

DUNÁNTÚLI *LEUCE* NYÁR POPULÁCIÓK GENETIKAI VIZSGÁLATA RAPD ÉS cpDNS MARKEREKKEL

Benke Attila, Cseke Klára és Borovics Attila

Erdészeti Tudományos Intézet

Kivonat

A kutatás a fehér nyár és a rezgő nyár fontosabb dunántúli populációinak populációgenetikai vizsgálatát célozta. A cél e populációk genetikai változatosságának felmérése, valamint a teljes molekuláris genetikai változatosság megoszlásának vizsgálata volt. A populációgenetikai vizsgálatokban RAPD és cpDNS markerek alkalmazására került sor. A RAPD vizsgálatokba a teljes gyűjtési területet lefedő mintasorból 267, a PCR-RFLP vizsgálatba 300 egyedet vontunk be. Két, nagyfokú polimorfizmust mutató RAPD primerrel végzett vizsgálatok során a Belső-somogyi állományok mutatták mindkét alfaj esetében a legmagasabb diverzitás értékeket, a Nei-féle genetikai távolság alapján szerkesztett dendrogram ugyanakkor nem mutatott szoros kapcsolatot az egyes populációk genetikai és földrajzi távolsága között. A 4 cpDNS primerpárral végzett PCR-RFLP vizsgálat alkalmával a legmagasabb diverzitás értékeket a fehér nyárnál a Kis-balatoni, a rezgő nyár populációk közül pedig a villányi populáció mutatta. A Nei-féle genetikai távolságok a cpDNS markerek esetében sem mutattak szoros kapcsolatot a populációk földrajzi távolságával. A molekuláris genetikai változatosság mindkét markerezési eljárás tekintetében a populációkon belüli variációból ered.

Kulcsszavak: Leuce nyárak, molekuláris genetikai változatosság, Shannon-index, RAPD, cpDNS, Nei-féle genetikai távolság

POPULATION GENETIC INVENTORY OF TRANSDANUBIAN *LEUCE* POPLARS APPLYING RAPD AND cpDNA MARKERS

Abstract

A population genetic study of native white poplar and european trembling aspen stands was carried out with exhaustive sampling throughout the Transdanubian region. The main goal was to make a genetic inventory in different regions and to estimate the genetic diversity within and between the analysed subpopulations. RAPD and chloroplast DNA markers were used. The RAPD and PCR-RFLP analyses were performed on 267 and 300 samples, respectively. Based on two highly polymorphic RAPD primers the subpopulation from the Belső-Somogy region showed the highest diversity in case of both species. By the results of the applied four cpDNA markers the highest diversity level was found in the Kis-Balaton subpopulation of white poplars, and in the Villány subpopulation of trembling aspens. No correlation was found between the geographic and genetic (Nei's index) distances of the populations analysed by both RAPD and cpDNA markers, respectively. The genetic variation of both genetic markers was basically derived due to the genetic diversity of populations.

Keywords: Leuce poplars, molecular genetic variability, Shannon-index, RAPD, cpDNA, Nei's genetic distance

BEVEZETÉS

A *Leuce* szekcióba tartozó fehér nyár (*Populus alba* L.) és rezgő nyár (*Populus tremula* L.) fontos kiinduló fajai az erdészeti növénynemesítésnek. Bár jelenleg a szekciót csak két fajta (*Populus alba* L. cv. Villafranca, *Populus alba* L. x *Populus grandidentata* Michx. cv. Favorit), valamint két fajtajelölt (*Populus alba* L. cv. Homoki, *Populus alba* L. x *Populus grandidentata* Michx. cv. Sudarlós) képviseli a hazai erdészeti nyár fajtaszortimentben, természetes hibridjük, a szürke nyár (*Populus x canescens* Sm.) erdészeti jelentősége kimagasló. Az Erdészeti Tudományos Intézet kutatói már a múlt század közepén felismerték a szürke nyárban rejlő gazdasági lehetőségeket, nemesítésbe vonásának fontosságát, illetve ezzel szoros összefüggésben a két alapfaj genetikai változatosságának megőrzésének jelentőségét (Koltay és Kopecky 1954).

A genetikai változatosság megőrzéséhez nélkülözhetetlen annak legalább megközelítő szintű ismerete. A szekcióba tartozó fajok genetikai változatosságának felmérésében külföldön és hazánkban is folytak kutatások (a következőkben néhány olyan kutatás ismertetésére kerül sor, amelyeket a saját kutatómunkában is alkalmazott módszerekkel végeztek). Sánchez és mtsai (2000) Spanyolország területén található, különböző földrajzi eredetű rezgő nyár populációk genetikai azonosítását végezték RAPD markerekkel. Vizsgálataik egyrészt nagyfokú azonosságot mutattak ki az egyes populációkon belüli egyedmintázatokban, ami nagyarányú sarjeredetre utal a gyűjtési területeken, másrészt megállapították, hogy az észak-spanyolországi Huesca tartomány állományai rendelkeznek a legnagyobb genetikai variabilitással. Sabatti és mtsai (2001) Olaszország területén vizsgáltak fehér nyár populációkat szintén RAPD markerekkel. Az Appennineket, valamint Dél- és Nyugat-Olaszországot érintő, összesen 13 élőhelyről származó mintasor elemzésével magas korrelációt mutattak ki az egyes populációk földrajzi elhelyezkedése és genetikai mintázata között. Ez felhívja a figyelmet az erdősítésekben a helyi populációkból származó szaporítóanyag felhasználásának fontosságára.

A mi kutatómunkánk célkitűzéseit – módszertanában és a vizsgált növényanyag földrajzi elhelyezkedésében is – leginkább megközelítő munka Lexer és mtsai (2005, 2007) nevéhez fűződik, akik a fehér nyár és a rezgő nyár közötti természetes introgresszió mértékét és irányát vizsgálták a Duna völgyében található természetes populációkban, SSR és kloroplaszt markerek alkalmazásával. Vizsgálataikból kiderült, hogy a természetes hibridizációs zónában fellelhető szürke nyár egyedek genetikai mintázata sokkal közelebb áll a fehér nyár egyedek képezte csoport mintázatához. Továbbá a nyárak esetében anyai úton öröklődő kloroplaszt DNS (cpDNS) elemzésével kimutatták, hogy túlnyomórészt egyirányú introgresszió zajlik a fehér nyár és a rezgő nyár között, és a párosodási rendszerben jellemzően a rezgő nyár a pollenadó faj. A kialakult – morfológiailag és genetikailag is igen diverz – hibrid populáció fennmaradását, a szerzők véleménye szerint, a folyó menti élőhelyek változatossága, mozaikossága is elősegíti.

Ugyancsak Lexer és mtsai (2010) 93 molekuláris genetikai marker felhasználásával 3 folyó (Duna, Ticino, Tisza) menti *Leuce* nyár hibridizációs zóna vizsgálata során többek között megállapították, hogy a fehér nyár és a rezgő nyár között fennálló reproduktív izoláció jóval nagyobb, mint azt korábban feltételezték, ami vélhetőleg virágzásbiológiai okokból fakadó egyféle válogató párosodási rendszernek, valamint posztzigotikus gátlásnak köszönhető.

Hazánkban Bartha Dénes és Bordács Sándor végzett úttörő jellegű munkát (Bartha és Bordács 1990) a szekcióba tartozó fehér nyár genetikai változatosságának felmérésében. Izoenzim (észteráz és peroxidáz) vizsgálatokkal hat vizsgált génhely (lokusz) tekintetében magas heterozigóciát állapítottak meg 5 természetes eredetű fehér nyár populáción belül. A kutatómunka során célunk volt ennek a kutatásnak a kibővítése populációk és vizsgálati módszerek terén egyaránt.

Bartha (1999) behatóan vizsgálta a szürke nyár létrejöttében szerepet játszó hibridizációs körülményeket. 64 autochton populáció vizsgálata során megállapította, hogy a rezgő nyár minden esetben korábban kezd virágozni, mint a fehér nyár, valamint hogy a homoki ökotópokban a virágzás korábban kezdődik mindkét faj

esetében. Továbbá kimutatta, hogy a homoki termőhelyeken nagyobb az esély a két faj virágzási időszakának átfedésére, mint a lassabban felmelegedő ártéri ökotópokban, valamint, hogy a létrejövő F_1 -es szürke nyár hibridek nagyobb eséllyel kereszteződnek vissza a fehér nyár szülővel. Egy korábbi vizsgálat során 21 autochton populáció felmérésével azt is kimutatta, hogy hibrid egyedek nagyobb számban fordulnak elő emberi tevékenységgel érintett termőhelyeken (Bartha 1991). Ennek oka, hogy a szülőfajokkal visszakereszteződött szürke nyár egyedek növekedési erélye csökkent, másrészt a zavartalan társulásokban szabad niche-ek alig, vagy egyáltalán nem találhatóak (Bartha 2005).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintagyűjtés

A mintagyűjtés alkalmával célkitűzés volt a két alapfaj dunántúli elterjedési területén a fontosabb tájegységek érintése. Így a kutatás kiterjedt az Ormánságra, a Villányi-hegységre, a Mecsekre, a Zselicre, Külső- és Belső-Somogyra, a Kis-Balaton környezetére, a Keszthelyi-hegységre, a Magas-Bakonyra, valamint a Szigetköz egy részére. Ezeket a tájegységeket a vizsgálatok során mintagyűjtési egységként, populációként kezeltük. A terepi munkálatok során 79 községhatárban gyűjtöttünk mintát. A munkálatok során a mintafák földrajzi helyzetét GPS koordinátákkal rögzítettük, taxonómiai besorolásukat dokumentáltuk, valamint a további vizsgálatokhoz róluk herbáriumi anyagot és levélmintát gyűjtöttünk. A kutatás keretében több fontos populációban nem volt módunk mintát gyűjteni (többek között a Közép- és Alsó-Duna menti fehér nyár, nyugat-dunántúli rezgő nyár populációkban, valamint a Hanságban), ugyanakkor távlati célunk, hogy kutatási eredményeinket kiegészítsük az ezekből a populációkból származó mintákkal.

Munkánk során olyan állományokat, út menti facsoportokat mintáztunk, amelyek bizonyítottan vagy nagy valószínűség szerint természetes eredetűek, azaz genetikai állományuk jól reprezentálja a tájegységre jellemző genetikai mintázatot. A kijelölt fák középidős, idős egyedek voltak. Ennek oka egyrészt a visszakereshetőség volt, másrészt az a feltételezés, hogy ezek az egyedek már évtizedek óta részt vesznek a génáramlási folyamatokban (pollen vagy termés útján), így forrásai a helyi ökológiai feltételekhez való adaptációnak.

A választott metodika szerint egy erdőrészletből vagy nagyobb facsoportból legfeljebb három egyedet mintáztunk, részben azért, hogy minél nagyobb területet fedjünk le a mintavételezéssel, részben azért, hogy elkerülhető legyen a nagy területű sarjcsoportok többszöri mintázása, ami torzította volna a genetikai vizsgálatok eredményeit.

A mintázott fákról herbáriumi növényanyagot is gyűjtöttünk, amelyek a későbbi visszaellenőrzésekre is alkalmasak lehetnek.

A vizsgált egyedek számát és taxonómiai besorolásukat az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A molekuláris genetikai vizsgálatba vont egyedek száma fajonként
Table 1: The number of samples by species used for the molecular genetic analyses

Faj	RAPD	PCR-RFLP
<i>Populus alba</i>	148	159
<i>Populus tremula</i>	119	141
Mindösszesen	267	300



A RAPD és a PCR-RFLP analízist döntően ugyanazon egyedeken végeztük el (a cpDNS vizsgálatba valamivel több somogyi egyedet vontunk be, a mintaszámok különbsége ezzel magyarázható).

Molekuláris genetikai vizsgálatok

DNS-extrakció

A DNS-t közvetlenül friss vagy fagyasztva tárolt levélszövetből vontuk ki, a QIAGEN cég Dneasy Plant Mini Kit-jének felhasználásával. A több lépésben végrehajtott kivonás eredménye mintegy 200 µl nagy tisztaságú, koncentrált DNS-oldat lett, amely alkalmas volt a genetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

A DNS-oldatokból 50 µl-nyi mennyiséget -80 °C-on továbbtároltunk, így a legyűjtött egyedek genetikai állománya fagyasztott, felhasználásra közvetlenül alkalmas DNS-kivonatban is megőrződik a herbáriumban szobahőmérsékleten tárolt levélminták mellett.

RAPD markerek

A RAPD markertechnika (*Random Amplified Polymorphic DNA*) a PCR (polimeráz láncreakció, *Polymerase Chain Reaction*) alapú módszerek legegyszerűbb változata. Ezen módszerrel a növényi genomban véletlenszerű DNS-szakaszok szaporíthatók fel (amplifikálhatók) (Hajósné Novák 1999). A reakcióhoz tet-szőleges szekvenciasorrendű, 8–10 bázispár hosszúságú oligonukleotidokat (primereket) alkalmaznak. A módszer nagy előnye, hogy olcsón és egyszerűen kivitelezhető. A módszer leírása több szakkönyvben is fel-lelhető (Hajósné Novák 1999, Bisztray 2001, Bordács 2002).

A vizsgálatok során 20 OPERON (Eurofins MWG Operon, <http://www.operon.com/>) primer tesztelése történt meg, melyek közül 5 mutatott ígéretes polimorfizmust (OPA1, OPD5, OPE9, OPK8, OPK16), közülük kettő alkalmasnak bizonyult a két faj genomjának elkülönítésére (OPD5 és OPK8-as primerek). Az értékelés során csak az 500 és 2000 bázispár közötti fragmentumokat elemeztük. Az egyedek RAPD profiljának felállításhoz összesen 41 fragmentum jelenlétét vagy hiányát írtuk le bináris kódolással. 20 marker az OPD5 primer, míg 21 marker az OPK8 primerrel végzett amplifikációból származott.

A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) Eppendorf Mastercycler Gradient készüléket alkalmaztunk a következő programozással: kezdő denaturáció 95 °C-on 15 percig; denaturáció 95 °C-on 1 percig; bekötődés 38 °C-on 1 percig; lánchosszabbítás 72 °C-on 2 percig; a ciklus ismétlése (2-3-4-es lépés) 39-szer; végső lánchosszabbítás 72 °C-on 10 percig; tárolás 4 °C-on megszakításig. A reakcióelegy összeállításához Promega GoTaq Flexi polimerázt használtunk a következő receptúrát követve: 5–10 µg DNS, 1x-es mennyiségű puffer, 1,5 mM-os MgCl₂, 0,1 rész 4 µM-os primer, 0,01 rész egyenként 10mM-os dNTP mix, 0,75 unit polimeráz enzim. A fragmentumok elválasztása agaróz gélelektroforézis alkalmazásával történt, a következő paraméterekkel: 1,75%-os gélen, 120 V feszültségen 3 órán át futtatva, 5000-100 bázispár tartományú méretstandarddal. A mintázatot UV fényel átvilágítva digitálisan fotóztuk.

A futtatás eredményeként kapott genotípus-mintázat kiértékelése Kodak 1D elemző szoftver segítségével történt. A binárisan kódolt egyedmintázatok elemzéséhez GenAlEx 6.4 (Peakall és Smouse 2006) szoftvert használtunk. A szoftver segítségével megállapítható volt az egyes populációk genetikai változatossága, egymáshoz viszonyított genetikai távolsága. Az elemzés során nyert genetikai távolságmátrixból a Statistica 6.0 (StatSoft. Inc. 2001) szoftver segítségével dendrogram készült, mely grafikusán ábrázolja az egyes populációk egymáshoz viszonyított genetikai távolságát.

PCR-RFLP módszer

A sejtmagi DNS mellett a kloroplaszt DNS vizsgálata is célja volt a kutatásnak. A kloroplaszt markerek uniparentális öröklődésük és „univerzalitásuk” révén különösen alkalmasak egy faj állományainak leszármazástani, vagy akár közeli rokon fajok filogenetikai vizsgálataira (Heinze 2007). Különösen igaz ez a maternálisan öröklődő plasztisz genomra, mivel a maggal történő génáramlás általában viszonylag korlátozott, és így helyi mintázatok fennmaradása is lehetséges (Mátyás 2002a). A cpDNS elemzése PCR-RFLP vizsgálattal történt. A módszer egy kloroplaszt specifikus primerpárokkal végzett PCR reakción alapszik. A PCR reakciót követően a felszaporított célszekvenciákat restrikciós endonukleázokkal hasítottuk. Az így létrehozott fragmentumok (szekvenciák) a szakirodalom alapján (Lexer és mtsai 2005) alkalmasak az alapfajok elkülönítésére, valamint a fajon belüli változatosság vizsgálatára. A vizsgálatok során 4 primerpár-restrikciós endonukleáz kombinációt alkalmaztunk. Az emésztést követő fragmentelválasztás után a gélfotók elemzése, valamint a fragment-mintázatok értékelése a RAPD vizsgálat esetében ismertetettel azonos módszer szerint történt.

A kutatáshoz a markerek kiválasztása az alábbi kloroplaszt adatbázisból történt Lexer és mtsai (2005) nyomán: www.bfw.ac.at PRIM.html. Az alkalmazott cpPrimer és restrikciós enzim (New England Biolabs Inc.) kombinációkat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: PCR-RFLP vizsgálatokhoz használt primer – endonukleáz kombinációk
Table 2: Primer – restriction endonuclease combinations used for the PCR-RFLP analyses

cpPrimer	Restrikciós endonukleáz	Vizsgált fragmentumok hossza (bp)	Vizsgált fragmentumok száma
Rpl16ex1f + rps3r2	Hha I + Eco RI	280	2
Rpl16R1516 + rpl16F71R	Eco RI	310–380	5
Rps3f2 + ccmp10R	Hha I + Ssp I	205–320	5
ccmp10R + trnHM	Msp I	285–385	7

A primerek, valamint a PCR protokoll kiválasztása Grivet és mtsai (2001) munkája, valamint a <http://bfw.ac.at/200/1859.html> adatbázis alapján történt. Az elektroforetikus mintázat megjelenítését és dokumentálását a RAPD vizsgálatoknál ismertetett módon végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

RAPD vizsgálatok

Az egyes populációkra jellemző, RAPD vizsgálatok során nyert diverzitás értékeket a 3. táblázat tartalmazza. A populációk genetikai diverzitásának, ezáltal alkalmazkodó-képességének értékelése a megfigyelt allélszám és az allélgyakoriságok alapján számított Shannon-index (*Shannon's Information index*, Allaby 2004) alapján történt.



3. táblázat: RAPD elemzés során számított genetikai diverzitás értékek
Table 3: Genetic diversity indices derived from the RAPD analyses

Populáció	Egyedszám	Átlagos lókuszonkénti allélszám	Effektív allélszám	Shannon-index	Heterozigócia
FhBs	15	1,098	1,235	0,234	0,149
FhDr	30	1,610	1,161	0,212	0,120
FhKe	10	0,976	1,202	0,202	0,127
FhSz	18	0,976	1,189	0,192	0,121
FhMe	12	0,878	1,158	0,176	0,108
FhZs	14	0,976	1,148	0,174	0,104
FhMo	15	0,951	1,129	0,155	0,091
FhBk	16	0,756	1,101	0,124	0,073
FhKs	11	0,683	1,106	0,122	0,073
FhKb	7	0,659	1,104	0,118	0,071
ReBs	14	1,415	1,294	0,284	0,180
ReVi	6	0,976	1,215	0,212	0,134
ReZs	16	1,244	1,182	0,206	0,123
ReKe	15	1,073	1,168	0,180	0,109
ReMe	27	1,195	1,156	0,175	0,104
ReKs	11	0,951	1,158	0,168	0,103
ReBk	18	1,122	1,138	0,161	0,094
ReDr	12	0,829	1,137	0,147	0,090

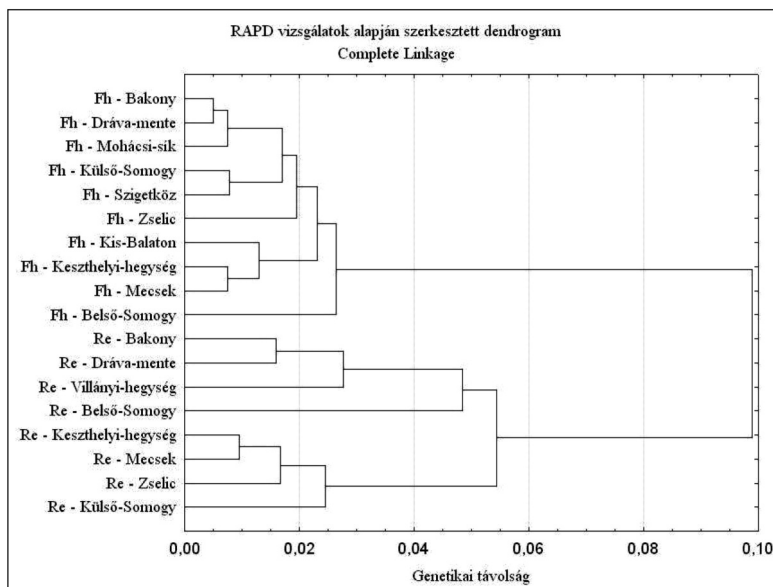
Jelmagyarázat: **Fh** – fehér nyár, **Re** – rezgő nyár; **Bk** – Magas-Bakony, **Bs** – Belső-Somogy, **Dr** – Dráva mente, **Kb** – Kis-Balaton, **Ke** – Keszthelyi-hegység, **Ks** – Külső-Somogy, **Me** – Mecsek, **Mo** – Mohácsi-sík, **Sz** – Szigetköz, **Vi** – Villányi-hegység, **Zs** – Zseli)

Key: **Fh** – white poplars, **Re** – trembling aspens; Regions: **Bk** – Magas-Bakony, **Bs** – Belső-Somogy, **Dr** – Dráva mente, **Kb** – Kis-Balaton, **Ke** – Keszthelyi-hegység, **Ks** – Külső-Somogy, **Me** – Mecsek, **Mo** – Mohácsi-sík, **Sz** – Szigetköz, **Vi** – Villányi-hegység, **Zs** – Zselic

A táblázatban a populációk a Shannon-index értékeik alapján fafajonként rangsorolva láthatók, azaz a legmagasabb értékekkel bíró, tehát legváltozatosabb populációk kerültek a rangsorban előre, míg a legkisebb változatosságot mutatók a sor végére. A táblázat alapján jól látható, hogy a legmagasabb genetikai változatosságot a belső-somogyi rezgő nyár és fehér nyár állományok, míg a legalacsonyabbat a kis-balatoni fehér nyár állományok mutatták. Utóbbi esetben az alacsony diverzitás érték feltehetőleg a kis mintaszámmal is összefügg. A teljes fajra számított heterozigócia (H_e) a fehér nyár esetén 0,104, a rezgő nyár esetén 0,117 értéket ért el, ami lombos fák tekintetében alacsonynak mondható.

Az egyes populációk Nei-féle genetikai távolsága alapján szerkesztett dendrogram az 1. ábrán látható. A klaszterek kialakítása a Statistica 6.0 szoftver *Complete linkage* módszerével történt, amely az egymástól legtávolabbi genotípusok összevetésén alapszik (Podani 1997). A dendrogram alapján megállapítható, hogy a RAPD vizsgálatok során alkalmazott két primer (OPD5, OPK8) alkalmas a két alfaj egyedeinek elkülönítésére. Ezt mutatja, hogy a rezgő nyár és fehér nyár populációk jelentős kapcsolódási távolsággal külön ágra kerültek. Az egyes populációk genetikai távolsága a vártnál nagyobb eltéréseket mutat. Azt a feltételezést, mely szerint az egyes fajok földrajzilag egymáshoz közelebb elhelyezkedő populációi nagyobb rokonsági fokot mutatnak, a RAPD vizsgálatokkal nem sikerült igazolni. Feltűnő ugyanakkor, hogy a bakonyi

és Dráva menti, valamint a keszthelyi és mecseki fehér nyár és rezgő nyár állományok konzekvensen közeli rokonságot mutatnak. Az egyes populációk genetikai távolságának összetettebb vizsgálatához újabb primerek bevonását látjuk szükségesnek.



1. ábra: RAPD vizsgálatok alapján Complete linkage eljárással szerkesztett dendrogram (Statistica 6.0)

Figure 1: Genetic dendrogram based on the results of the RAPD analyses constructed by the Complete linkage method (Statistica 6.0)

A GenAIEx 6.4 program segítségével a genetikai távolságmátrix alapján AMOVA vizsgálatot is végeztünk fajonként, a molekuláris variancia mértékének, valamint annak populációk közötti és az egyes populációkon belüli megoszlásának meghatározása céljából. Az elemzés eredményeképpen megállapítható, hogy a genetikai variabilitás fő forrása a populációkon belüli variabilitás (a fehér nyár esetében 91%, a rezgő nyárak esetében 83%), míg a teljes variabilitáshoz a populációk közötti változatosság kisebb mértékben (9, illetve 17%-os arányban) járul hozzá. A populációk közötti differenciáltság mértéke adott területen kapcsolatba hozható az adott faj elterjedési mintázatával. Az egybefüggő vagy kevésbé tagolt elterjedési területtel rendelkező fajok populációinak differenciáltsága alacsonyabb, míg a tagolt, széttöredező elterjedési struktúra magasabb populációk közötti differenciáltsághoz vezet (Mátyás 2002b). A vizsgálat során kapott eredmények ennek megfelelően alakultak, hiszen a Dunántúlon a vizsgálatba vont két faj közül a fehér nyár rendelkezik összefüggőbb elterjedési területtel, a rezgő nyár elterjedési területe jóval tagoltabb.

PCR-RFLP vizsgálatok

A PCR-RFLP vizsgálatok során nyert diverzitás értékeket a 4. táblázat tartalmazza. A táblázatban az egyes populációkat fajonként a Shannon-index értékeik alapján rangsoroltuk.

4. táblázat: *cpDNS* markerek alapján számított genetikai diverzitás értékek (*Genalex 6.4*)
 Table 4: *Genetic diversity indices derived from the PCR-RFLP analyses (Genalex 6.4)*

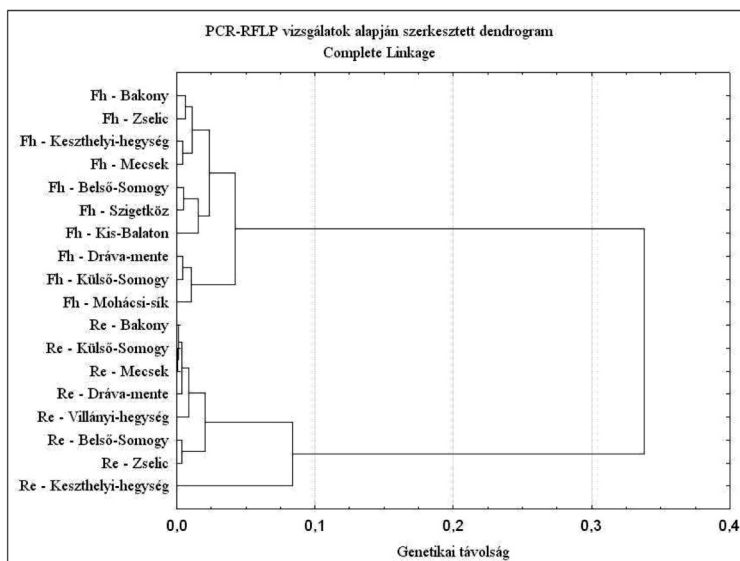
Populáció	Egyedszám	Átlagos lókuszonkénti allélszám	Effektív allélszám	Shannon-index	Megfigyelt haplotípusok száma	Haploid géndiverzitás
FhKb	7	2,250	2,163	0,608	4	0,347
FhBs	15	2,500	1,979	0,580	7	0,320
FhZs	14	2,250	1,929	0,556	4	0,311
FhDr	31	2,500	1,703	0,544	8	0,291
FhBk	16	2,000	1,826	0,510	4	0,309
FhKe	12	2,250	1,701	0,490	4	0,271
FhSz	18	2,250	1,677	0,486	6	0,284
FhKs	19	2,250	1,659	0,477	7	0,258
FhMe	12	2,000	1,683	0,450	4	0,264
FhMo	15	1,500	1,235	0,250	2	0,160
ReVi	14	1,750	1,574	0,376	5	0,227
ReBk	18	2,000	1,560	0,334	5	0,173
ReMe	27	2,000	1,428	0,333	4	0,188
ReKs	23	2,000	1,399	0,318	5	0,171
ReKe	16	1,500	1,392	0,312	4	0,217
ReDr	12	1,500	1,417	0,257	3	0,156
ReBs	16	1,500	1,171	0,184	3	0,102
ReZs	15	1,250	1,200	0,159	2	0,111

A fehér nyárak esetében a belső-somogyi állományok a RAPD vizsgálatokhoz hasonlóan magas diverzitás értéket mutattak. Ugyanakkor a sejtmagi DNS elemzésének eredményeivel ellentétben, ahol alacsony Shannon-index érték jellemezte, a kis-balatoni populáció ezen diverzitás tekintetében a legnagyobb értéket érte el. Megjegyzendő, hogy a kis-balatoni populáció a magas diverzitás értékeket alacsony egyedszám mellett adta, ami természetesen torzíthatja a valós genetikai sokféleséget, ezért a későbbi vizsgálatok során emelt mintaszám bevonása szükséges e populáció esetében. Legkevésbé változatosnak a mohácsi állományok bizonyultak, ami feltételezhetően emberi hatásnak köszönhető (a mintagyűjtés egyedül a Mohácsi-síkon érintett ültetett állományokat is). A RAPD vizsgálatok során kapott diverzitás sorrend a rezgő nyár populációk esetében is megváltozott a PCR-RFLP vizsgálat eredményei alapján. A legnagyobb Shannon-index értékek a villányi, bakonyi és a mecseki állományokat jellemezték, míg a legkevésbé diverznek a Dráva menti, belső-somogyi és zselici állományok bizonyultak. Ugyanakkor megállapítható, hogy a rezgő nyár populációk jóval kisebb változatosságot mutattak a fehér nyár populációkhoz képest.

Az egyes populációk Nei-féle genetikai távolsága alapján szerkesztett dendrogram a 2. ábrán látható.

A kloroplaszt-DNS vizsgálata alapján megállapítható, hogy a módszer szintén alkalmas az alapfajok elkülönítésére. A két csoport genetikai távolsága ugyanakkor a RAPD vizsgálatok alapján megállapítotthoz képest jóval nagyobb.

Jellemzően a fehér nyárak esetében a földrajzilag egymáshoz közel fekvő populációk a dendrogram alapján nem mutatnak szorosabb rokonságot. A rezgő nyárak esetében is csak részben érvényesül a genetikai és a földrajzi távolság közötti összefüggés. Kiemelhető e faj esetében is a belső-somogyi és a zselici populációk kisebb genetikai távolsága.



2. ábra: PCR-RFLP vizsgálatok alapján Complete linkage eljárással szerkesztett dendrogram

Figure 2: Genetic dendrogram based on the results of the PCR-RFLP analyses constructed by the Complete linkage method

AMOVA számítással megvizsgáltuk a kloroplaszt-DNS haplotípusokon alapuló molekuláris variancia mértékét fajonként, valamint annak megoszlását a populációkon belül, illetve azok között. A kapott eredmények nagyfokú hasonlóságot mutatnak a RAPD vizsgálat alapján számolt AMOVA értékekkel. A molekuláris variancia mértéke alapvetően a populációkon belüli diverzitásra vezethető vissza (fehér nyár esetében 97%, rezgő nyár esetében pedig 85%-ban), míg a teljes változatosság kialakításában a populációk közötti variancia kisebb szerepet játszik (3 és 15%). A két alapfaj tekintetében a sorrend azonos, azaz a fehér nyár mutat alacsonyabb populációk közötti differenciáltságot, ami, mint azt a RAPD vizsgálat esetében ismertettük, a Dunántúlon a fajra jellemző egységesebb elterjedéssel, tagolatlanabb areával magyarázható.

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során modern molekuláris genetikai módszerekkel felmértük a fehér nyár és a rezgő nyár fontosabb dunántúli populációjának genetikai változatosságát. Összességében megállapítottuk, hogy a vizsgált populációk tekintetében a somogyi állományok diverzitás értékei kimagaslóak (a populációkat az allélszám és az allélfrekvencia értékeket figyelembe vevő Shannon-index alapján rangsoroltuk). A RAPD vizsgálatok során tesztelt primerek közül kettő esetében mutattunk ki fajspecifikus alléleket, azaz olyanokat, melyek csak az egyik fajra jellemzőek. A két molekuláris genetikai módszer vizsgálati eredményei alapján szerkesztett dendrogramok elemzése során nem sikerült szorosabb kapcsolatot kimutatnunk az egyes populációk genetikai és földrajzi távolsága között, ami újabb molekuláris markerek, valamint egyes populációk terén újabb egyedek vizsgálatba vonásának fontosságára hívja fel a figyelmet. A RAPD és a cpDNS vizsgálat során is feltárt molekuláris variancia elemzése során megállapítottuk, hogy a teljes variancia kialakításában döntő mértékben a populációkon belüli diverzitás vesz részt, a populációk közötti diverzitás aránya jóval kisebb. Továbbá a fehér nyár esetében a populációkon belüli variancia mindkét vizsgálat esetében magasabb értéket mutatott a rezgő nyáréhoz képest, ami a két faj dunántúli elterjedési mintázatával magyarázható. Vizsgálataink



kat a továbbiakban szeretnénk újabb populációk bevonásával bővíteni, így lehetőségeinkhez mérten minél szélesebb képet alkothatunk e két nagyon értékes faj hazai populációinak genetikai változatosságáról; az eredmények az erdészeti és természetvédelmi gyakorlat számára is fontos információkkal szolgálhatnak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A mintagyűjtés alkalmával segítők, vezetőink voltak a Duna-Dráva Nemzeti Park, a Mecseki Erdészeti ZRt., a SEFAG Erdészeti és Faipari ZRt., a Bakonyi Erdészeti és Faipari ZRt., valamint a Kisalföldi Erdőgazdaság ZRt. munkatársai, akiknek ezúton is szeretnénk kifejezni hálás köszönetünket fáradozásaikért.

Kutatásunkat az OTKA 063321-es nyilvántartási számú pályázata támogatta.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Allaby, M. 2004: "Shannon-Wiener index of diversity." a Dictionary of Ecology. 2004. *Encyclopedia.com*. (April 12, 2010). <http://www.encyclopedia.com/doc/1O14-ShannonWienerindexfdvrsty.html>
- Bartha D. és Bordács S. 1990: Elektrophoretische Untersuchungen an Weißpappel-Populationen in Ungarn. *Die Holzzucht*, 44: 23–25.
- Bartha D. 1991: Gibt es Bodenrassen bei der Weisspappel? *Allgemeine Forst Zeitschrift* 46: 877.
- Bartha D. 1999: Phänologische und taxonomische Untersuchungen bei den einheimischen Populationen der Weisspappel (*Populus alba* L.). *Publ. Univ. Horti. Industriaeque Alimentariae* 59: 85–93.
- Bartha D. 2005: Ist die Graupappel eine eigene Art? Taxonomische Untersuchungen an den Populationen der Weisspappel (*Populus alba* L.). *Allgemeine Forst Zeitschrift/Der Wald* 60: 252–254.
- Bisztray Gy. 2001: Molekuláris genetikai markerek. 424. In: Velich I. (ed.): *Növénygenetika*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Bordács S. 2002: A DNS-polimorfizmus elemzéséhez alkalmazott módszerek. 53. In: Mátyás Cs. (ed.): *Erdészeti – természetvédelmi genetika*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Grivet D.; Heinze B.; Vendramin GG. and Petit RJ. 2001: Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1: 345–349.
- Hajósné Novák M. 1999: A PCR-technikán alapuló módszerek. 44–48. In: Hajósné Novák M. (ed.): *Genetikai variabilitás a növénynevelésben*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Heinze, B. 2007: A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods* 2007, 3: 4. <http://www.plantmethods.com/content/3/1/4>
- Koltay Gy. és Kopecky F. 1954: őshonos nyáraink leromlott öröklöttségének megjavítása. *Erdészeti Kutatások* 2: 65–86.
- Lexer, C.; Fay, M.F.; Joseph, A.; Nica, M.S. and Heinze, B. 2005: Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular Ecology* 14: 1045–1057.
- Lexer, C.; Buerkle, C.A.; Joseph, J.A.; Heinze, B. and Fay, M.F. 2007: Admixture in European *Populus* hybrid zones makes feasible the mapping of loci that contribute the reproductive isolation and trait differences. *Heredity* (2007) 98: 74–84.
- Lexer, C.; Joseph, J.; Loo, M. Van, Barbará, T.; Heinze, B.; Bartha D.; Castiglione, S.; Fay, M. and Buerkle, C. A. 2010: Genomic Admixture Analysis in European *Populus* spp. Reveals Unexpected Patterns of Reproductive Isolation and Mating. *Genetics* 186: 699–712.
- Mátyás Cs. 2002a: A génszintű változatosság és elemzése. 15. In: Mátyás Cs. (ed.): *Erdészeti – természetvédelmi genetika*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Mátyás Cs. 2002b: Az allélváltozatosság statisztikai elemzése. 35–40. In: Mátyás Cs. (ed.): *Erdészeti – természetvédelmi genetika*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006: GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.

- Podani J. 1997: Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó. Budapest p.145.
- Sabatti, M.; D'Ovidio, R.; Tanzarella, O.A. és Scarascia Mugnozza, G.E. 2001: Assessment of geographic variation by RAPD markers among Italian open-pollinated progenies of *Populus alba* L. Genetic Resources and Crop Evolution 48(5): 423–428.
- Sánchez, N.; Grau, J. M.; Alba, N.; Manzanera, J. A. and de los Angeles Bruno, M. 2000: Genetic Characterisation of *Populus tremula* Regions of Origin in Spain Using RAPD Fingerprints. Silvae Genetica 49(2): 66–71.
- StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749;2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>

Érkezett: 2011. május 17.

Közlésre elfogadva: 2011. szeptember 1.



Idős fehér nyár

A dél-eurázsiai elterjedésű fehér nyár mindamellett, hogy a hazai síkvidéki természetes erdőtársulások gyakori faja, egyben az alföldi tájkép egyik meghatározó eleme is. Erdészeti jelentősége elsősorban a szárazabb termőhelyek hasznosításában van. Genetikai állományának megőrzése ezért erdészeti és természetvédelmi szempontból egyaránt kiemelten fontos.

Fotó: Benke Attila