

A dunántúli fehér és rezgő nyár állományok populációgenetikai vizsgálatának előzetes eredményei

Benke Attila, Cseke Klára, Borovics Attila
Erdészeti Tudományos Intézet, Sárvári Kísérleti Állomás

Összefoglaló

2006-2008 folyamán összesen 681 fehér, rezgő és szürke nyár mintafát jelöltünk ki a Dunántúl középső és déli területein található populációkban, melyekről molekuláris genetikai vizsgálatokhoz levélmintát gyűjtöttünk. Az ERTI Sárvári Genetikai Laboratóriumában 126 minta bevonásával kéttípusú vizsgálatot végeztünk: egy, a kloroplaszt DNS vizsgálatára alkalmas módszerrel (PCR-RFLP) a kizárólag anyai úton öröklődő genom haplotípusainak eloszlását, egy, a sejtmagi DNS vizsgálatára alkalmas módszerrel (RAPD) pedig a fajok populációk közötti, illetve azon belüli változatosságát mértük fel.

Kulcsszavak

Fehér nyár, rezgő nyár, szürke nyár, populációgenetika, kloroplaszt DNS, sejtmagi DNS, haplotípus.

Abstract

Population genetic study of *Populus* species belonging to the Leuce section (*P. alba* - white poplar, *P. tremula* - european aspen, *P. × canescens* - grey poplar) was initiated using different molecular marker technics. During the period of 2006-2008 a total of 681 tree were mapped and leaf material was collected from eight geografically distinct provenances through the Transdanubia. A preliminary investigation was carried out with 126 samples selected from the eight sites applying two different marker technics. Based on the maternally inherited chloroplast DNA markers (PCR-RFLP) the haplotypic composition and the origin of the populations were analysed. Additionally nuclear DNA markers (RAPD) were applied for the purpose of testing the genetic variability between and within the different populations.

Keywords

white poplar, european aspen, grey poplar, population genetics, chloroplast DNA markers, nuclear DNA markers, haplotype.

Bevezetés

A hazai nyárak genetikai változatosságának felmérésében hazánkban Bartha Dénes végzett úttörő jellegű munkát (Bartha et Bordács, 1990). 5 magyarországi természetes eredetű fehér nyár állományból gyűjtött minták felhasználásával izoenzim (észteráz és peroxidáz) vizsgálatokat végzett, melynek eredményeképpen magas fokú heterozigóciát állapított meg az egyes állományokon belül.

Célunk volt ezen kutatás kibővítése mind faj (szürke és rezgő nyár), mind vizsgálati módszer (PCR-RFLP, RAPD vizsgálatok), mind populációk terén. Ennek érdekében 2006-2008 folyamán 7 dél-dunántúli természetes eredetű fehér és rezgő nyár populációból gyűjtöttünk összesen 681 mintát. További célunk a mintagyűjtések és vizsgálatok folytatása a közép- és észak-dunántúli állományok mintáinak bevonásával.

Anyag és módszer

A terepi mintavételek alkalmával nagy figyelmet fordítottunk arra, hogy a két alapfaj fontosabb elterjedési területeit, valamint ezen területek átfedési zónáit lehetőség szerint minél jobban érintsük. A mintafa-kijelölés során elsősorban természetes eredetű közép- és idős populációkat, egyedeket kerestünk, részben azért, hiszen ivarérettségük folytán ezen egyedek jelenleg aktívan részt vesznek a populációk közötti, illetve azokon belüli génáramlásban, másrészt további mintagyűjtés szükségessége esetén visszakereshetők. A kijelölések alkalmával levélmintát gyűjtöttünk a kiválasztott egyedekről mind a genetikai, mind a későbbi levélmorfológiai vizsgálatokhoz (utóbbiak esetében rövid és hosszúhajtás leveleket egyaránt), rögzítettük a fák elhelyezkedését, valamint a valamilyen okból kifolyólag érdekesebb egyedekről írásos és fényképes dokumentációt is készítettünk. A genetikai vizsgálatokra szánt leveleket hűtve szállítottuk, majd Sárváron – 72^oC-on tároltuk.

A molekuláris markerezési eljárások menete:

A DNS-extraktumokat a fagyasztva tárolt levélszövetből állítottuk elő, majd a kivonást követően a vizsgálatok egységességének elérése céljából megmértük azok koncentrációját.

A RAPD (Random Amplified Polimorph DNA) vizsgálatokhoz (sejtmagi DNS) az OPERON cég (Törjék *et al.*, 2000) által kifejlesztett primereket, illetve egyéb, az irodalomban előforduló RAPD primereket (Heinze, 1998) használtunk, számszerint húszat. A vizsgálat alkalmával az egyes DNS szakaszok felszaporítása PCR-készülékben történik, majd az így nyert fragmenseket agaróz gélelektroforézissel választjuk szét. A minták detektálása etidium-bromidos festés után, UV fényen történik. Az UV fényel megvilágított gélekről készített felvételeket speciális, az egyes DNS

szakaszok elhelyezkedését, ezáltal azok hosszát megállapítani képes program segítségével értékeljük.

A kloroplaszt-DNS alapú vizsgálat annyiban különbözik az előzőtől, hogy a DNS szakaszok felszaporítása során alkalmazott primer szekvenciák kloroplaszt DNS specifikusak, azaz, csak a szintestek saját örökítőanyagának egyes szakaszaihoz kapcsolnak, tehát csak azokat sokszorozzák meg. Ugyanakkor PCR reakció során kapott szekvenciákat speciális emésztő enzimekkel „daraboljuk”, a vizsgálat felbontóképességének növelése céljából. A vizsgálat során négy féle PCR-primer/restrikciós endonukleáz kombináció (Lexer *et al.*, 2005) kerül felhasználásra. Az amplifikáció, illetve enzimes emésztés után kinyert fragmensek kombinációi úgynevezett haplotípusokat eredményeznek. A vizsgálatokat Lexer *et al.* (2005) által használt protokoll alapján végezzük. A DNS szakaszok elválasztása, és detektálása a korábban ismertetett eljárás szerint történik.

Az adatok statisztikai értékelése:

Az RAPD mintázatok értékeléshez a GenAlex 6.1 statisztikai szoftvercsomagot használjuk fel.

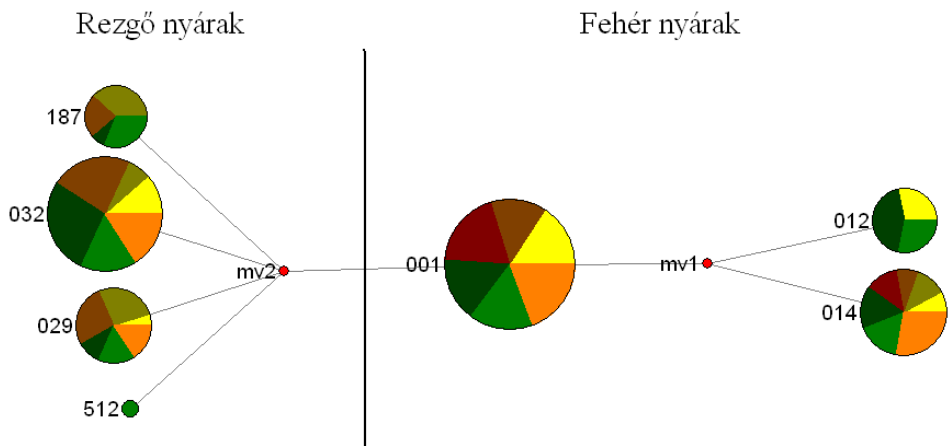
A kloroplaszt haplotípusok értékelése az Arlequin (Schneider *et al.* 2000) populációgenetikai szoftvert segítségével történik. A haplotípusok közötti kapcsolatrendszer az ún. median-joining (MJ) network (Bandelt *et al.* 1999) készítésével tárjuk fel.

Eredmények és megvitatásuk

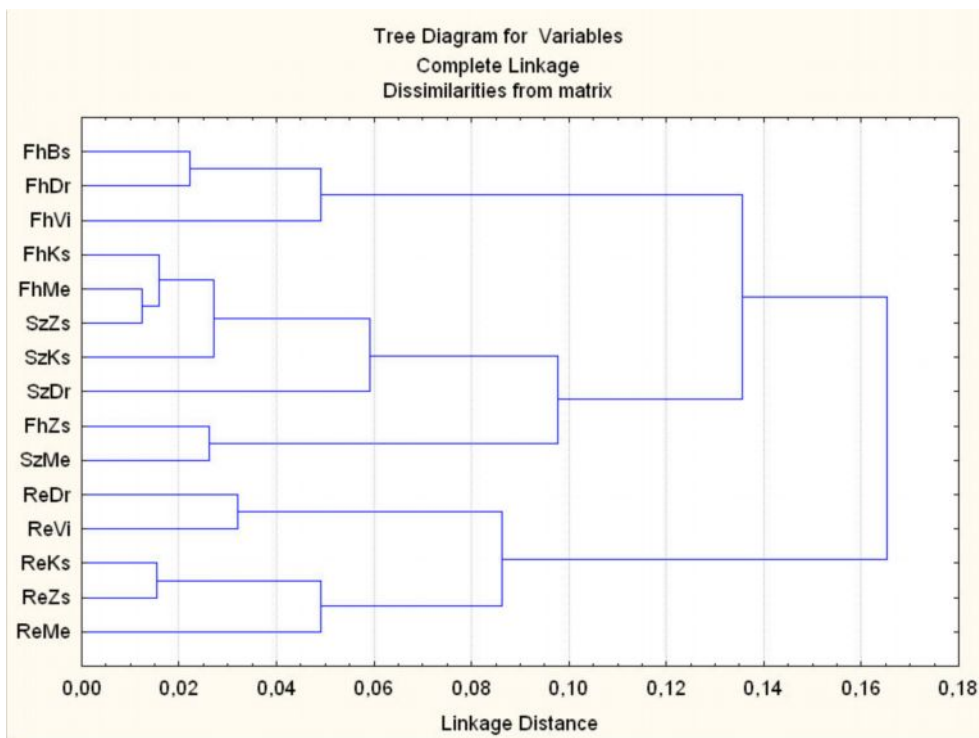
Az összesen 7 populációból (Dráva-mente, Villányi-hegység, Mecsek-hegység, Mohácsi-sík, Belső-Somogy, Külső-Somogy, Zselic-hegység) származó 173 mintára elvégzett PCR-RFLP vizsgálat során összesen 7 haplotípust sikerült kimutatnunk (1. ábra). Ezek közül három a fehér nyárakban, 4 a rezgő nyárakban fordult elő. A 001-es haplotípus a fehér nyár egyedek 59 %-ára jellemző, a villányi minták kivételével valamennyi populációban jelen van. A 014-es haplotípus mindegyik mintázott populációban előfordult, az egyedek 26 %-a tartozik ebbe a csoportba. Ugyanakkor a 012-es haplotípust csak 14 egyed hordozta (15%), és csak a dráva-menti, és a somogyi mintákban volt jelen. A rezgő nyárak 6 mintázott populációja (a Mohácsi-síkról nem gyűjtöttünk rezgő nyárat) 4 haplotípusba sorolható. Ebből kettő valamennyi populációban jelen van (032-es 57 %, 029-es 25 %). Külön figyelmet érdemel a 187-es és az 512-es számú haplotípus. Amíg az előzőt összesen négy populáció hordozza (Villányi- és Mecsek-hegység, valamint Belső- és Külső Somogy), addig az utóbbit kizárólag egy Marcali melletti állományból származó egyedben sikerült kimutatnunk. A laboratóriumi eredmények alapján megállapítható, hogy az egyes haplotípusok előfordulása alapján a somogyi területek tekinthetők

kloroplaszt szekvenciáik alapján a legdiverzebb populációknak. Ugyanakkor amíg a fehér nyárak tekintetében ezen populációk leginkább a dráva-menti területekkel mutatnak közelebbi rokonságot, a rezgő nyárak esetében ez a hasonlóság a villányi- és mecsek-hegységi populációkkal a nagyobb.

A RAPD vizsgálatok alkalmával az előzetesen kiválasztott 20 primer közül 5 mutatott értékelhető sávozottságot, ezek közül pedig kettő alkalmasnak bizonyult a fajok, és a hibrid egyedek azonosítására. Ezen két primerrel végzett vizsgálatok egyik eredménye a 2. ábrán látható, az egyes populációk közötti genetikai távolságot szemléltető dendrogram. Ez a dendrogram részben alátámasztja az első vizsgálati módszer eredményeit, azaz a rezgő nyárak esetében a somogyi populációk a mecseki, valamint a zselici populációkkal állnak szorosabb rokonsági viszonyban; a Dráva-menti populációk ugyanakkor a Villányi-hegység állományaihoz állnak közelebb. Fehér nyárak esetében a belső-somogyi populációk ebben az esetben is a dráva-mentiekkel, valamint a villányi állományokkal állnak szorosabb rokonságban, a külső-somogyiak ugyanakkor a mecseki populációk genetikai állományával mutatnak nagyobb egyezőséget. Ugyancsak jól látható, hogy a szürke nyár egyedek a két alapfaj között helyezkednek el, de a fehér nyárak „ágán”, ami azt a korábbi megfigyelést támasztja alá, hogy virágzásbiológiai okokból a szürke nyárak legtöbbször a fehér nyár alapfajjal kereszteződnek vissza, tehát ezen fej irányában genetikai távolságuk kisebb, mint a rezgő nyárak felé.



1.ábra: Kloroplaszt haplotípusok eloszlása az egyes populációk között



2. ábra: RAPD vizsgálat eredményei alapján szerkesztett dendrogram

Köszönetnyilvánítás

Munkálatainkat az OTKA 63321. számú pályázata támogatja.

Irodalomjegyzék

- BANDELT H-J, FORSTER P, ROEHEL A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phlogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- BARTHA D., BORDÁCS S. (1990):Elektrophoretische Untersuchungen an Weißpappel-Populationen in Ungarn. *Die Holzzucht*, 44: 23-25.
- HEINZE B. 1998: Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridpappelklonen. *FBVA Berichte 105*: 22-28.
- LEXER C., FAY M.F., JOSEPH A., NICA M.S., 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*,
- TÖRJÉK O., KISS E., KISS J., BUCHERNA N., KONDRÁK M., GERGÁ CZ J., HESZKY L. 2000. Magyarországon elismert nyár klónok molekuláris jellemzése. *Erdészeti Kutatások 2000-2001*. Vol. 90: 179-191.