

A TÖLGYPUSZTULÁS GENETIKAI SZERKEZETRE GYAKOROLT HATÁSA

Cseke Klára¹, Jobb Szilvia², Koltay András³ és Borovics Attila¹

¹ NAIK Erdészeti Tudományos Intézet, Nemesítési Osztály

² Nyugat-magyarországi Egyetem, SEK-TTK, Biológiai Intézet

³ NAIK Erdészeti Tudományos Intézet, Erdővédelmi Osztály

Kivonat

Kutatásunk célja, egészséges és beteg egyedek alkotta részpopulációk genetikai szerkezetének összehasonlítása kocsányos- és kocsánytalan tölgyek esetében. A mintázás jelentős részben kizárja azon termőhelyi körülményekből fakadó tényezőket, amelyek szerepet játszhatnak az életképességbeli különbségekben. Ebből következően az egyes példányok betegségekkel szembeni ellenálló képességben megmutatózó genetikai különbségek kimutatására ad alkalmat a vizsgálat. A növényi minták genetikai elemzését 6 mikroszatellit (SSR) lokusz (ZAG1/5, ZAG96, ZAG110, ZAG9, ZAG11, ZAG112) (SSR) és 7 izoenzim lokusz (IDH_B, PGI_B, AAP_A, AAT_B, ADH_A, SKDH_A, PGM_B) vizsgálatával végeztük el. A részpopulációk genetikai diverzitását a lokuszonkénti allélszám, az effektív allélszám, Shannon diverzitási index, egyedi allélok száma, a várt- és tényleges heterozigócia, valamint az ezekből levezethető fixációs index alapján értékeltük. A kutatás egyik leginkább szembetűnő sajátága, hogy a kocsányos és kocsánytalan tölgyekre az izoenzim markerek vonatkozásában ellentétes tendenciájú eredményeket kaptunk. A kocsányos tölgy esetében a beteg, a kocsánytalan tölgy esetében pedig az egészséges részpopulációban találtunk allélszerkezetben kimutatható magasabb értékeket. Az allélszerkezettel hasonló összefüggést a heterozigócia értékekből levezethető fixációs index vonatkozásában sikerült igazolni. A mikroszatellit markerek esetében elsősorban az „egészséges” kocsányos tölgyek kiugróan magasabb allélikus változatossága figyelmet érdemlő. A vizsgált részpopulációk közötti genetikai távolság alapján a két tölgyfaj jól elkülöníthető csoportot alkot, amelyen belül az egészséges- és beteg egyedek alkotta részpopulációk szintén különválnak.

Kulcsszavak: kocsányos tölgy, kocsánytalan tölgy, tölgypusztulás, mikroszatellit analízis, izoenzim analízis, genetikai szerkezet

THE GENETIC PATTERN OF OAK DECLINE

Abstract

We have analysed the genetic pattern of oak decline through the comparison of subpopulations composed viable and declined trees growing close to each other on various stands. The applied sampling method excluded most of the site effects influencing viability. For the genetic investigation 6 nuclear microsatellite loci (ZAG1/5, ZAG96, ZAG110, ZAG9, ZAG11, ZAG112) and 7 isoenzyme loci (IDH_B, PGI_B, AAP_A, AAT_B, ADH_A, SKDH_A, PGM_B) were applied. The genetic diversity of the analysed subpopulations were evaluated by different indices, such as number of alleles, effective



number of alleles, Shannon diversity index, number of private allele, expected- and observed heterozygosity, fixation index. The different tendency of results regarding isoenzyme markers in case of pedunculate and sessile oaks was a conspicuous speciality of the study. Higher allele diversity was detected in the declined pedunculate oak subpopulation, while in case of the sessile oaks the viable subpopulation showed higher values. A very similar tendency could be revealed with the calculation of fixation index based on the heterozygosity values. In case of the microsatellite markers the outstanding allelic diversity of the viable pedunculate oak subpopulation was remarkable. Based on the genetic distance among the analysed subgroups the two oak species compose two distinct clusters, and also the viable and declined subpopulations separate within the two main clusters.

Keywords: pedunculate oak, sessile oak, oak decline, microsatellite analysis, isoenzyme analysis, genetic structure

BEVEZETÉS

A tölgypusztulás fogalma a magyar erdészeti szakirodalomban először az 1800-as évek végén jelent meg. A kezdeti irodalmi adatok elsősorban a kocsányos tölgy (*Quercus robur* L.) kisebb-nagyobb területre kiterjedő elhalásáról tanúskodtak (Igmándy és mtsai 1984). A Maros két partján lévő állományok tömeges pusztulását figyelték meg elsőként (Rochel 1877), ezt követően 1910–15 és 1962–66 között lépett még fel, jelentős kocsányos tölgy elhalás hazánkban (Varga 1980). A kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea* (Mattuschka) Lieblein) pusztulásáról a XIX. századból nincsenek irodalmi adatok, az 1978-as évet tekintik az első magyarországi felbukkanás időpontjának (Igmándy és mtsai 1986).

Hazánkban az 1970-es évek végén kezdődő tölgypusztulást gyors ütemű és nagy kiterjedésű elhalás jellemezte, ami kocsányos- és kocsánytalan tölgy állományokat egyaránt érintett. A témával foglalkozó kutatók elsősorban a kocsánytalan tölgy populációk vizsgálatára koncentráltak. Az adott területek állapotfelmérései (Igmándy és mtsai 1986) alapján megállapították, hogy a tölgypusztulás keletről indult az ország nyugati, dél-nyugati részei felé, legnagyobb mértékben az Északi-középhegység tölgyerdei váltak érintetté.

A pusztulás feltételezett okait feltáró kutatások kezdetben egy-egy biotikus, vagy abiotikus tényezőre összpontosítottak, de nem sikerült bizonyítani egyiknek sem a kizárólagos, döntő jelentőségét. A nemzetközi és a hazai vizsgálatok alapján végül arra a következtetésre jutottak, hogy a tölgypusztulás egy soktényezős leromlásos megbetegedés, amelynek következtében a fák abiotikus hatásokra legyengülnek és végül biotikus stresszhatások következtében fellépő fertőzések áldozataivá válnak (Bohár 1995; Standovár és Somogyi 1998).

Az abiotikus tényezők közül elsősorban az aszály hatását sikerült bizonyítani. Berki (1995) a csapadékhiányos évek során fellépő talajszárazságot és ennek következményeként a fákban kialakuló N hiányt tartotta a betegség egyik fő okának.

Fentieket támasztják alá Csóka és mtsai (2007) által végzett erdőmonitoring vizsgálatok. 1983-tól szolgáltatott adatokat a kocsánytalan tölgy állományokban található egészséges egyedek arányáról, illetve a mortalitásról. A rendelkezésre álló adatok alapján megállapították, hogy a kocsánytalan tölgyesek 2–3 egymást követő erősen aszályos év után mutatnak egészségi állapotromlást, a hatások pedig gyakran 1–3 év eltolódással kárláncolatokon keresztül jelentkeznek.

Mindemellett a kutatók többsége a biotikus tényezőket is a leromlási folyamat szerves részeinek tekintették, nélküliük valószínűleg gyakran nem történt volna meg a fa egyedek pusztulása (Vajna 1998).

A lehetséges okok feltárásában tehát elsősorban a külső tényezőkre (kórokozók, kártevők, abiotikus stressz) koncentráltak és kevés figyelmet szenteltek magára a tölgyre.

A molekuláris genetikai vizsgálatok során mind az izoenzimiek, mind a DNS alapú AFLP és SSR markerek alkalmazása során kimutatható a kocsányos és kocsánytalan tölgy csoportok részleges elkülönülése, legalább bizonyos allélok gyakoriságértékeiben tapasztalható eltérés szintjén (Hertel és Degen 2000; Gömörly 2000; Gömörly és mtsai 2001; Mariette és mtsai 2002; Coart és mtsai 2002; Curtu és mtsai 2006).

A tölgypusztulás genetikai hátteréről azonban kevés információ áll rendelkezésre. Az első, hasonló koncepcióra épülő vizsgálat Müller-Starck (1985) nevéhez fűződik, aki a bükk (*Fagus sylvatica* L.) általános leromlással járó tünet együttesének genetikai hátterét vizsgálta egy bajorországi idős állományban, toleráns és érzékeny egyedekből képzett csoportok összehasonlításával. Az alkalmazott izoenzim lokuszok tekintetében egy általános diverzitásbeli különbség volt megfigyelhető a toleráns egyedek javára több diverzitási mutató tekintetében is (az allélok valamint genotípusok száma, a heterozigóták aránya és a többlokuszos diverzitás értékek). A több izoenzim lokusz esetében is megfigyelt szignifikáns eltérés a szerző szerint utalhatott a jelenség összetett jellegére. A tölgy fajok esetében egyetlen hasonló tanulmány készült (Sander és Franke 1999). A vizsgálat Németország Baden-Württemberg tartományának 10 kocsányos és kocsánytalan tölgy állományának mintázásával készült, izoenzim markerek alkalmazásával. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a kocsánytalan tölgy egyedeket szignifikánsan kisebb mértékben érintette a tünetegyüttes, mint a kocsányos tölgyeket. Ezen túl, az érzékeny és ellenálló részpopulációk között is egyértelmű különbség volt kimutatható a genetikai diverzitás tekintetében, ahol a toleráns csoport magasabb diverzitási paraméterekkel rendelkezett. Sajnos az első hazai kezdeményezésére (Keresztesi 1990) tervezett izoenzim alapú genetikai vizsgálatok nem valósultak meg.

Kutatásunk alapjául az a felvetés szolgált, hogy a betegség lefolyása és végső kimenetele függ a stressztényezőkkel szembeni alkalmazkodó- és védekezőképességtől. Ennek alátámasztására a tölgypusztulás következtében megbetegedett, illetve egészséges tölgyek képezte csoportok genetikai diverzitás vizsgálatát végeztük. Kutatásunk központi kérdése, hogy a tölgypusztulással szemben az ellenállóbbnak tűnő („egészséges”) egyedek képezte részpopuláció genetikai szerkezete eltér-e a fogékonyabb („beteg”) egyedek képezte részpopulációjától?

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintagyűjtés

A vizsgálatok alapkonceptiója egymás közvetlen közelében elhelyezkedő, egészséges és beteg tölgy egyedpárok képezte részpopulációk genetikai struktúrájának összehasonlítása volt. A mintafák kiválasztása és minősítése az ERTI által korábban alkalmazott ötfokozatú egészségi skála alapján történt (Csóka 1992). Az általunk vizsgált egészséges mintafák valamennyi esetben a teljesen egészséges 5. osztályba tartoztak. A beteg fák esetében olyan egyedek kerültek kiválasztásra, melyek az előzetes vizsgálatok szerint, már évek óta a 3/4 (beteg, a pusztulás tüneteit mutató fa) vagy 3/2 (erősen beteg, de még élő fa) kategóriába tartoztak. Ezek mellett a beteg csoportba kettes minősítésű, azaz a mintagyűjtés évében elpusztult tölgyek is kerültek.

Az egyedpárok kijelölésénél elsődleges szempontként szerepelt, hogy a vizsgálatba vont fák a lehető legközelebb helyezkedjenek el egymáshoz, így csökkentve az ökológiai tényezőkből származó különbségeket. Elsőként a beteg egyedek kerültek kijelölésre, majd az ehhez legközelebbi (1–2 fmagasság távolság) egészséges fa. Ezek egymástól való átlagos távolsága 20–25 m között változott, amely érték függött az állomány korától és az erdőrészletben álló fák számától.

A mintagyűjtés Magyarország különböző 7 tájegység 9 településének körzetében (1. táblázat), kocsányos- és kocsánytalan tölgy állományokban (két állomány esetében a két faj elegyesen fordult elő). Összesen 226 (113 egészséges és 113 beteg) fáról történt téli rügyek gyűjtése a genetikai vizsgálatokhoz.

1. táblázat: Vizsgált egyedek száma helyszínenként és fajonként

Table 1: The number of examined samples in the different populations of pedunculate and sessile oaks

Település	Mintaszám	
	Kocsányos tölgy (KST)	Kocsánytalan tölgy (KTT)
Bejcggyertyános (Kemeneshát)	40	–
Szenta (Belső Somogy)	10	–
Kaszó (Belső Somogy)	6	–
Buják (Cserhát)	36	22
Gyöngyössolymos (Mátra)	12	20
Szentendre (Pilis)	–	20
Dunaszentmiklós (Gerecse)	–	14
Nyergesújfalú (Gerecse)	–	34
Bajánsenye (Őrség)	–	12
Összesen:	104	122

Genetikai vizsgálat

Mikroszatellit analízis

A DNS kivonáshoz fagyaszttva tárolt téli rügyek fiatal levélszövetét használtunk, amelyet folyékony nitrogénnel lehűtve, mozsárban porrá őröltünk. Az így feltárt növényi mintából a Qiagen Plant Mini Kit segítségével végeztük a DNS extrakciót. A kinyert DNS koncentrációját agaróz gélelektroforézis (0,5%-os) során ellenőriztük. A PCR reakcióval a következő mikroszatellit markereket amplifikáltuk (zárójelben az F primer 5' végén található fluoreszcens jelölés látható): ZAG 1/5 (6-FAM), ZAG 9 (6-FAM), ZAG 110 (HEX) (Steinkellner és mtsai 1997), ZAG 11 (TET), ZAG 96 (TET), ZAG 112 (HEX) (Kampfer és mtsai 1998).

A PCR mastermix az irodalmi utalás alapján, illetve optimalizálás után az alábbi receptúra szerint készült: a 15 µl végtérfogatban 5x Puffer (PromegaGoTaq Flexi) 4 µl; MgCl₂ ZAG 1/5 és ZAG 9 markereknél 1 mM (0,6 µl), többinél 2 mM (1,2 µl); Primer F, R egyenként ZAG 9-nél 0,25 pM (0,375 µl), ZAG 1/5-nél 0,75 pM (1,125 µl), többinél 0,34 pM (0,5 µl); dNTPmix (Promega 10 mM) 0,4 µl; Polymeráz (PromegaGoTaq Flexi) 0,4U; DNS-minta 1 µl (kb. 10 ng/µl). A PCR reakcióhoz Eppendorf Mastercycler Gradient készüléket használtunk a következő programozással: ZAG 1/5 és ZAG 9 kezdő denaturáció 95 °C 15 min, denaturáció 95 °C 50 sec, primer bekötődés 55 °C (ZAG 9 65 °C) 50 sec, lánchosszabbítás 72 °C 1 min 45 sec, előző három lépés ismétlése 35-ször, végső lánchosszabbítás 72 °C 10 min. További négy marker esetében kezdő denaturáció 95 °C 15 min, denaturáció 95 °C 30 sec, primer bekötődés 50 °C 30 sec, lánchosszabbítás 65 °C 1 min 30 sec, előző három lépés ismétlése 30-szor, végső lánchosszabbítás 65 °C 15 min.

Az amplifikáció sikerességét agaróz (1,75%) gélelektroforézis (120 V, 20 min) során ellenőriztük. Az UV fényen előhívott futtatási képet digitálisan fotóztuk a fragmentumok koncentrációjának becsléséhez, illetve a későbbi vizsgálathoz szükséges hígítás megállapításához.

A mikroszatellit fragmentumok pontos méretének meghatározása (fragmentanalízis) ABI Prism 310-es genetikai analizátorral történt. A 6-FAM, TET, HEX jelöléssel ellátott fragmentumokat multiplex futtatásban analizáltuk. A futtatáshoz C-mátrixot használtunk TAMRA belső méretstandarddal. A fragmentumhosszak lekódolását a GeneMapper szoftverrel végeztük.

Izoenzim analízis

Az izoenzim extrakció fagyasztva tárolt, téli rügmintákból történt, hűtött körülmények között. Az enzim extrakcióhoz kb. 5–6 darab, normál méretű rügy került feldolgozásra mintánként, amely során a rügypikkelyeket szikével eltávolítottuk, a levélkezdeményeket letisztítottuk, majd merkapto-etanol alapú extrakciós pufferrel homogenizáltuk. A különböző növényi enzimeket tartalmazó fehérje extraktumot filterpapírokkal felszívva, fagyasztva tároltuk a vizsgálat következő lépéséig. A fennmaradó rügyek, az esetleges további felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztásra kerültek. Az enzimek elválasztása keményítő gélelektroforézissel zajlott. A futtatások, az enzimek aktivitását megőrizve hűtött körülmények között zajlottak. A szeparáció egyfelől méret (és szerkezet) szerint történt. Ehhez három különböző pórusszerkezetű gélt alkalmaztunk, amelyek a megfelelő pH értékű pufferrendszerrel kombinálva, a vizsgálni kívánt enzimszerek szempontjából optimális futtatókörzetet jelentettek. Az előhívás a szeparáció második lépcsőfoka, amikor a gélben megtalálható enzimszerek közül egy, az adott enzim tevékenységére specifikus reakció lejátszásával, illetve a reakciótermék megfestésével, megjelenítjük a gélben különböző helyen elhelyezkedő enzimvariánsokat. Az inkubálás után előhívott mintázatot fénypadon átvilágítottuk és a kódoláshoz fotóztuk. A vizsgált enzimszerek elválasztásához alkalmazott reakciókörülmények a Müller-Starck és Ziehe (1991) által publikált protokoll-leírásban találhatóak meg.

Az izoenzim vizsgálatban az alábbi enzimszerek szerepeltek (zárójelben a név rövidítése és a nemzetközi Enzim Bizottság által bevezetett EC kód):

- Alaninaminopeptidáz (AAP/ EC 3.4.11.1)
- Aszpartát-amino-transzferáz (AAT/ EC 2.6.1.1)
- Glutamátdehidrogenáz (GDH/ EC 1.4.1.2)
- Izocitrátdehidrogenáz (IDH/ EC 1.1.1.42)
- Foszfoglükó-izomeráz (PGI/ EC 5.3.1.9)
- Foszfoglükomutáz (PGM/ EC 2.7.5.1)
- Sikimát-dehidrogenáz (SKDH/ EC 1.1.1.25)

A különböző enzimszerek izoenzim mintázatának genotípus kódolása Müller-Starck és Ziehe (1991) által közölt módon történt.

Statisztikai értékelés

A fragmentanalízis során nyert nyers mikroszatellit-hossz adatsort és a zimogramok értékelésével kapott izoenzim genotípusokat további statisztikai eljárásokkal elemeztük. Az elemzéseket a GenAIEx 6.4 (Peakall és Smouse 2006) populációgenetikai szoftvert segítségével készítettük. A genetikai elemzés során a következő mutatókat vizsgáltuk:

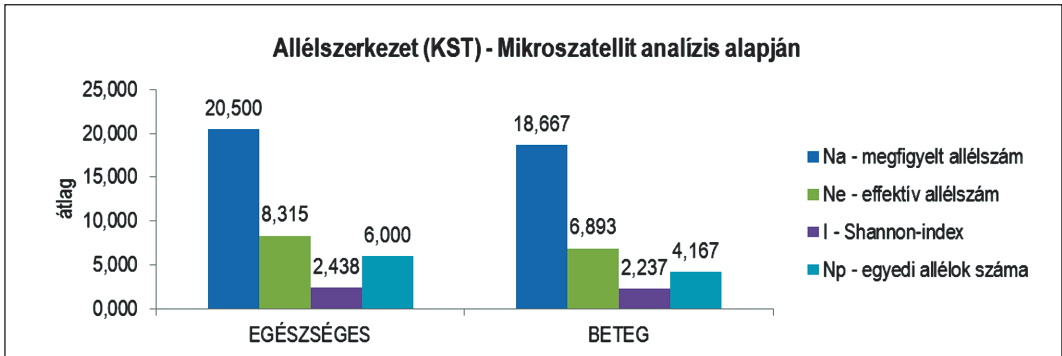
- N_a : allélok lokuszonkénti száma;
- N_e : effektív allélszám = $1 / (\sum p_i^2)$;
- I : Shannon diverzitási index = $-\sum p_i \ln p_i$;
- N_p : egyedi allélok száma
- H_e : számított heterozigócia = $1 - \sum p_i^2$ (értéke 0-1);
- H_o : megfigyelt heterozigócia = heterozigóták száma/mintaszám (értéke 0-1);
- F fixációs index = $(H_e - H_o)/H_e$ (heterozigóta hiány, vagy többlet a H-W egyensúlyi állapothoz képest)

A részpopulációk egymáshoz viszonyított genetikai távolságát Nei (1972) alapján számítottuk. A csoportok közötti genetikai kapcsolatot dendrogram szerkesztés segítségével ábrázoltuk, amelyhez az UPGMA (Sneath és Sokal 1973) eljárást alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

Kocsányos tölgyek

Kocsányos tölgy egyedpárok kijelölése és minták begyűjtése 5 település községhatárában található erdőállományból történt (1. táblázat). 52 egészséges-beteg fapárból képeztünk két részpopulációt, amelyek allélikus diverzitását és heterozigócia értékeit elemeztük. A vizsgált hat mikroszatellit lokusz átlagos allélszáma (N_a), az effektív allélszám (N_e), valamint a belőlük levezethető diverzitási paraméterek (Shannon index I , egyedi allélok száma N_p) is az „egészséges” részpopulációban voltak határozottan magasabbak (1. ábra).

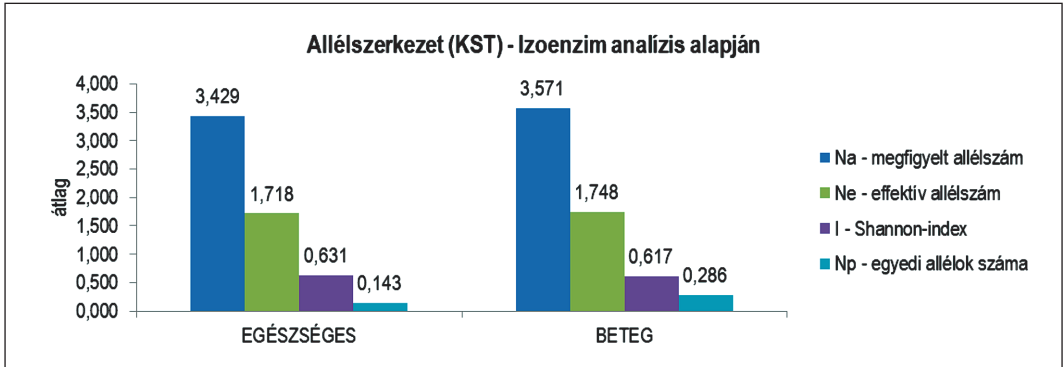


1. ábra: Egészséges- és beteg kocsányos tölgyek allélszerkezete (Mikroszatellit analízis – 6 lokusz átlaga)
 Figure 1: Allelic patterns across the viable- and declined pedunculate oak subpopulations
 (Microsatellite analysis – mean of 6 loci)

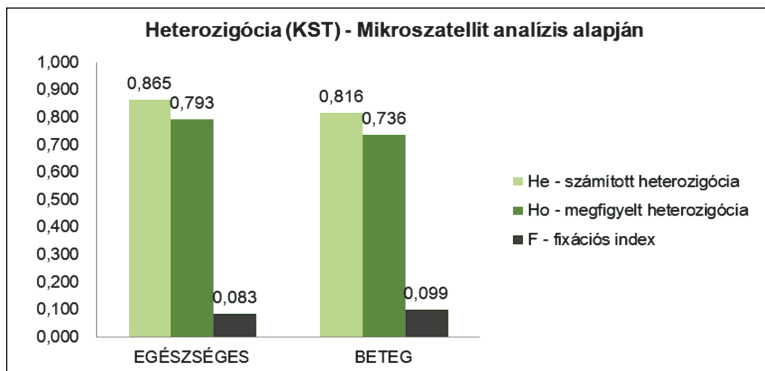
A megvizsgált 7 enzimrendszer együttes értékelése alapján, az előző markertípushoz képest ellentétes tendenciát mutatva, az átlagos allélszám (N_a) és az effektív allélszám (N_e), és a belőlük levezetett diverzitási paraméterek, ha kis mértékben is, de a „beteg” részpopulációban voltak magasabb értékűek (2. ábra).

A heterozigóták részarányának megállapításához, az allélszerkezetből számított (H_p) és a részpopulációkban ténylegesen megfigyelt heterozigócia (H_o) értéket, továbbá a heterozigóták Hardy-Weinberg egyensúlyi populációhoz képest kimutatható esetleges hiányát, vagy többletét jelző fixációs indexet (F) értékeltük. A 6 mikroszatellit génhely együttes elemzésével nyert eredmények alapján megállapítható, hogy mindkét heterozigócia érték tekintetében megfigyelhető az „egészséges” egyedek képezte részpopuláció esetében a magasabb érték (3. ábra). Ugyanakkor elmondható, hogy a kocsányos tölgyek heterozigócia értékei mindkét csoportban kiugróan magasak a mikroszatellit markerek tekintetében. A fixációs index kis mértékben tér el pozitív érték felé a nullával jelzett egyensúlyi állapothoz képest, amely a heterozigóták ellen ható enyhe szelekciós folyamatot jelezhet az egészséges és beteg részpopulációkban.

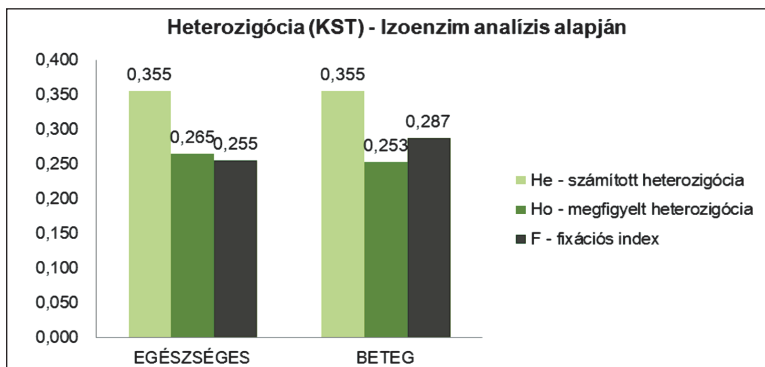
A 7 izoenzim génhely együttes vizsgálata alapján megállapítható, hogy a számított heterozigócia a „egészséges-beteg” részpopulációk esetében azonos, míg a megfigyelt heterozigócia érték az „egészséges” csoportnál kis mértékben magasabb (4. ábra). A mikroszatellit vizsgálatokhoz hasonlóan, jelen esetben is a fixációs index pozitív érték felé tolódik el az egyensúlyi állapothoz képest, bár ez esetben lényegesen nagyobb mértékű heterozigóta hiányra utaló értékeket kaptunk mindkét csoportban. A beteg egyedek képezte részpopuláció esetében magasabb fixációs index a heterozigóták nagyobb hiányára utal.



2. ábra: Egészséges- és beteg kocsányos tölgyek allélszerkezete (Izoenzim analízis – 7 lokusz átlaga)
 Figure 2: Allelic patterns across the viable- and declined pedunculate oak subpopulations
 (Isoenzym analysis – mean of 7 loci)



3. ábra: Egészséges- és beteg kocsánytalan tölgyek számított- és tényleges heterozigócia értékei, valamint a fixációs indexe
 (Mikroszatellit analízis – 6 lokusz átlaga)
 Figure 3: Expected- and observed heterozygosity, and fixation index across the viable- and declined sessile oak groups
 (Microsatellite analysis – mean of 6 loci)

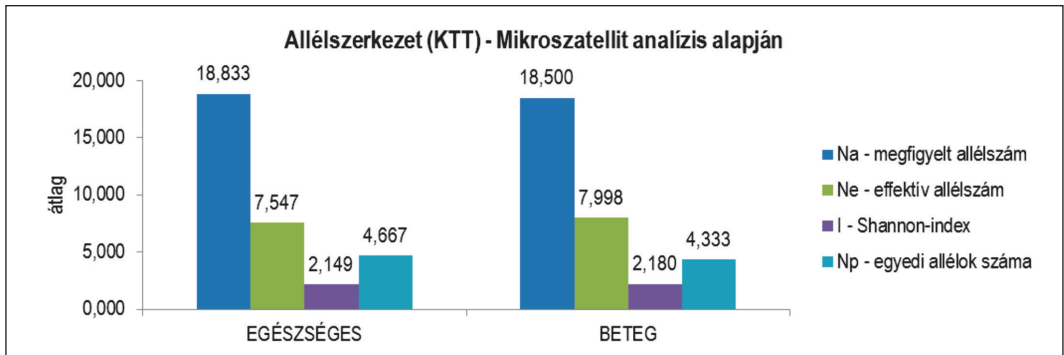


4. ábra: Egészséges- és beteg kocsányos tölgyek számított- és tényleges heterozigócia értékei, valamint a fixációs index
 (Izoenzim analízis – 7 lokusz átlaga)
 Figure 4: Expected- and observed heterozygosity, and fixation index across the viable- and declined pedunculate oak groups
 (Isoenzym analysis – mean of 7 loci)

Kocsánytalan tölgyek

Kocsánytalan tölgy egyedpárok kijelölése és minták begyűjtése 6 település községhatárában található erdőállományból történt (1. táblázat). 61 „egészséges-beteg” fapárból képeztünk két részpopulációt, amelyek allélikus diverzitását és heterozigócia értékeit elemeztük.

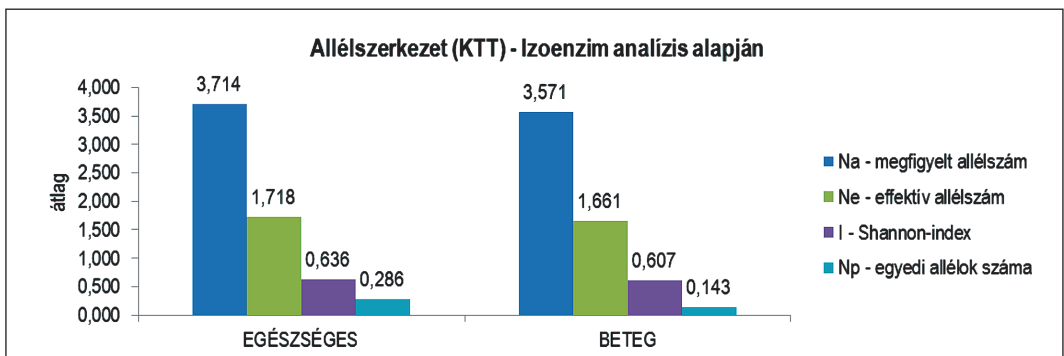
A vizsgált hat mikroszatellit lokusz átlagos allélszáma (N_a), az effektív allélszáma (N_e), valamint a belőlük levezethető diverzitási paraméterek elemzése alapján megállapítható, hogy a kocsányos tölgyhöz képest sokkal hasonlóbb a „beteg-egészséges” részpopulációk allélszerkezete. Lényeges és tendenciát is jelentő allélszerkezetben megmutatkozó eltéréseket a beteg-egészséges részpopulációknál nem mutatható ki a mikroszatellit markerezési eljárással (5. ábra).



5. ábra: Egészséges- és beteg kocsánytalan tölgyek allélszerkezete (Mikroszatellit analízis – 6 lokusz átlaga)
Figure 5: Allelic patterns across the viable- and declined sessile oak groups (Microsatellite analysis – mean of 6 loci)

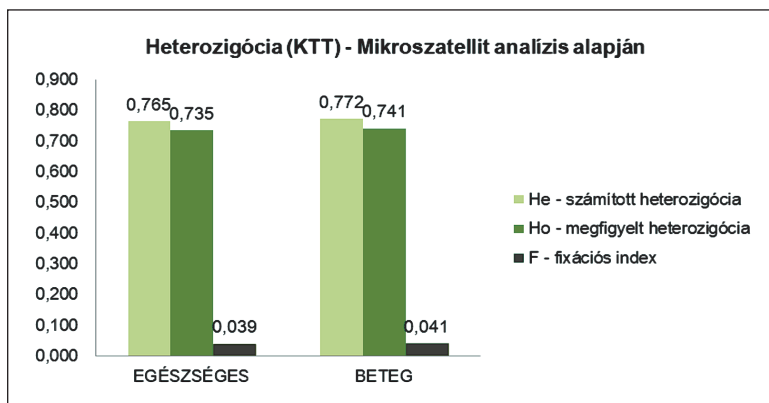
A vizsgált 7 izoenzim génhely együttes értékelése alapján az átlagos allélszám (N_a) és az effektív allélszám (N_e), valamint a belőlük levezetett diverzitási paraméterek, ha kis mértékben is, de az egészséges részpopulációban voltak magasabbak (6. ábra). Ez az eredmény a kocsányos tölgyhöz képest éppen ellentétes tendenciát mutat.

A kocsánytalan tölgyek szintén összevetettük a két eltérő markerezési eljárással az egészséges-beteg részpopuláció számított és megfigyelt heterozigócia értékeit, valamint az ezekből származtatott fixációs indexet (7. és a 8. ábra). A mikroszatellit elemzések alapján kapott heterozigócia értékek viszonylag magasnak bi-



6. ábra: Egészséges- és beteg kocsánytalan tölgyek allélszerkezete (Izoenzim analízis – 7 lokusz átlaga)
Figure 6: Allelic patterns across the viable- and declined sessile oak groups (Isoenzyme analysis – mean of 7 loci)

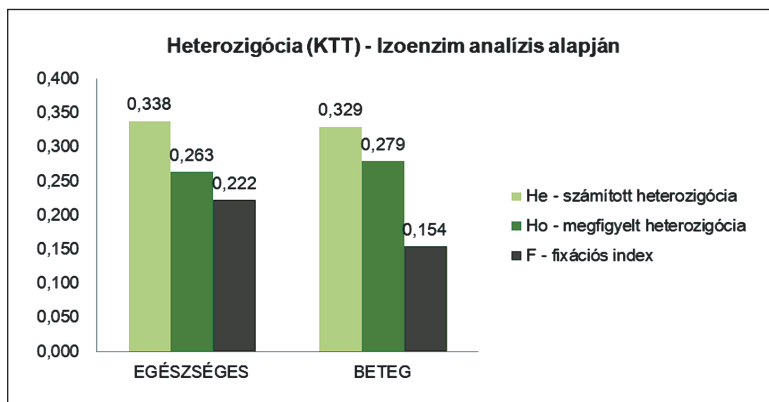
zonyultak (7. ábra), bár a kocsányos tölgy csoportok értékeitől elmaradnak. Az egészséges és beteg részpopulációkban kapott adatok nagyon hasonlóak, kiegyenlítettek, kis különbséggel jellemezhetőek. A megfigyelt- és számított heterozigócia érték mindkét csoportban közel azonos mértékű, ami egyensúlyra utal a vizsgált részpopulációkban. A fixációs index ennek megfelelően 0 körüli értékeket vesz fel, vagyis a heterozigótákkal szemben ezen markertípus esetében nem figyelhető meg jelentős szelekciós nyomás.



7. ábra: Egészséges- és beteg kocsánytalan tölgyek számított- és tényleges heterozigócia értékei, valamint a fixációs indexe (Mikroszatellit analízis – 6 lokusz átlaga)

Figure 7: Expected- and observed heterozygosity, and fixation index across the viable- and declined sessile oak groups (Microsatellite analysis – mean of 6 loci)

Az izoenzim vizsgálatok során nyert értékek elemzése alapján megállapítható, hogy a számított heterozigócia érték az egészséges részpopulációban volt magasabb, míg a megfigyelt heterozigócia ezzel ellentétesen a beteg részpopulációban volt magasabb értékű (8. ábra). Ebből következően a fixációs index az egészséges részpopulációban jelentősen magasabb, vagyis ez esetben a heterozigóták ellen ható erősebb szelekció az egészséges részpopulációban volt tapasztalható, ellentétben a kocsányos tölgyeknél tapasztaltakkal az izoenzim génhelyek esetében. Ez utalhat a homozigóták javára zajló szelekciós folyamatra.

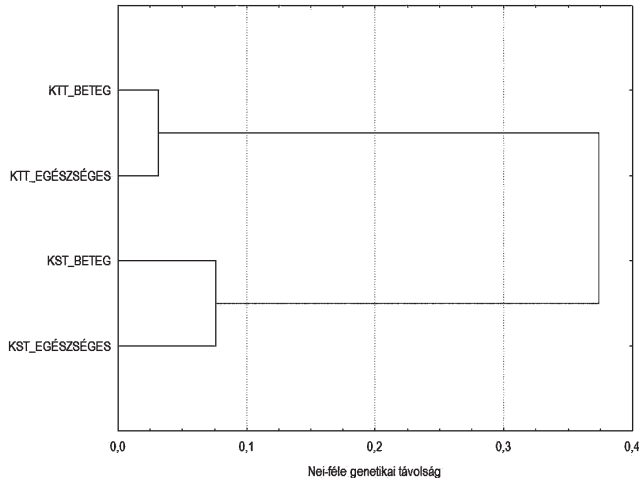


8. ábra: Egészséges- és beteg kocsánytalan tölgyek számított- és tényleges heterozigócia értékei, valamint a fixációs indexe (Izoenzim analízis – 7 lokusz átlaga)

Figure 8: Expected- and observed heterozygosity, and fixation index across the viable- and declined sessile oak groups (Isoenzyme analysis – mean of 7 loci)

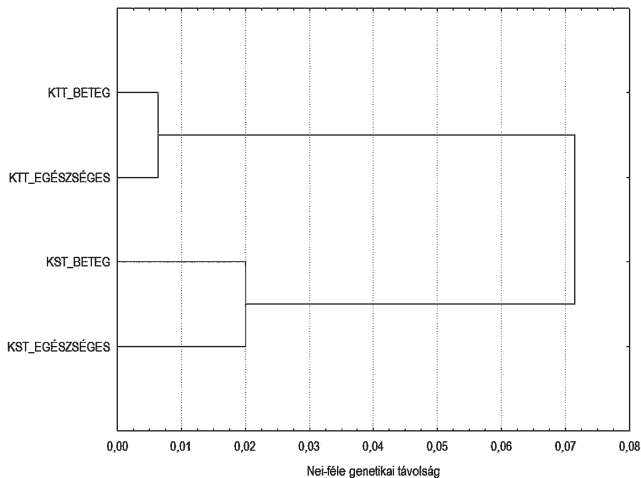
Kocsányos és kocsánytalan tölgy részpopulációk összehasonlítása

A vizsgált részpopulációk közötti genetikai kapcsolatot a Nei-féle genetikai távolság alapján UPGMA dendrogramon ábrázoltuk. A két alkalmazott markerezési eljárás alapján hasonló szerkezetű ábrát kaptunk (9. 10 ábrák), de az elkülönülés mértékében jelentős különbség mutatható ki. A nagy változatosságot mutató mikroszatellit génhelyek együttes vizsgálata alkalmasabb a csoportok szétválasztására, nagyobb genetikai távolság mutatható ki általa. Az ábrák jól mutatják, hogy sok génhely együttes vizsgálata alkalmas a két tölgy-faj elkülönítésére is.



9. ábra: Kocsányos és kocsánytalan tölgyek egészséges és beteg részpopulációinak genetikai elkülönülése a Nei-féle genetikai távolságuk alapján szerkesztett UPGMA-dendrogramon /Mikroszatellit analízis/

Figure 9: Genetic distance across viable and declined subpopulations of the pedunculate and sessile oak population based on the Nei's genetic distance (UPGMA dendrogram) / Microsatellite analysis /



10. ábra: Kocsányos és kocsánytalan tölgyek egészséges és beteg részpopulációinak genetikai elkülönülése a Nei-féle genetikai távolságuk alapján szerkesztett UPGMA-dendrogramon /Isoenzym analízis/

Figure 10: Genetic distance across viable and declined subpopulations of the pedunculate and sessile oak population based on the Nei's genetic distance (UPGMA dendrogram) / Isoenzyme analysis /

ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás során egészséges és beteg kocsányos- és kocsánytalan tölgyek képezte részpopulációk genetikai szerkezetét hasonlítottuk össze. A két faj, egészséges és beteg részpopulációjának kétféle genetikai markerezési eljárással kapott allélszerkezetben és a heterozigócia értékekben megmutatkozó genetikai jellemzői összesen 16-féle kombinációt eredményeztek, amelynek legfontosabb következtetéseit a 2. sz. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: Vizsgált részpopulációk legfontosabb populációgenetikai jellemzői
Table 2: The main population genetic characteristic of the investigated subpopulations

		Kocsányos tölgy		Kocsánytalan tölgy	
		egészséges	beteg	egészséges	beteg
Mikroszatellit	Allélszerkezet	+++			
	Heterozigócia	+			
Izoenzim	Allélszerkezet		+	+	
	Heterozigócia		+	++	

Magyarázat: a + száma jelzi a kapcsolat erősségét.

A táblázat egyik leginkább szembevetendő sajátága, hogy a két tölgyfaj esetében az izoenzim markerek vonatkozásában ellentétes tendenciájú eredményeket kaptunk. A mikroszatellit markerek esetében elsősorban az „egészséges” kocsányos tölgyek kiugróan magasabb allélikus változatossága figyelmet érdemlő. A mikroszatellit markerek véletlen mutációk által, jelentős genetikai változatosságot tudnak felhalmozni. Alkalmazkodási szempontból viszont ezeknek nincsen jelentősége. Semleges (neutrális) génhelyeknek számítanak, tehát inkább a véletlen, múltbéli eseményeket lehet vele értékelni. E vonatkozásban magyarázatot adhat az allélszerkezetben megnyilvánuló értékre, hogy a kocsányos tölgyeseink túlnyomó többsége ismeretlen eredetű és jellemzően kevert származású szaporítóanyagból létesült, ember által jelentősen befolyásolt „kultúrerdőknek” tekintendő, amely hozzájárulhatott a többféle variáns egyidejű jelenlétéhez. Az 5 helyszínen történő mintázás is hozzájárulhatott a változatos allélszerkezet kialakulásához. A heterozigócia vonatkozásában sokkal kiegyenlítettebb a mikroszatellit génhelyek szerkezete. A kocsányos tölgyek esetében szintén az egészséges részpopuláció mutatott enyhén magasabb értékeket, azonban a belőlük levezethető fixációs indexek mind a négy vizsgált esetben (fajonként és részpopulációnként) az egyensúlyihoz nagyon közeli, 0 értéket mutatták, amely az irányított szelekciós folyamatok hiányára utal. Ez megerősíti a mikroszatellit markerek neutrális jellegéről korábban elmondottakat.

Az izoenzim génhelyek esetében az elkülönülés sokkal alacsonyabb mértékű, amely abból következik, hogy ez esetben a teljes genom ténylegesen átíródó, fehérjéket kódoló régióit vizsgáljuk. Itt már érvényesülhet az egyes génváltozatokkal szembeni szelekció, egyes génhelyek eltérő alléljai között alkalmazkodásban megmutatkozó esetleges különbségek révén (Borovics és Mátyás 2013). Az allélszerkezetben a két faj vonatkozásában ellentétes irányú tendenciát tapasztaltunk. A kocsányos tölgy esetében a beteg, a kocsánytalan tölgy esetében pedig az egészséges részpopulációban találtunk allélszerkezetben magasabb értékeket. Ennek magyarázatát a két faj eltérő alkalmazkodási sajátágaiban kereshetjük, de érvényesülhet a kocsányos tölgyesek erősebb emberi hatásainak következménye is. Az allélszerkezettel hasonló tendenciát mutató összefüggést a heterozigócia értékekből levezethető fixációs index (heterozigócia hiány, egyensúlyi állapottól való eltérés mértéke) vonatkozásában is sikerült kimutatni. A kocsányos tölgy esetében a beteg részpopuláció esetében volt tapasztalható, igaz viszonylag kis különbséggel, nagyobb heterozigócia hiányra utaló magasabb fixációs érték,



addig a kocsánytalan tölgnél ezzel szemben az egészséges részpopuláció fixációs értéke a beteghez képest jelentősen magasabb volt, amely a heterozigóták nagyobb hiányára utal. Ez a homozigóta egyedek egyfajta többletét indikálja az egészséges részpopuláció vonatkozásában a kocsánytalan tölgy esetében. Ez összhangban van azzal az eredménnyel (Borovics és Mátyás 2013), amely szerint a kocsánytalan tölgyek számára kedvezőtlen körülmények között inkább az adott viszonyokhoz alkalmazkodott, elsősorban homozigóta állapotban jelen lévő allélváltozatok kerülnek túlsúlyba. Bár a mintázás során a fapárok kijelölésével igyekeztünk „kijteni” az ökológiai különbségeket, de az egyedek adott ökológiai viszonyokhoz történő eltérő reakcióival is számolnunk kell. Ezzel magyarázható az adott helyszínen „sikeres” és „kiszelektálódó” párok eltérő genetikai szerkezete.

A vizsgált részpopulációk közötti genetikai távolság alapján megállapítható, hogy a két alkalmazott markerezési eljárás alapján hasonló genetikai szerkezetet kaptunk, de az elkülönülés mértékében jelentős különbség volt kimutatható a mikroszatellit markerek javára. Ez a markertípus nagyobb változatosságával magyarázható. A két tölgyfaj jól elkülöníthető csoportot alkot, amelyen belül az egészséges- és beteg egyedek alkotta részpopulációk szintén különválnak, a kocsányos tölgy esetében nagyobb mértékben, azonban a genetikai elkülönülés ez esetben is alacsony szintűnek tekinthető.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez a tanulmány az Agrárklíma: az előrevetített klímaváltozás hatáselemzése és az alkalmazkodás lehetőségei az erdészeti és agrárszektorban című TÁMOP-4.2.2.A–11/1/KONV-2012-0013 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Berki I. 1995: Éghajlatunk változása és a hazai tölgypusztulás. In: Tar K.; Berki I. és Kiss Gy. (eds): Erdő és Klíma Konferencia. Noszvaj, 1994. 06. 01.–1994. 06. 03. KLTE, 217–221.
- Bohár Gy. 1995: Krónikus és akut stresszállapot, valamint a másodlagos károsítók és kórokozók szerepe a kocsányos- és kocsánytalan tölgy, valamint a cser pusztulásában. In: Tar K.; Berki I. és Kiss Gy. (eds): Erdő és Klíma Konferencia. Noszvaj, 1994.06.01.–1994.06.03. KLTE, 222–229.
- Borovics, A. and Mátyás, Cs. 2013: Decline of genetic diversity of sessile oak at the retracting (xeric) limits. *Annals of Forest Science*, 70: 835–844.
- Coart, E.; Lamote, V.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E.; Lootens, P. and Roldán-Ruiz, I. 2002: AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species [*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in Flemish populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 431–439.
- Curtu, A.L.; Gailing, O.; Leinemann, L. and Finkeldey, R. 2006: Genetic Variation and Differentiation Within a Natural Community of Five Oak Species (*Quercus* spp.). *Plant Biology* 9: 116–126.
- Csóka Gy. 1992: A hazai kocsánytalan-tölgy-pusztulás menete 1983-tól napjainkig. *Erdészeti Lapok*, 127: 313–314.
- Csóka Gy.; Koltay A.; Hirka A. és Janik G. 2007: Az aszályosság hatása kocsánytalan tölgyeseink és bükköseink egészségi állapotára. In: Mátyás Cs. és Vig P. (eds): Erdő és klíma V. kötet, Sopron, 229–239.
- Gömöry, D. 2000: Gene coding for a non-specific NAD-dependent dehydrogenase shows a strong differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *For. Genet.*, 7: 167–170.
- Gömöry, D.; Yakovlev, I.; Zhelev, P.; Jedináková, J. and Paule, L. 2001: Genetic differentiation of oak populations within the *Quercus robur/Quercus petraea* complex in central and eastern Europe. *Heredity*, 86: 557–563.
- Hertel, H. and Degen, B. 2000: Distinguishing indigenous pedunculata and sessile oak (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* [Mattuschka] Liebl.) using genetic and morphological traits. (Unterscheidung von Stiel- und Traubeneichen (*Quercus*

- robur* L. und *Quercus petraea* [Mattuschka] Liebl.) mit Hilfe von genetischen und morphologischen Merkmalen). Forest Snow and Landscape Research, 75(1/2): 169–183.
- Igmándy Z.; Béky A.; Pagony H.; Szontagh P. és Varga F. 1986: A kocsánytalan tölgypusztulás helyzete hazánkban 1985-ben. Az Erdő, 35: 255–259.
- Igmándy Z.; Pagony H.; Szontagh P. és Varga F. 1984: Beszámoló a kocsánytalan tölgyeseinkben fellépett pusztulásról 1978–1983. Az Erdő, 33: 334–341.
- Kampfer, S.; Lexer, C.; Glossl, J. and Steinkellner, H. 1998: Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. Hereditas, 129: 183–186.
- Keresztesi B. (ed) 1990: A tölgyek komplex genetikai, taxonómiai és rezisztencia élettani kutatása, különös tekintettel a nemesítésre és az erdőpusztulásra. OTKA Zárójelentés, Budapest.
- Mariette, S.; Cottrell, J.; Csaikl, U.M.; Goikoechea, P.; König, A.; Lowe, A.J.; van Dam, B.C.; Barreneche, T.; Bodenes, C.; Streiff, R.; Burg, K.; Groppe, K.; Munro, R.C.; Tabbener, H. and Kremer, A.. 2002: Comparison of levels of genetic diversity detected with AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. stands. Silvae Geneticae, 51: 72–79.
- Müller-Starck, G. 1985: Genetic Differences between „Tolerant” and „Sensitive” Beeches (*Fagus sylvatica* L.) in an Environmentally Stressed Adult Forest Stand. Silvae Genetica, 34 (6): 241–246.
- Müller-Starck, G. and Ziehe, M. 1991: Genetic variation in European populations of forest trees. Sauerländer's Verlag.
- Nei, M. 1972: Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283–292.
- 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.
- Rochel K. 1877: A csálai kincstári erdőgondnokság tölgyeseinek száradásáról. Erdészeti Lapok, 16: 553–556.
- Sander, T. und Franke, A. 1999: Genetischer Vergleich geschädigter und nicht geschädigter Stiel- und Traubeneichenbestände (*Quercus robur* L. und *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.) in Baden- Württemberg unter besonderer Berücksichtigung von Standort, Bestandesaufbau, bisheriger Bestandesbehandlung und anthropogenen Umweltbelastungen. Projektträgerschaft. Programm Lebensgrundlage. Freiburg
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973: Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 230–234.
- Standovár, T. and Somogyi, Z. 1998: Corresponding patterns of site quality, decline and tree growth in a sessile oak stand. European Journal of Forest Pathology, 28: 133–144.
- Steinkellner, H.; Fluch, S.; Turetschek, E.; Lexer, C.; Steiff, R.; Kremer, A.; Burg, K. and Glossl, J. 1997: Identification and characterization of (GA/CT)_n microsatellite loci from *Quercus petraea*. Plant Molecular Biology, 33: 1093–1096.
- Vajna L. 1998: A fák nemspezifikus betegségek okozta elhalása erdei és gyümölcsös ökoszisztémában. Növényvédelem, 34 (5): 229–241.
- Varga F. 1980: A tölgypusztulás Magyarországon. Erdészeti és Faipari Egyetem Tudományos Közleményei, 2: 11–17.

Érkezett: 2012. április 13.

Közlésre elfogadva: 2014. október 6.



Téli jégkár

Nem túl gyakori kárforma, mivel kialakulásához különleges időjárási körülmények szükségesek. Ugyanakkor „csapongó” téli időjárás esetén, például a Börzsönyben, rendszeresen előfordul. A jéglerakódás abban az esetben jön létre, ha erős, száraz hideget követően enyhe nedves légtömegek érkeznek, és a túlhűlt felületre hulló eső ráfagy a tárgyakra, így az ágakra is. Az erős terhelés miatt az ágak, koronák, extrém esetben a törzsek is eltörhetnek.

Fotó és szöveg: Koltay András (NAIK ERTI, Mátrafüred)