indicate sections (white: *Limniris*, black: *Iris*).

tól. Egy közös, kisebb kládot alkotnak az *I. pallida* minták az *I. variegata* és az *I. × germanica* egy-egy mintájával, az utóbbi fajokhoz tartozó másik minták azonban az *I. aphylla* és *I. nyaradyana* mintákhoz csatlakoznak. A részleteket tekintve, a saját gyűjtésű *I. × germanica* a génbankból származó *I. variegata*-val közösen került az *I. pallida* mintákkal közös egységbe, míg a saját gyűjtésű *I. variegata* a génbankból származó *I. × germanica*-val csoportosul, és egy gyengébb, de közel 80%-os támogatottságú kládot alkot az *I. aphylla* és *I. nyaradyana* mintákkal. Ezen a kládon belül a három *I. nyaradyana* minta magas bootstrap értékkel egy csoportot képez, ami alacsony támogatottsággal válik el a két *I. aphylla* minta képezte kládtól.

A kloroplasztisz szekvenciák alapján készült haplotípus hálózaton (4. ábra) központi elhelyezkedésű, aránylag kompakt csoportként jelenik meg az *Iris* szekció, amihez több ponton és sok mutációs lépéssel kapcsolódnak a *Limniris* fajtái, melyek egymástól is jelentősen különböznek. Az *Iris* szekció egymással közelebbi rokonságot mutató fajokból áll, csoportjukon belül az *I. pumila* minták kapcsolódnak viszonylag több mutációs lépéssel a többi fajhoz. Külön haplotípusokat képviselnek az *I. aphylla*, *I. pallida*, *I. pseudacorus*, *I. sibirica* és *I. spuria* minták. Közös haplotípust alkot a génbankból származó *I. × germanica* a gyűjtött *I. variegata*-val, a másik *I. × germanica* pedig a másik *I. variegata*-val csoportosul. Két haplotípust jelenítenek meg az *I. pumila* minták, és szintén két haplotípust képviselnek az *I. nyaradyana*-k is, melyek 2, illetve 3 mutációs lépésre helyezkednek el az egyik *I. × germanica* és *I. variegata* alkotta haplotípustól. Az *Iris nyaradyana* minták tehát a legközelebbi rokonságot az *I. × germanica* és *I. variegata* mintákkal, valamivel távolabbat pedig az *I. pallida* és *I. aphylla* mintákkal mutatnak, és számos mutációs lépés választja el őket az *I. pumila* mintáktól.

Megvitatás

Az *Iris* fajok rokonsági kapcsolatainak elemzéséhez a taxonómiában széles körben használt nukleáris ITS és kloroplasztisz markereket használtuk fel. Az ITS és a négy kloroplasztisz szekvenciából készült törzsfák eltérő topológiájúak voltak, de a vizsgált *Iris* fajok mindkét törzsfán monofiletikus csoportot alkottak a kulcsoporthoz képest, és a nemzetségen belüli szekciók nem keveredtek egymással. Az *Iris* szekció fajtái mindkét törzsfán nagyfokú támogatottsággal alkotnak közös csoportot, míg a *Limniris* fajok csak a kloroplasztisz szekvenciák elemzése esetében jelennek meg önálló kládként. Munkánk során elsőként vontuk be molekuláris vizsgálatba a Keleti-Kárpátokból leírt *Iris* taxont, az *I. nyaradyana*-t, melyet különböző szerzők morfológiai alapon más-más fajokkal tartottak azonosnak (PRODAN 1934, SĂMĂRGIȚAN et al. 2016, VAS és MÓCSY 2017, POWO 2024, WFO 2024). Az ITS alapú törzsfán a három *I. nyaradyana* egyed közül egy az *I. aphylla*-val közös kládra került, a másik kettő pedig az *I. pallida*, *I. × germanica* és *I. variegata* min-

tákkal csoportosult. Az anyai vonalon öröklődő kloroplasztisz DNS alapú törzsfán viszont a három *I. nyaradyana* minta egy nagy támogatottságú önálló kládot képezett. Legközelebbi testvércsoportként azonban kis támogatottsággal az *I. aphylla* minták alkotta klád kapcsolódott, ahhoz pedig az *I. × germanica* és *I. variegata* faj egy-egy mintája, majd 86% támogatottsággal a többi *I. variegata*, *I. × germanica* és *I. pallida* minta. Eredményeinkben ezáltal hasonló törzsfaszerkezet alakult ki, mint amelyre már WILSON (2017) is felhívta a figyelmet.

A Templeton-Crandall-Sing (TCS) alapú haplotípus hálózat az azonos haplotípusokat együtt tünteti fel, így egy letisztultabb képet kaptunk a minták közötti genetikai távolságról. A Nyárády-nőszírom három mintája két külön haplotípust képviselt, melyekhez legközelebb az egyik *I. × germanica* és *I. variegata* formálta haplotípus került. Ez a távolság a másik *I. × germanica* és *I. variegata* által alkotott csomóponttól öt és hat, az *I. aphylla* egyedektől pedig hat és hét mutációs lépésre van. Ily módon a kloroplasztisz törzsfán mutatkozó kis támogatottságú *I. aphylla* és *I. nyaradyana* csoportosulás tagjai a haplotípus hálózatban láthatóan távolabb helyezkednek el egymástól, és az *I. aphylla* az *I. × germanica* és *I. variegata* mintákhoz képest is távolabbinak mutatkozik.

A molekuláris eredmények igazolták a morfológiai alapon felállított rokonsági kört. A törzsfák alapján a Nyárády-nőszírom egyedek semelyik másik vizsgált *Iris* fajjal sem azonosíthatók egyértelműen. Bár az eltérő élőhelyi körülmények is okozhatnak nagyobb fokú morfológiai variabilitást, a molekuláris eredmények alapján feltételezhető, hogy a korábban leírt alaktani különbségek taxonómiai eltéréseket is tükröznek. Megjegyzendő, hogy az *I. aphylla* kiterjedt areáján nagy morfológiai változatosságot mutat, ebből eredően számos helyi formát, változatot írtak le (DYKES 1924, KÖHLEIN 1981). Ezek közül több kapott alfaj státuszt (TUTIN et al. 1980), azonban a korábbi molekuláris diverzitás vizsgálatok nem támasztották alá ezeket az infrataxonokat (WRÓBLEWSKA et al. 2010). Erdély hegyvidékein többfelé él az *I. aphylla*, előfordulásairól azonban részletes elemző morfológiai és molekuláris vizsgálat ez idáig nem készült. A rokonsági kapcsolatok további finomítását, pontosítását eredményezheti több kloroplasztisz marker vizsgálata, hosszabb szekvenciák vagy a teljes kloroplasztisz genom elemzése, valamint az *Iris* fajok között új minták bevonása, akár az erdélyi *I. aphylla* populációkból, akár a Nyárády-nőszírom populációból. A morfológiai összehasonlítás érdekében célszerű lenne azonos termőhelyi körülmények között nevelni a növényeket, ily módon kizárva az élőhelyi különbségekből származó alaktani változatosságot. Az *I. × germanica* egy kultúrában fenntartott, hibrid taxon számtalan fajtával és változattal, amelynek az *I. pallida*-t és az *I. variegata*-t tekintik szülőfajainak (HENDERSON 1992). Pontos taxonómiai helyzete molekulárisan nehezen állapítható meg, a hibridizáció révén gyakran idegen génanyagot is tartalmazhat. Viszont az *I. variegata* egy jól gyűjthető, morfológiailag elkülönülő

sztyeppei faj, melyből több egyed bevonása a molekuláris vizsgálatba segítheti a törzsfák kládjainak jobb elkülönülését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Dr. Szász Sándor egyetemi docensnek, a Szász ÍriszKert Bt. vezetőjének a levélminták beszerzésében nyújtott önzetlen segítségét, Dr. Halász Krisztiánnak, a Vácrátóti Nemzeti Botanikus Kert gyűjteményvezetőjének az intézmény könyvtárához való hozzáférést, valamint a MATE Kertészettudományi Doktori Iskolának a támogatást.

Irodalomjegyzék

- 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségekben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről.
<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A0100013.KOM> (Hozzáférés: 2024. április 29.)
- BERNÁTSKY J. 1911: A hazai *Iris*-félék rendszere. Matematikai és Természettudományi Értesítő 29: 537–552.
- BIEBERSTEIN A. F. M. 1832: Centuria plantarum rariorum Rossiae meridionalis praesertim Tauriae et Caucasi, iconibus descriptionibusque illustrata 2. [kiadó nélkül], Petropoli, tab. 51
- BORCHSENIUS F. 2009: FastGap 1.2. Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark. Published online at https://www.aubot.dk/FastGap_home.htm
- DYKES W. R. 1924: A handbook of garden Irises. M. Hopkinson & Co, London, 250 pp.
- GOUY M., GUINDON S., GASCUEL O. 2010: SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- GUO J., WILSON C. A. 2013: Molecular Phylogeny of Crested Iris Based on Five Plastid Markers (Iridaceae). *Systematic Botany* 38(4): 987–995. <https://doi.org/10.1600/036364413X674724>
- HALL T. A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41: 95–98.
- HARPKE D., MENG S., RUTTEN T., KERNDORFF H., BLATTNER F. R. 2013: Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: Ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66(3): 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.10.007>
- HENDERSON N. C. 1992: What is *Iris germanica*? *Bulletin of the American Iris Society* 286: 6–11.
- HÖHN M. 1998: A Kelemen-havasok növényzetéről. Mentor Kiadó, Marosvásárhely, 114 pp.
- KÖHLEIN F. 1981: *Iris*. Germany. Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart, 360 pp.
- KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., TAMURA K. 2018: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- NEMATİ Z., HARPKE D., GEMICIOĞLU A., KERNDORFF H., BLATTNER F. R. 2019: Saffron (*Crocus sativus*) is an autotriploid that evolved in Attica (Greece) from wild *Crocus cartwrightianus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 136: 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.03.022>
- PARNIKOZA I. Y., ANDREEV I. O., BUBLYK O. M., SPIRIDONOVA K. V., GOŁĘBIEWSKA J., KUBIAK M., KUCZYŃSKA A., MYSTKOWSKA K., OŁĘDRZYŃSKA N., URASIŃSKA B., ŚLĘZAK-PARNIKOZA A., GÓRNIAK M., WOJCIECHOWSKI K., DIDUKH Y. P., KUNAKH V. A. 2017:

- The current state of steppe perennial plants populations: A case study on *Iris pumila*. *Biologia* 72: 24–35. <https://doi.org/10.1515/biolog-2017-0002>
- POWO 2024: Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> (Hozzáfézés: 2024. április 8.)
- PRODAN J. 1934: Die Iris-Arten Rumäniens. *Buletinul Grădinii botanice și al Muzeului botanic dela Universitatea din Cluj* 14(3–4): 105–198.
- SĂMĂRGIȚAN M., OROIAN S., HIRIȚIU M., CALALB T. 2016: Plant species of community interest identified in the Călimani-Gurghiu Mountains (Mureș County, Romania). *Acta Horti Botanici Bucurestiensis* 43: 67–78. <https://doi.org/10.1515/ahbb-2016-0006>
- SHAW J., LICKEY E. B., BECK J. T., FARMER S. B., LIU W., MILLER J., SIRIPUN K. C., WINDER C. T., SCHILLING E. E. SMALL R. L. 2005: The tortoise and the hare II: relative utility of 21 non-coding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142–166. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>
- SILVESTRO D., MICHALAK I. 2012: raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- SIMMONS M. P., OCHOTERENA H., CARR T. G. 2001: Incorporation, relative homoplasy, and effect of gap characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 50(3): 454–462.
- SINGH N., RANA T. S. 2016. Inter cultivar relationships in *Gladiolus* cultivars using internal transcribed spacer (ITS) region. Kézirat.
- STAMATAKIS A. 2014: RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A., MOORE D. M., VALENTINE D. H., WALTERS S. M., WEBB D. A. 1980: *Flora Europaea: Volume 5. Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)*. Cambridge University Press, Cambridge, 476 pp.
- VAS I. I., MÓCSY I. 2017: Raport de Mediu – Plan Urbanistic General Comuna Stânceni. Agenția Națională pentru Protecția Mediului, Ministerul Mediului, București, 107 pp.
- VÁCZY K., BARTHA S. 1988: Nyárady Erazmus Gyula, a természettudós. *Kriterion Könyvkiadó, Bukarest*, 158 pp.
- WFO 2024: *Iris nyaradyana* Prodan. *World Flora Online*. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000783676> (Hozzáfézés: 2024. április 8.)
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A., GELDFAND D. H., SNINSKY J. J., WHITE T. J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- WILSON C. A. 2003: Phylogenetic relationships in *Iris* series *Californicae* based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Systematic Botany* 28(1): 39–46.
- WILSON C. A. 2017: Sectional Relationships in the Eurasian Bearded *Iris* (subgen. *Iris*) Based on Phylogenetic Analyses of Sequence Data. *Systematic Botany* 42(3): 392–401. <https://doi.org/10.1600/036364417X695970>
- WRÓBLEWSKA A., BRZOSKO E., CHUDZIŃSKA E., BORDÁCS S., PROKOPIV A. I. 2010: Cytotype Distribution and Colonization History of the Steppe Plant *Iris aphylla*. *Annales Botanici Fennici* 47(1): 23–33.

Világháló-hivatkozás

http1 – GenBank. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Hozzáfézés: 2024. március 3.)

Taxonomic delimitation of *Iris nyaradyana* Prod. using molecular markers

J. SISA^{1,2*}, E. I. MAJOR^{2#}, M. HÖHN^{3§}

¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences – Doctoral School of Horticultural Sciences, 1118 Budapest, Villányi út 29–43, Hungary

²Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Agronomy, Department of Botany, 1118 Budapest, Villányi út 29–43, Hungary;

*janos.sisa@phd.uni-mate.hu; #major.eniko93@gmail.com; §hohn.maria@uni-mate.hu

Accepted: 2 September 2024

Key words: chloroplast DNA, haplotype, *Iris aphylla*, nuclear DNA, phylogeny, section *Iris*.

Iris nyaradyana Prod. named on the honour of the botanist Erazmus Gyula Nyárády was described in 1934, from rocks of the Upper Mureş/Maros River Valley, Romania. The taxonomic status of the species is still disputed; based on its morphology some authors identify it with *I. aphylla*, others with *I. × germanica*. Our study is the first to involve this taxon in molecular analysis, and aims to assess the relationship of the species based on molecular markers. Nuclear ITS and five chloroplast DNA markers (matk5–matk6, psbA5'R–matk8F, petL–psbE, psbM–trnD, trnL5^{UAA}F–trnF^{GAA}) were used. Altogether 9 *Iris* species were compared and the sequence of 2 additional species (*Crocus* sp., *Gladiolus* sp.) were used as outgroups. One of the chloroplast markers, matk5–matk6 proved to be not variable and therefore was excluded from the analyses. Sequence analysis revealed that *Iris nyaradyana* is most closely related to *I. × germanica*, *I. variegata*, *I. pallida* and *I. aphylla*, but based on the molecular pattern, it is not identical to any of these species. Contrary to the opinion of some authors, molecular comparisons suggest that *Iris nyaradyana* is not a population of *I. aphylla*, although the high morphological variability of *I. aphylla* has been reported in previous publications. Templeton-Crandall-Sing (TCS) analysis of the chloroplast DNA sequences found the haplotypes of *Iris nyaradyana* to be similar to some haplotypes of *I. × germanica* and *I. variegata*. On the chloroplast phylogenetic tree, all three *Iris nyaradyana* individuals formed an independent clade with high support.

Citation: Sisa J., Major E. I., Höhn M. 2024: Taxonomic delimitation of *Iris nyaradyana* Prod. using molecular markers. Bot. Közlem. 111(2): 131–146. (in Hungarian with English abstract) <https://doi.org/10.17716/BotKozlem.2024.111.2.131>

* Corresponding author

Függelék. A GenBank adatbázisból a jelen vizsgálathoz letöltött genetikai szekvenciák.

Appendix. Genetic sequences obtained from the GenBank database used in this study. (1) Chloroplast sequences; (2) ITS sequences.

Kloroplasztisz szekvenciák (1)

Iris aphylla 2: *Iris aphylla* L., AY596661, KY319421, KY319470, KY319520

Iris × *germanica* 2: *Iris* × *germanica* L., HM574575, HM574636, KY319476, KY319526, KC510961

Iris pallida 2: *Iris pallida* Lam., HM574628, HM574689, KY319432, KY319481, KY319531

Iris pumila 3: *Iris pumila* L., HM574576, HM574637, KY319484, KY319534, KU310529

Iris variegata 2: *Iris variegata* L., KY319410, KY319442, KY319491, KY319541

Crocus sativus L. NC_041460

ITS szekvenciák (2)

Crocus flavus: HE663984

Gladiolus hibrid: KX219617