

Zárójelentés

Pályázat OTKA nyilvántartási száma: 63321

Pályázat címe magyarul: Hazai nyárák populációgenetikai és élettani vizsgálata az erdészeti célú felhasználás fejlesztése céljából

Pályázat címe angolul: Population genetic and physiological investigation on native poplars for development of silvicultural application

Vezető kutató neve: Dr. Borovics Attila

Kutatóhely: Erdészeti Tudományos Intézet, Sárvár

Pályázat futamideje: 2006-2009

A pályázati munka, valamint az elért eredmények bemutatása:

A pályázati munka a kitűzött célok tekintetében három területre volt osztható:

- Terepi munkálatok: természetes eredetű állományok felkutatása a Dunántúlon; törzsfakijelölés ezen állományokban; levélminták gyűjtése a genetikai vizsgálatokhoz; az állományok, törzsfák dokumentálása,
- Molekuláris genetikai vizsgálatok: kloroplaszt és sejtmagi DNS vizsgálata az egyes populációk genetikai változatosságának feltárása céljából,
- Növényélettani vizsgálatok: a szárképletek gyökeresedése során lejátszódó élettani folyamatok vizsgálata a gyenge gyökeresedési erély okainak feltárása céljából.

A továbbiakban a kutatás során elért eredményeket ezen hármas bontás szerint ismertetjük.

TEREPI MUNKÁLATOK

A mintagyűjtés alkalmával célunk volt, hogy érintsük a két alapfaj dunántúli elterjedési területének fontosabb tájegységeit. Így kutatásaink kiterjedtek 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. A terepi munkálatok során összesen 79 községhatárban jelöltünk és mintáztunk törzsfákat. 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.

A terepi munkálatok során olyan erdőrészeteket, út menti facsoportokat kerestünk, melyek 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 visszakereshetőség volt, másrészt az a feltételezés, hogy ezen egyedek már évtizedek óta részt vesznek a génáramlási folyamatokban (pollen, vagy termés útján), ezáltal forrásai a helyi ökológiai feltételekhez történő adaptációnak.

Az általunk választott metodika szerint egy erdőrészletből, vagy nagyobb facsoportból legfeljebb három egyed mintáztunk részben azért, hogy minél nagyobb területet legyünk képesek a mintagyűjtés alkalmával bejárni, részben azért, hogy elkerüljük a nagy területű sarjcsoportok többszöri mintázását, amely torzította volna a genetikai vizsgálatok eredményeit.

A mintavételezés alkalmával levélmintákat gyűjtöttünk a kiválasztott egyedekről, melyek egy részét a genetikai vizsgálatokig hűtve szállítottunk, illetve tároltunk, másik részét pedig a későbbiek során herbáriumban helyeztünk el. A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz

lehetőségekhez mérten fiatal, növekedési fázisban lévő leveleket gyűjtöttünk, melyek nagyobb koncentrációban tartalmaznak ép kloroplaszt és sejtmagi DNS-t, illetve az extraktum minőségét gyengítő másodlagos anyagcseretermék még nem halmozódott fel bennük. A herbáriumi levélanyaghoz ép, egészséges, kifejlett rövidhajtásleveleket gyűjtöttünk, amelyek a későbbiekben lehetőséget biztosítanak számunkra az egyes levélmorfológiai jellegek (levélszél fogazottsága, a levéllemez tagoltsága), és a genetikai vizsgálatok eredményeinek összevetésére.

A gyűjtés mellett rögzítettük a kijelölt mintafák elhelyezkedését GPS készülékkel, lejegyeztük azok feltételezett faji besorolását, valamint egyes esetekben a környező erdőállomány egyes florisztikai (fafajösszetétel), ökológiai (termőhelyi) jellegzetességeit. A faji besorolás sok esetben nagy körültekintést igényelt, hiszen az egyes alapfajokkal (főleg a fehér nyárral) visszakereszteződött szürke nyár egyedek morfológiai bélyegei jelentős hasonlóságot mutattak az adott alapfaj vonatkozó bélyegeivel. A mintagyűjtés alkalmával összesen 931 egyedről gyűjtöttük levélmintát.

MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK

Az alkalmazott laboratóriumi módszerek, munkafázisok:

DNS-extrakció:

A DNS kivonás közvetlenül friss, vagy fagyasztva tárolt levélszövetből történt. Az extrakciót a QIAGEN cég Dneasy Plant Mini Kit-jével végeztük. A kivonás első lépése a levélszövet roncsolása volt, amely mozsárban történt folyékony nitrogén alkalmazásával. A finom porrá őrölt mintát ezután több lépésben dolgoztuk fel, amely során megtörtént a fehérjék kicsapása, a szűrlet tisztítása, majd a DNS kinyerése. Az eljárás eredményeként mintegy 200 µl nagy tisztaságú, koncentrált DNS-oldatot kaptunk, amely alkalmas volt a genetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

A DNS-oldatokból 50 µl-nyi mennyiséget -80 °C-on tárolunk tovább, így a leggyűjtött egyedek genetikai állományát fagyasztott, valamint a herbáriumban tárolt levélminták mellett felhasználásra közvetlenül alkalmas DNS kivontban is megőrizzük.

RAPD markerek:

A RAPD markertechnika (*Random Amplified Polymorphic DNA*) a PCR (polimeráz láncreakció, *polymerase chain reaction*) alapú módszerek legegyszerűbb változata. Ebben az esetben véletlenszerű szakaszokat szaporítunk fel (amplifikálunk) a teljes növényi genomból. A reakcióhoz tetszőleges szekvenciasorrendű, 8-10 bázispár hosszúságú oligonukleotidokat (primereket) alkalmazunk. A módszer nagy előnye az olcsó és egyszerű kivitelezhetőség. Vizsgálatainkhoz, előzetes tesztlések után, a következő primereket használtuk az OPERON (Eurofins MWG Operon, <http://www.operon.com/>) sorozatból: D05, K08.

A PCR reakció összeállítása a következő recept szerint történt:

5x Puffer (PromegaGoTaq Flexi)	3 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	0,9 µl
Primer (10 pM)	1,5 µl
dNTPmix (Promega) (10 mM)	0,15 µl
Polymeráz (PromegaGoTaq Flexi)	0,4U
PCR víz	kiegészítve 15 µl-re
DNS-minta (kb. 10 ng/µl)	2 µl

A PCR reakcióhoz Eppendorf Mastercycler Gradient készüléket használtunk a következő programozással:

1. Kezdő denaturáció	95 °C	15 min
2. Denaturáció	95 °C	1 min
3. Bekötődés	38 °C	1 min
4. Lánchosszabbítás	72 °C	2 min
5. Ciklus ismétlése	2-3-4-es lépés	39-szer
6. Végző lánchosszabbítás	72 °C	10 min
7. Tárolás	4 °C	∞

A PCR reakció eredményeként kapott fragmentumokat a méret szerinti elemzéshez agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. Az elektroforézishez 1,75 %-os agaróz gél (Roti® garose NEE0, Roth GmbH) használtunk. A futtatást 1x TAE pufferrel és 120 V feszültség mellett 3 órán át Sigma-Aldrich Midi futtatókádiban végeztük. A pontos méretek meghatározásához 5000-100 bázispár méretezésű standardot alkalmaztunk (100bp DNA Ladder, prod No. T835.1, Roth GmbH). A fragmentumok megjelenítésére a gél etidium-bromiddal, illetve a későbbi vizsgálatokban GelRed (Biotium Inc.) festékkel festettük, majd UV fényvel világítottuk át. A megjelenő mintázatot digitális fotózással dokumentáltuk. A vizsgálat befejeztével a gél veszélyes hulladékként való megsemmisítéséről gondoskodtunk.

A futtatás eredményeként kapott genotípus mintázatot a Kodak 1D elemző szoftver segítségével értékeltük és bináris kódolással kódoltuk a további genetikai elemzésekhez.

PCR-RFLP módszer:

A PCR-RFLP egy kombinált technika, amely két fő lépésre bontható: első lépésben egy, általában specifikus PCR reakciót állítunk össze, majd az amplifikátumot (PCR terméket) további fragmentumokra hasítjuk restrikciós endonukleázokkal.

A kutatáshoz az alábbi kloroplaszt adatbázisból választottuk ki a markereket Lexer et al. (2005) nyomán: www.bfw.ac.at/PRIM.htm

Az általunk alkalmazott cpPrimer és restrikciós enzim (New England Biolabs Inc.) kombinációkat a 2. táblázat tartalmazza.

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

1. táblázat: PCR-RFLP vizsgálatokhoz használt primer és endonukleáz kombinációk

A PCR reakció a következő protokoll szerint zajlott:

5x Puffer (PromegaGoTaq Flexi)	4 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	1,6 µl
Primer F (10 pM)	0,4 µl
Primer R (10 pM)	0,4 µl
dNTPmix (Promega) (10 mM)	0,4 µl
Polymeráz (PromegaGoTaq Flexi)	0,4U
PCR víz	kiegészítve 20 µl-re
DNS-minta (kb. 10 ng/µl)	1 µl

1. Kezdő denaturáció	94 °C	3 min
2. Előkészítés	94 °C	50 sec
3. Előkészítés	70 °C	1 min
4. Ciklus ismétlése	2-3 lépés	9-szer
5. Denaturáció	94 °C	30 sec
6. Bekötődés	55 °C	50 sec
7. Lánchosszabbítás	70 °C	4 min
8. Ciklus ismétlése	2-3-4-es lépés	34-szer
9. Tárolás	4 °C	∞

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (1,75%-os gél, 1x TAE puffer, 120 V, 30 perc).

Az emésztés a következő eljárással zajlott:

A PCR termékhez az adatbázisban közölt receptek szerint enzim mixet (enzim + enzim puffer + PCR víz) adtunk, majd termosztát szekrényben 37 °C-on 5 órán át inkubáltuk.

Az emésztés termékeként keletkezett fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el a méret szerinti elemzésekhez. A futtatási körülmények a következők voltak: 2 %-os gél, 1x TAE puffer, 500-25 bp méretstandard (HyperLadder V, Bioline Inc.) 120 V-on, 3 órán át.

A mintázat megjelenítését és dokumentálását a RAPD vizsgálatoknál ismertetett módon végeztük.

SSR markerek:

A mikroszatellitek vagy SSR markerek (*Simple Sequence Repeat*) olyan nagy polimorfizmust mutató DNS szakaszok, melyekben 2-5 bázispárnyi egységek ismétlődnek nagy kópiaszámban, tandem módon. A célszekvenciák felszaporítását primerpárokkal végezzük, amelyek az adott mikroszatellit határoló, igen konzervatív szekvenciára specifikusak. A primerpár egyik tagja (*forward*) fluoreszcens jelölést kap az 5' végre. Így a felszaporított fragmentum lézeres detektálással kimutathatóvá válik.

A vizsgálathoz az alábbi SSR markereket teszteltük. A tesztelések után 6 markert emeltünk ki egy előzetes mintasor teljes elemzésére.

- WPMS sorozat: 9, 12, **14, 16, 18, 20**
- (*Populus nigra* fajra kifejlesztve, van der SHOOT et al. 2000; SMULDERS et al. 2001)
- PMGC és GCPM sorozat: 14, **2060, 2163**
- (*P. trichocarpa* fajra kifejlesztve, http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm; <http://www.cfr.washington.edu/research.poplar/pmgc/ssr/>)
- PTR sorozat: 2, 4, 5, 6, 14
- (*P. tremuloides* fajra kifejlesztve, DAYANANDAN et al. 1998; RAHMAN et al. 2000)
- ORPM sorozat: 312, 220
- (*P. trichocarpa* fajra kifejlesztve, TUSKAN et al. 2004)

Az SSR régiók felszaporítása a következő protokoll szerint történt:

5x Puffer (PromegaGoTaq Flexi)	3 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	1,5 µl
Primer F (10 pM)	0,6 µl
Primer R (10 pM)	0,6 µl
dNTPmix (Promega) (10 mM)	0,25 µl
Polymeráz (PromegaGoTaq Flexi)	0,4U
PCR víz	kiegészítve 15 µl-re
DNS-minta (kb. 10 ng/µl)	1,5 µl

PCR protokoll					
	NP		LP		
Kezdő denat.	94 °C	15 min	94 °C	15 min	
Denaturáció	94 °C	5 sec	94 °C	45 sec	30x
Bekötődés	50-60 °C	15 sec	50-60 °C	45 sec	
Lánchosszabbítás	72 °C	60 sec	72 °C	105 sec	
Végső lánchossz.	72 °C	10 min	72 °C	10 min	

WPMS 9, 18, 14

Program: LP

Beköt. hőmérséklet: 60 °C

WPMS 20

Program: NP

Beköt. hőmérséklet: 60 °C

WPMS 16, PMGC 2163, 2060

Program: LP

Beköt. hőmérséklet: 55 °C

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (1,75%-os gél, 1x TAE puffer, 120 V, 30 min). A sávok intenzitása alapján becsültük a további vizsgálatokhoz szükséges hígítás mértékét (ez a legtöbb esetben 20 x-os hígítást jelentett).

A vizsgálat következő lépése a fragmentumok pontos méretének meghatározása. Ehhez egy nagy felbontóképességű genetikai analízátor szükséges (ABI PRISM310, Applied Biosystems). Ez a készülék szintén az elektroforézis elvén működik, azonban a poliakrilamid összetételű gél egy kapilláris közegben található, és a készülék automatizáltan adagolja a vizsgálandó PCR termék mintákat. A fragmentumok fluoreszcens festéket hordoznak, ami lehetővé teszi egy lézeres detektor segítségével a pontos detektálásukat, majd a műszer egy méretstandardhoz viszonyítva megadja a pontos hossz adatot bázispár pontosságban. Az így nyert hossz polimorfizmus adat egy kodomináns (két allélos) kódként tovább elemezhető.

Statisztikai értékelés:

A genetikai vizsgálatok során nyert nyers genotípus adatok statisztikai értékelését a következő szoftverekkel végeztük:

GenAIEx 6.1 (Peakall és Smouse 2006)

Statistica 6.0 (StatSoft. Inc. 2001)

Network 4.5 (Fluxus Technology Ltd.)

A vizsgálati eredmények kiértékelése:

RAPD vizsgálatok:

A vizsgálatok alkalmával öt primert teszteltünk, melyek közül kettő mutatott nagy fokú polimorfizmust a vizsgált fajok tekintetében. A kiválasztott két primerrel összesen 358 egyedben végeztük el a PCR reakciót. A PCR reakciót követő fragmentdetektálás alkalmával az egyes egyedek elektroforetikus mintázatán összesen 41 fragmentumot vizsgáltunk, azaz rögzítettük azok meglétét, illetve hiányát. A gélfotók elemzéséhez Kodak 1D 3.6 képelemző szoftvert használtunk. A binárisan kódolt egyedmintázatokat ezt követően GenAIEx 6.1 szoftverrel elemeztük. A szoftver segítségével megállapítottuk az egyes populációk genetikai változatosságát, egymáshoz viszonyított genetikai távolságát. Az elemzés során nyert genetikai távolság mátrixból a Statistica 6.0 szoftver segítségével dendrogramot szerkesztettünk, melyen grafikusán kerül ábrázolásra az egyes populációk egymáshoz viszonyított genetikai távolsága.

Az egyes populációkra jellemző diverzitás értékeket a 2. táblázat tartalmazza. A populációk genetikai diverzitását, ezáltal alkalmazkodó-képességét, a megfigyelt allélszám és az allélgyakoriságok alapján számított Shannon-index (*Shannon's Information index*, Allaby 2004) alapján értékeltük. A táblázatban a populációkat a Shannon-index értékeik alapján fafajonként rangsoroltuk, azaz a legmagasabb értékekkel bíró, tehát legváltozatosabb populációk kerültek a rangsorba előre, míg a legkisebb változatosságot mutatók a sor végére.

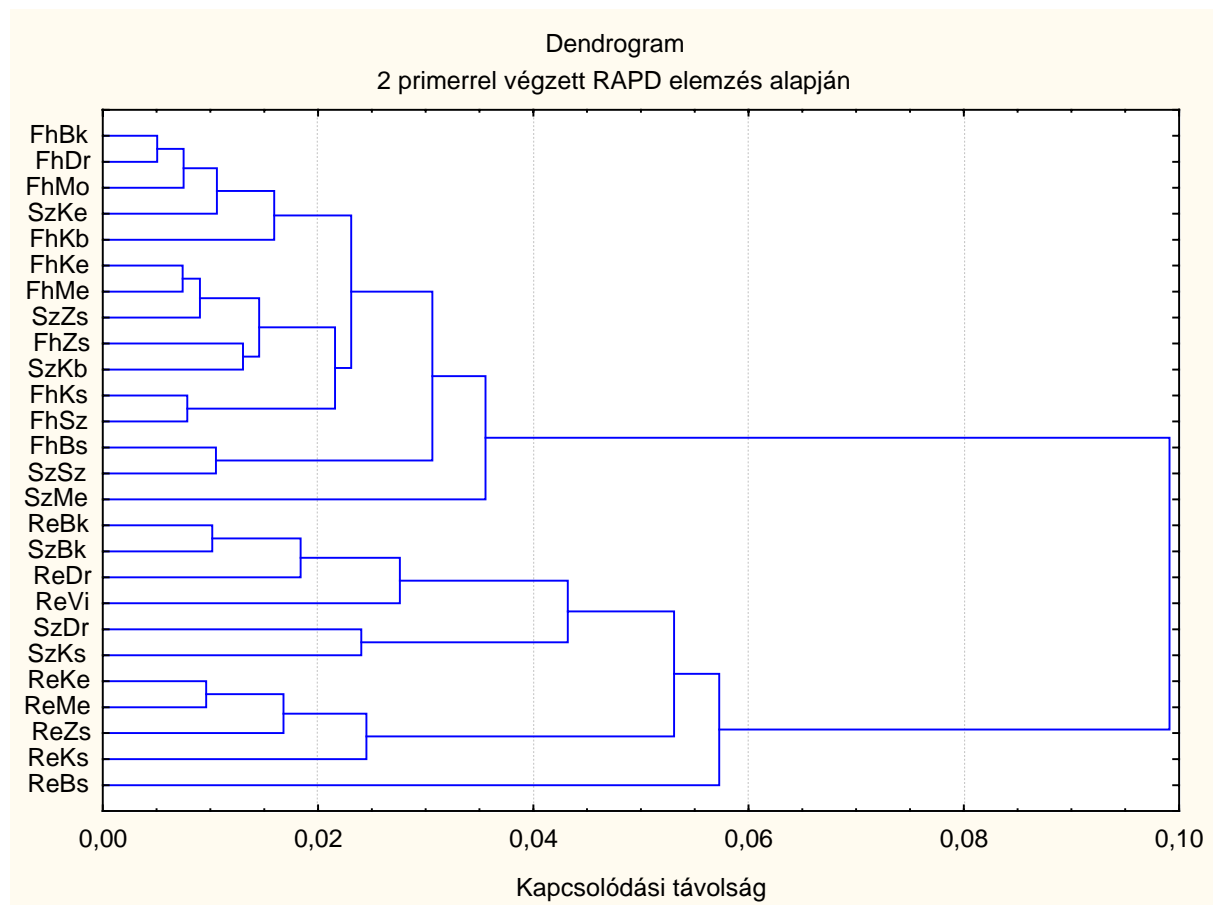
A táblázat alapján jól látható, hogy a legmagasabb genetikai változatosságot a belső-somogyi rezgő és fehér nyár állományok, míg a legalacsonyabbat a kis-balatoni fehér nyár állományok mutatták. Utóbbi esetében az alacsony diverzitás érték feltehetőleg a kis mintaszámmal is összefügg. Az előzetes várakozást, mely szerint a szürke nyár populációk magasabb genetikai diverzitással bírnak, a RAPD vizsgálatokkal nem sikerült bizonyítani. Ugyanakkor általánosságban megállapítható, hogy a rezgő nyárak esetében elsősorban a hegy- és dombvidéki, míg a fehér nyárak esetében a síkvidéki populációk genetikai változatossága a magasabb. Ezen eltérésre a két faj eltérő ökológiai igénye adhat magyarázatot. A fehér nyár melegigényes, hazánkban síkvidéki elterjedésű faj, míg a rezgő nyár a humidabb klímát, ezáltal magyarországi viszonylatban elsősorban a hegy- és dombvidéki párásabb, hűvösebb termőhelyi feltételeket részesíti előnyben (Gencsi et Vancsura, 1997)). Azokon a területeken pedig, amelyek ökológiai adottságaik miatt az adott faj igényeit jobban kielégítik, magasabb egyedszám, ezáltal erőteljesebb génáramlás feltételezhető, amely magasabb effektív allélszámot, így magasabb diverzitást eredményez.

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
SzDr	4	0,927	1,214	0,218	0,138
SzMe	6	0,927	1,221	0,216	0,138
SzZs	14	1,122	1,177	0,200	0,120
SzKb	6	0,927	1,178	0,192	0,118
SzKs	4	0,683	1,191	0,174	0,114
SzSz	24	1,049	1,154	0,159	0,097
SzBk	21	0,878	1,123	0,141	0,084
SzKe	10	0,805	1,119	0,136	0,081

2. táblázat: RAPD elemzés során számított genetikai diverzitás értékek (jelmagyarázat: Fh – fehér nyár, Re – rezgő nyár, Sz – szürke 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 - Zselic)

Az egyes populációk Nei-féle genetikai távolsága alapján szerkesztett dendrogram az 1. ábrán látható. A klaszterek kialakításakor a Statistica 6.0 szoftver *Complete linkage* módszerét alkalmaztuk, amely az egymástól legtávolabbi genotípusok összevetésén alapszik. A dendrogram alapján megállapítható, hogy a RAPD vizsgálatok során alkalmazott két primer alkalmas a két alapfaj egyedeinek elkülönítésére. Ezt mutatja, hogy a rezgő és fehér nyár populációk jelentős kapcsolódási távolsággal külön ágra kerültek. A szürke nyár populációk elhelyezkedése ugyanakkor már nagyobb változatosságot mutat: a mintázott 8 populációból 5 a fehér nyár, míg 3 a rezgő nyár populációkkal mutat közelebbi rokonságot. A mintagyűjtések során szürke nyár jellegűnek ítélt egyedek többsége vizsgált morfológiai bélyegei (levélalak, levél és hajtás szőrözöttsége, kéregmintázat) alapján a fehér nyárhoz állt közelebb, azaz általunk is megerősítést nyert az a megállapítás, hogy a virágzásbiológiai okok folytán a keletkezett F1-es szürke nyárak elsősorban fehér nyár szülőkkel kereszteződnek vissza. Rezgő jellegű szürke nyárakat nagyobb számban a Dráva-mentén, Barcs környékén, Külső-Somogyban, valamint a Magas-Bakonyban találtunk. Ez a dendrogramon is megmutatkozik, ugyanis ezen populációk szerepelnek a grafikon „rezgő ágán”.

Az egyes populációk genetikai távolsága a vártnál nagyobb eltéréseket mutat. Azt a feltételezésünket, mely szerint az egyes fajok földrajzilag egymáshoz közelebb elhelyezkedő populációi nagyobb rokonsági fokot mutatnak, a RAPD vizsgálatokkal nem, illetve csak részben sikerült igazolni. Sok esetben, az egyes tájegységekben gyűjtött szürke nyár egyedek alkotta populáció nem a tájegységbeli alapfaj populációjához állt legközelebb (kis-balatoni, vagy mecseki fehér és szürke nyár populációk), illetve ugyancsak feltűnő, hogy a bakonyi és dráva-menti, valamint a keszthelyi és mecseki fehér és rezgő nyár állományok konzekvensen közeli rokonságot mutatnak.



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

A GenAlEx 6.1 program segítségével a genetikai távolságmátrix alapján AMOVA vizsgálatot is végeztünk fajonként, a molekuláris variancia mértékének, valamint a populációk közötti és az egyes populációkon belüli megoszlásának meghatározására. Az elemzés eredményeképpen megállapítást nyert, hogy a genetikai variabilitás fő forrása a populációkon belüli variabilitás (fehér nyár esetében 91 %, a rezgő nyárok esetében 83 %, a szürke nyárok esetében pedig 78%), míg a teljes variabilitáshoz a populációk közötti változatosság kisebb mértékben (9, 17, illetve 22 %-os arányban) járul hozzá. A populációk közötti differenciáltság mértéke adott területen kapcsolatba hozható az adott faj elterjedési mintázatával. Az egybefüggő, vagy kevésbé tagolt áréával rendelkező fajok populációinak differenciáltsága alacsonyabb, míg a tagolt, széttöredező elterjedési struktúra magasabb populációk közötti differenciáltsághoz vezet (Mátyás, 2002). A vizsgálat során kapott eredmények ennek megfelelően alakultak, hiszen a Dunántúlon a vizsgálatba vont három faj közül a fehér nyár rendelkezik a legnagyobb elterjedési területtel, a rezgő nyár elterjedése már jóval tagoltabb, míg a szürke nyár – lévén, hogy elterjedése a hibridizációs zónákra korlátozódik – a bír a legtöredezettebb áréával.

PCR-RFLP vizsgálatok:

A sejtmagi DNS mellett a nyárok esetében anyai úton öröklődő kloroplaszt DNS (cpDNS) vizsgálata is célunk volt a pályázat keretében. A kloroplasztis markerek uniparentális öröklődésük és „univerzalitásuk” révén különösen alkalmasak egy faj állományainak leszármazástani, vagy akár közeli rokon fajok filogenetikai vizsgálatára (Heinze 2007). Különösen igaz ez a maternálisan öröklődő plasztisz genomra, mivel a maggal történő génáramlás általában viszonylag korlátozott, és így helyi mintázatok fennmaradása is lehetővé válik (Mátyás 2002). A cpDNS elemzéséhez PCR-RFLP vizsgálatot használtuk, melynek lényege, hogy egy PCR reakció során kloroplaszt specifikus primerpárokkal meghatározott célszekvenciákat szaporítunk fel, majd ezeket restrikciós endonukleázokkal tovább hasítjuk. Az így létrehozott fragmentumok (szekvenciák), a szakirodalom alapján (Lexer et al. 2005) alkalmasak az alapfajok elkülönítésére, valamint a fajon belüli változatosság vizsgálatára. A vizsgálatok során 4 primer-endonukleáz kombinációt alkalmaztunk. Az emésztést követő fragmentelválasztás után a gélfotók elemzése, valamint a fragmentmintázatok értékelése a RAPD vizsgálat esetében ismertetettel azonos módszer szerint történt. A kiértékelés eredményeképpen kapott diverzitás értékeket a 3. táblázat tartalmazza.

A táblázatban az egyes populációkat fajonként a Shannon Index értékeik alapján rangsoroltuk. Az adatsorból kiderül, hogy azon előzetes feltételezésünk, mely szerint a szürke nyár populációk átlagosan magasabb diverzitás értékekkel bírnak, mint az alapfajok megfelelő populációi, a PCR-RFLP vizsgálatokkal sikerült igazolnunk. A magasabb változatosság oka természetesen az, hogy a szürke nyár populációkban sok esetben vegyesen fordulnak elő fehér és rezgő nyár származású egyedek, így az alapfaj-specifikus allélek csakis a szürke nyárok esetében mutathatnak együttes jelenlétet (természetesen egy egyed csakis az egyik alapfaj fajszerű allélját hordozhatja, lévén, hogy egy szülő öröklődésű haploid genomról van szó).

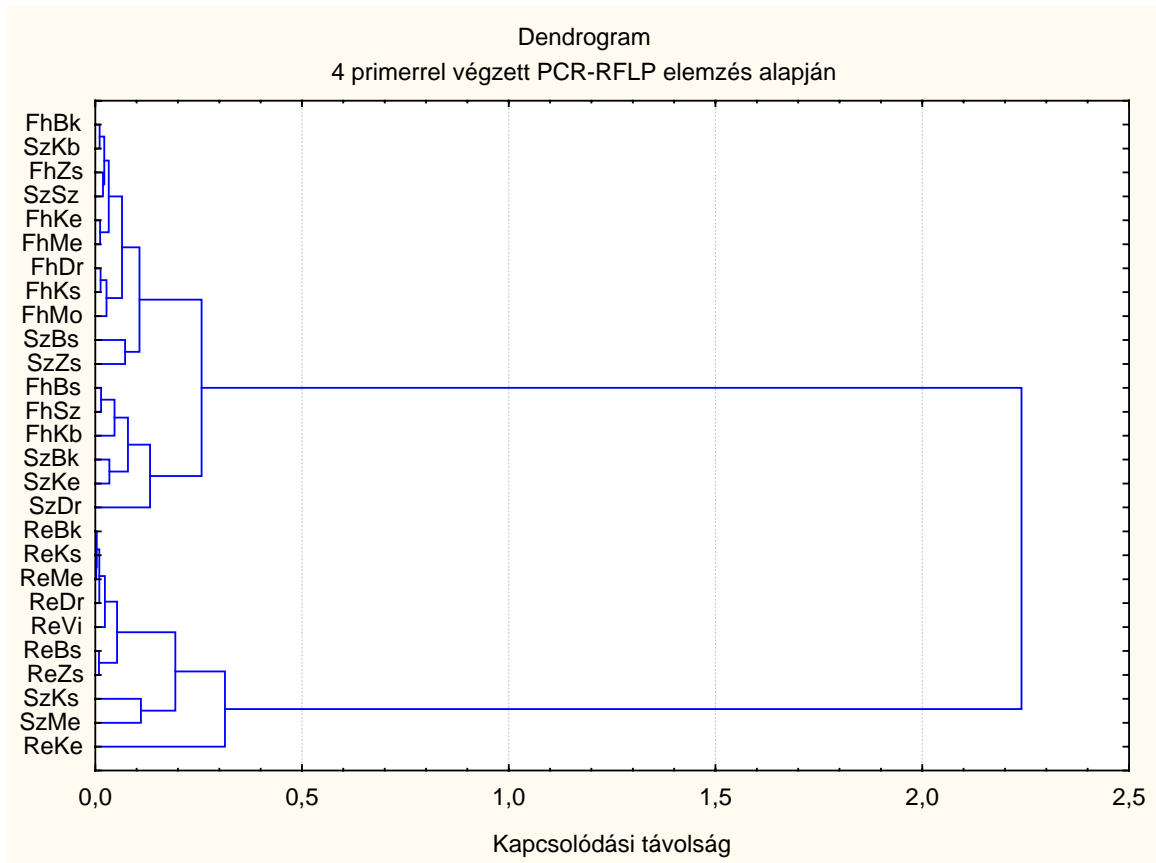
Populáció	Egyedszám	Átlagos lókuszonkénti allélszám	Effektív allélszám	Shannon Index	Megfigyelt haplotípusok száma	Haploid géndiverzitás
FhKb	7	2,250	2,163	0,608	4	0,347
FhBs	15	2,500	1,979	0,580	7	0,320
FhZs	14	2,250	1,929	0,556	4	0,311
FhDr	31	2,500	1,703	0,544	8	0,291
FhBk	16	2,000	1,826	0,510	4	0,309
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
SzBk	21	3,250	2,236	0,889	6	0,507
SzKs	14	3,000	2,173	0,877	8	0,533
SzKe	9	2,750	1,997	0,714	6	0,401
SzBs	7	2,250	1,797	0,627	3	0,398
SzSz	24	3,000	1,923	0,625	6	0,318
SzZs	15	2,500	1,654	0,568	6	0,331
SzDr	4	2,000	1,833	0,520	4	0,313
SzMe	6	2,000	1,850	0,492	4	0,292
SzKb	6	1,750	1,593	0,412	3	0,264

3. táblázat: PCR-RFLP elemzés során számított genetikai diverzitás értékek (Genalex6)

A fehér nyárok 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 érték tekintetében a legnagyobb értéket érte el (megjegyzendő, hogy a kis-balatoni populáció esetében a magas diverzitás értékeket alacsony egyedszám mellett kaptuk, amely természetesen torzíthatja a valós diverzitást, ezért a későbbi vizsgálatok során emelt mintaszám bevonását látjuk szükségesnek). Legkevésbé diverznek a mohácsi állományok bizonyultak, ami feltételezhetően emberi hatásnak köszönhető (a mintázott állományok jelentős része mesterséges eredetű volt). 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 diverzitást mutattak a fehér és szürke nyár populációkhoz képest. A szürke nyárok esetében a legmagasabb Shannon Index értéket a bakonyi és a külső-somogyi populációk mutatták, míg legkevésbé diverznek a mecseki és a kis-balatoni állományok bizonyultak.

Összességében megállapítható, hogy bár a RAPD vizsgálatok esetében kapottól eltérő sorrendben, de a fehér nyár populációk közül itt is a síkvidéki, a rezgő nyárok tekintetében pedig a domb- és hegyvidéki populációk mutatnak magasabb genetikai diverzitást. Szintén feltűnő a somogyi állományok magas diverzitása.

Az egyes populációk Nei-féle genetikai távolsága alapján szerkesztett dendrogram a 3. ábrán látható.



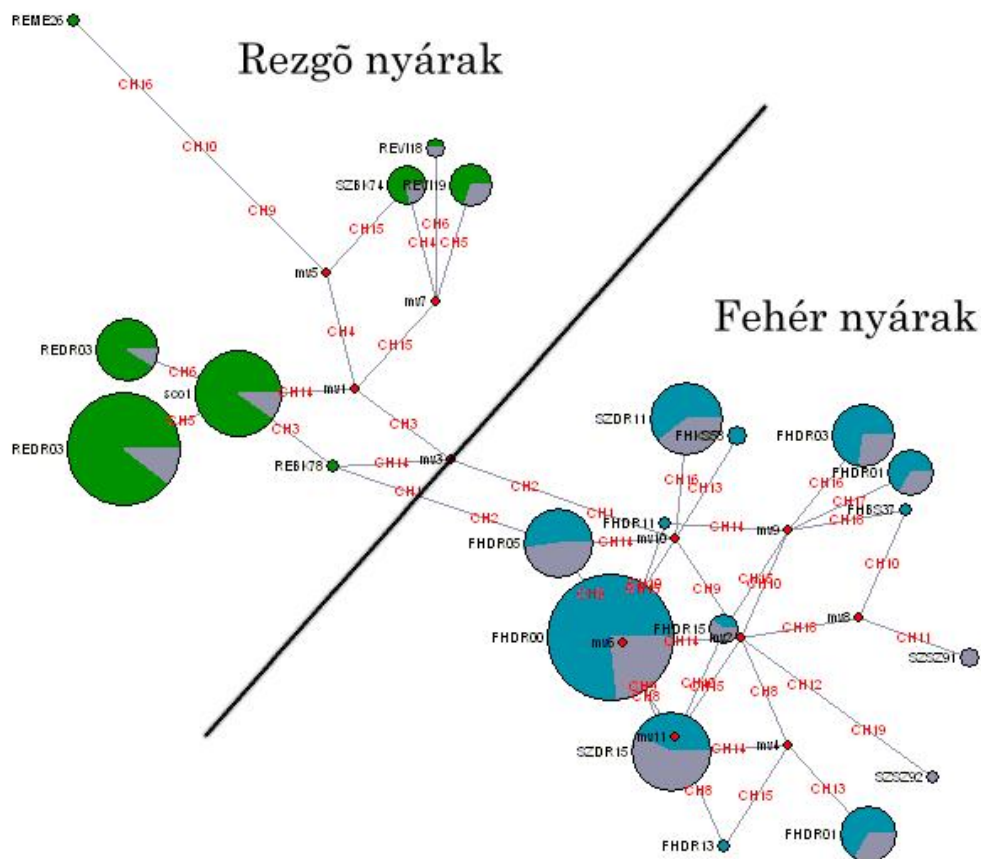
2. ábra: PCR-RFLP vizsgálatok alapján Complete linkage eljárással szerkesztett dendrogram

A kloroplaszt DNS vizsgálata alapján megállapítható, hogy ezen módszer szintén alkalmas az alapfajok elkülönítésére. A két csoport genetikai távolsága ugyanakkor a RAPD vizsgálatok alapján megállapíthatóhoz képest jóval nagyobb. Ugyancsak eltérésként jelentkezik, hogy a sejtmagi DNS vizsgálatával ellentétben a kloroplaszt PCR-RFLP vizsgálata során a rezgő nyárok ágára került a külső-somogyi, valamint a mecseki szürke nyár populáció. Mindez azt jelenti, hogy ezen populációkban anyai úton rezgő nyár eredetű szürke nyár egyedek vannak többségben, míg a RAPD vizsgálatok során rezgő jellegű szürke nyáraknak bizonyult bakonyi, külső-somogyi és dráva-menti állományokat jellemzően anyai úton fehér nyár származású egyedek alkotják.

Jellemzően a fehér nyárok esetében a földrajzilag egymáshoz közel fekvő populációk a dendrogram alapján nem mutatnak szorosabb rokonságot. Ugyanakkor a szürke nyár populációk tekintetében szorosabb korreláció fedezhető fel a genetikai és a földrajzi távolság között. Ezt mutatja a belső-somogyi és zselici, valamint a bakonyi és keszthelyi-hegységi populációk elhelyezkedése a dendrogramon. A rezgő nyárok esetében is csak részben érvényesül a genetikai és a földrajzi távolság közötti összefüggés. Kiemelhető ezen faj esetében is a belső-somogyi és a zselici populációk kisebb genetikai távolsága.

A PCR-RFLP vizsgálatok során összesen 22 haplotípust határoztunk meg. Ezek közül 8 az anyai úton rezgő eredetű, míg 14 a fehér nyár eredetű egyedekben volt megfigyelhető. Ezen

haplotípusok egymáshoz viszonyított genetikai távolságát Network 4.5 szoftverrel, median-joining (MJ) network (Bandelt et al. 1999) készítésével értékeltük, illetve ábrázoltuk (3. ábra – megjegyzés: a szürke nyár egyedek szürke színnel kerültek ábrázolásra; a kördiagramok nagysága az adott haplotípusba tartozó egyedek számával arányos).



3. ábra: Az egyes haplotípusok genetikai távolsága (Network 4.5)

Mint ahogy az az ábrán látható körcikk arányokból megállapítható, a szürke nyár egyedek jelentős többsége anyai úton fehér nyár eredetet mutat: a vizsgált 106 szürke nyár közül 86 a fehér, míg 20 a rezgő nyárak haplotípus-csoportjába tartozik. Az egy populáción belüli legmagasabb haplotípus számot a dráva-menti fehér nyár, valamint a külső-somogyi szürke nyár állományok adták, 8-8 haplotípussal. Annak a magyarázata, hogy mégsem ezen populációk mutatják a legmagasabb diverzitást az eltérő allélgyakoriságban keresendő. Bár példának okáért a dráva-menti fehér nyár populációban magasabb átlagos lókuszonkénti allélszám volt meghatározható, mint a kis-balatoni populáció esetében, az utóbbi csoport egyedeit jóval kiegyenlítettebb allélfrekvencia jellemezte, így az allélgyakoriságot is figyelembe vevő Shannon-index szintén magasabb értéket adott.

Külön említést érdemel a mintázott szigetközi szürke nyár populáció. Ugyanis ezen populáció esetében mutattunk ki egyedül egyedi kloroplaszt alléleket (számszerint hármat), azaz olyanokat, melyek csak erre a csoportra voltak jellemzőek.

AMOVA számításokkal megvizsgáltuk a cpDNA 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 %, szürke nyár esetében 88 %, rezgő nyár esetében pedig 85 %-ban), míg a teljes változatosság kialakításában a populációk

közötti variancia kisebb részben vesz részt (3, 12 és 15 %). A két alfaj 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 áréával magyarázható.

Mikroszatellit vizsgálatok:

Bár a pályázat készítése során a tervezett vizsgálatok között nem szerepelt, két populáció egyedein mikroszatellit markereket is teszteltünk.

A nagy felbontású vizsgálatra az előzetes RAPD és PCR-RFLP vizsgálatok során nagy diverzitást mutató belső- és külső-somogyi állományokat jelöltük ki. A vizsgálatokhoz hat mikroszatellit primert használtunk. A fragmentanalízis során nyert genotípus eredményeket GenA1Ex 6.1-es, valamint Statistica 6.0 szoftverrel értékeltük, illetve ábráztuk.

Az SSR vizsgálatok során nyert diverzitás értékeket a 4. táblázat tartalmazza. A feltüntetett adatok alapján jól látható, hogy a RAPD és a PCR-RFLP vizsgálatok vonatkozó adataihoz képest ezen markerezési eljárással magasabb lókuszonkénti átlagos, effektív és egyedi allélszám, magasabb Shannon-index, valamint heterozigócia értékeket kaptunk. Ez természetesen a vizsgált DNS szakaszokban kimutatható változatosságnak, a vizsgálati módszer felbontóképességének, valamint a kodomináns öröklődési viszonyoknak köszönhető.

Populáció	Taxon	Mintaszám	Átlagos lókuszonkénti allélszám	Effektív allélszám	Shannon-index	Egyedi allélek száma	Heterozigócia
Belső-Somogy	RENY	26	7,000	3,218	1,286	3,167	0,593
	SZNY	6	4,667	3,285	1,249	0,500	0,627
	FHNY	17	4,500	2,023	0,826	1,000	0,396
Külső-Somogy	RENY	20	5,667	3,220	1,266	2,167	0,623
	FHNY	19	5,167	2,908	1,042	1,500	0,487
	SZNY	13	4,667	2,657	1,031	0,833	0,501

4. táblázat: Belső- és külső-somogyi populációk diverzitás értékei SSR vizsgálat alapján

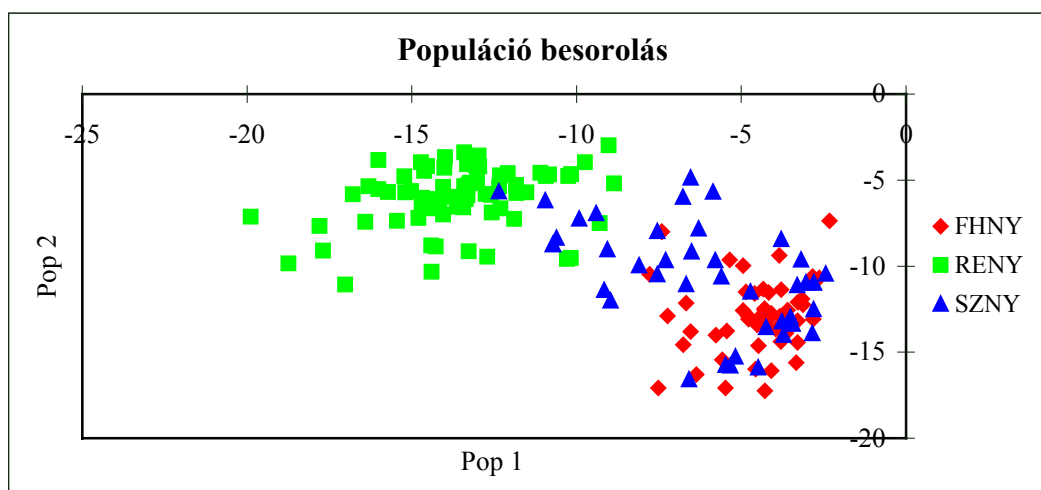
A táblázatban populációnként az allélszámot, valamint az allélgyakoriságokat figyelembe vevő Shannon-index értékek alapján rangsoroltuk az egyes taxonokat. Mivel mindkét származási hely tekintetében a rezgő nyár populációk mutatták a legmagasabb allélszámot, ezen populációk adták a legmagasabb Shannon-index értékeket is. A mintázott belső-somogyi állomány átlagos lókuszonkénti allélszáma kiemelkedő, a szürke nyár populációval összevetve a Shannon-index értékben jelentős különbség nem volt kimutatható, ami egyes allélek alacsony gyakorisági értékeivel magyarázható. A magas allélgyakorisági értékek következtében a belső-somogyi szürke nyár populáció mutatja a legmagasabb heterozigóciát (annak ellenére, hogy itt volt legalacsonyabb a mintaszám) ezen markerezési eljárással vizsgált populációk viszonylatában. A vizsgált fehér nyár populáció mérsékelt diverzitást mutatott a másik két faj populációihoz képest.

A Külső-Somogyban mintázott populációk között is a rezgő nyár populáció mutatta a legmagasabb Shannon-index értéket, és mivel ezen populáció esetében jóval kiegyenlítettebb allélgyakoriságok voltak megfigyelhetőek, a megfigyelt heterozigócia értéke is magas volt. A külső-somogyi fehér nyár populáció esetében a többi populációhoz mérten alacsonyabb átlagos és effektív allélszám volt megfigyelhető, ugyanakkor, akárcsak a belső-somogyi populációnál, az allélgyakoriságok jóval kiegyenlítettebbek voltak. Ennek köszönhetően a populáció esetében számolt heterozigócia érték a tájegységben a második legmagasabb volt.

A mikroszatellit vizsgálatnál megfigyelt diverzitás arányok az egyes populációk között a RAPD vizsgálat esetében megfigyeltekkel mutatnak nagyobb egyezőséget. A PCR-RFLP

vizsgálat eredményei ugyanakkor fordítottak, azaz mind a belső-, mind a külső-somogyi populációk tekintetében a fehér nyár mutat diverzitásbeli fölényt a rezgő nyárral szemben. Ennek okának feltárásához nagyobb vizsgálati mintaszámra, illetve vizsgálati módszerenként magasabb markerszámra lenne szükség. Ugyanakkor előzetesen feltételezhető, hogy a somogyi homokháton a fehér nyár evolúciós értelemben korábban jelent meg, így az adaptációs folyamatokban szerepet nem, vagy csak korlátozott mértékben játszó kloroplaszt DNS-nek több idő állt rendelkezésre mutációk útján történő diverzifikációra. A rezgő nyár feltételezhetően dombvidékekről történő későbbi betelepítése kisebb kloroplaszt DNS változatosságot eredményezett, az új ökológiai feltételekhez történő folyamatos alkalmazkodás viszont tájegységi szinten erősebb sejtmagi DNS diverzifikációhoz vezetett. A környező dombvidékekről történő betelepedést támaszthatja alá az a tény, hogy mind a RAPD, mind a PCR-RFLP vizsgálatok alapján szerkesztett dendrogramok kis genetikai távolságot mutatnak a belső-somogyi és a zselici rezgő nyár populációk között.

A GenAIEx 6.1 program segítségével ellenőriztük a tesztelt SSR markerek alkalmasságát az egyes taxonok egyedeinek elkülönítésére. Az allélfrekvencia értékek alapján számolt negatív logaritmus-valószínűségeket a program egy grafikonon ábrázolta, amely a 4. ábrán látható. Az egyes taxonok egyedeinek grafikonon való elhelyezkedése alapján megállapítható, hogy a tesztelt SSR markerek alkalmasak az alapfajok egyedeinek elkülönítésére (a rezgő és a fehér nyár egyedek halmaza határozottan elkülöníthető). A szürke nyárak esetében összevetettük a terepi mintagyűjtés során készített egyedleírásokat a logaritmus-függvény által mutatott eredményekkel. Az összevetés során megállapítottuk, hogy a morfológiai bélyegek alapján tett terepi besorolást (F1 jellegű, rezgő nyár jellegű, fehér nyár jellegű szürke nyár) alátámasztja az egyes egyedek grafikonon való elhelyezkedése (a rezgő nyár jellegű egyedek a rezgő nyár alapfaj, a fehér nyár jellegűek a fehér nyár alapfaj halmazához tartoznak, az F1 jellegűek pedig köztes elhelyezkedést mutatnak), azaz a módszer alkalmas a visszakereszteződött hibrid egyedek előzetes azonosítására. A még pontosabb szétválasztás érdekében további markerek bevonása szükséges a vizsgálatokba.



4. ábra: Allélfrekvencián alapuló populáció besorolás grafikus ábrázolása (GenAIEx 6.1)

A fajok közötti és a fajokon belüli genetikai változatosság mértékét a mikroszatellit vizsgálatok során is ellenőriztük a GenAIEx 6.1-es program segítségével. A program a számított genetikai távolság mátrix alapján adja meg a genetikai variancia forrásának mértékét. A belső- és külső-somogyi állományok esetében a használt SSR markerek alapján a genetikai variancia ez esetben is döntő mértékben a fajokon belüli változatosságra (fehér

nyár esetében 94 %, rezgő nyár esetében 99 %, szürke nyár esetében pedig 97%-ban), kisebb mértékben a fajok közötti eltérésre (6, 1 és 3 %) vezethető vissza.

NÖVÉNYÉLETTANI VIZSGÁLATOK

Különböző nyárfafajok szárdugványai járulékos gyökérbépződésének élettani vizsgálata

A szárdugványra alapozott szaporítóanyag termelés kritikus pontja a hajtásdugványok gyökeresedése. A gyökérbépződés genetikailag meghatározott, de számos különböző tényező van rá befolyásoló hatással. A fajok közt vannak jól és nehezen gyökeresedők. A nehezen gyökeresedők esetén a gyökereztetés körülményeinek megfelelő megválasztásával növelhető a járulékos gyökérbépződés hatékonysága. A folyamatra legjelentősebb hatással egyes növekedésszabályozó növényi hormonok vannak, de befolyásolhatja azt a kimetszett vessző hajtáson belüli eredeti pozíciója, vastagsága, a vesszők szénhidrát tartalma, avagy a metszés időpontja.

A hazánkban őshonos nyár fajok a hazai nyárnemesítésben vagy a gazdaságosan nem művelhető mezőgazdasági területeken megvalósuló erdőtelepítési programokban egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert. Ezen fajok közül a fehér nyár és a szürke nyár fás dugványai alacsony arányban, a fekete nyár dugványai megfelelő százalékban, a rezgő nyár dugványai viszont szinte egyáltalán nem gyökeresednek meg, így a fás dugványról történő szabadföldi szaporítás a fekete nyár esetében könnyen kivitelezhető, a további három faj tekintetében azonban nem.

Az élettani vizsgálatok célja az eltérő gyökeresedési hajlammal rendelkező nyár fajok összehasonlító élettani vizsgálatával az volt, hogy megállapítsuk, milyen különbségek állhatnak a különbség hátterében, és milyen módon befolyásolható az akár negatív, akár pozitív irányban. Ennek érdekében négy nyár faj hét klónját vizsgáltuk a fás dugványok nem-strukturális szénhidrát-tartalma, az auxin és antiauxin kezelésre adott válasza, továbbá etilén szintézist befolyásoló kezelésekre adott válasza tekintetében a dugványok gyűjtési időpontját és átmérőjét is figyelembe véve.

A vizsgálatba bevont fajok és klónjaik: fekete nyár 1 klón, fehér nyár 2 klón, szürke nyár 2 klón, és rezgő nyár 2 klón.

A hajtásdugványokat az ERTI sárvári csemetekertjében nevelt törzsalanyokról nyertük. Ez alól kivételt a fekete nyár képzett, ennek alanya egy sárvári kifejtett, idős faegyed volt.

A fás dugványok gyűjtése a következőképp történt. A dugványozásra szánt vesszőket téli gyűjtés esetén február-március hó folyamán, a nyári gyűjtés esetén augusztus hónapban metsztük a törzsalanyokról. A beszállítás után a vesszőket azonnal feldolgoztuk, télen kb. 20 cm-es egyforma dugványokra darabolva, majd az összes darabszámtól függően maximum százasaival kötegelve azokat. A nyári metszésnél a vesszőket 40-50 cm-es darabokra vágtuk fel és azonnal felhasználtuk őket a vizsgálatokhoz. A télen gyűjtött, kötegelt dugványokat gombaölő szeres fertőtlenítés után hideg pincében tároltuk nyirkos homokba állítva és a felső végeket is nedves homokkal 1-2 cm vastagon beszorva. A dugványok felhasználása április végén, május elején történt.

A kísérleteket kétféle beállításban végeztük, egyrészt tiszta vízkultúrában, másrészt nedves homokágyban. Mindkét esetben a dugványok legfelső egy vagy két rügye ért a vízszint illetve a homokfelszín fölé.

A kezeléseket szintén kétféle módon végeztük, a dugványokat egyrészt a meghatározott vegyszert, vegyszereket tartalmazó vizes oldatban történő egynapos áztatással, másrészt a vegyszereket talkumban elkeverve és alaposan homogenizálva a hintőporba történő többszöri

beleforgatással. A dugványokat mindkét esetben teljes hosszukban ellepte a vizes oldat, illetve a hintőpor, az alsó és felső vágási felszínt is beleértve. A talkumba a dugványokat nedvesen, de cseppfolyós víztől mentesen tettük bele, hogy a talkum megtapadjon a minták felszínén.

A vízkultúras kísérleteket 20-25°C hőmérsékleten laboratóriumban végeztük, a homokágyas kísérleteket pedig szabadföldön, a Szent István Egyetem gödöllői botanikus kertjében folyamatosan ügyelve arra, hogy a homok állandóan nedves legyen.

A kezeléseket követően a hatást három hét után értékeltük a gyökerkezdemények, növekvő gyökerek darabszáma, illetve az alsó vágáslapon képződő hegszövet, a kallusz jelentkezése alapján a kontrollhoz viszonyítva.

A nem-strukturális szénhidrát-tartalom meghatározását Dubois (1956) által leírt módszer alapján végeztük.

A kezeléseket egyes klónok dugványainak korlátozott száma miatt 10-10 dugvánnyal végeztük el, a kontroll darabok mindenkor vegyszert nem tartalmazó vizes, illetve talkumos kezelést kaptak.

Eredmények

1. A szénhidrát-tartalom vizsgálat eredményei:

A keményítő és az oldható cukrok koncentrációját is jelentősen befolyásolta a begyűjtési idő, a különböző klónok között már nem volt annyira jelentős eltérés, a vessző eredeti pozíciója, azaz vastagsága pedig nem befolyásolta az értékeket.

Magasabb keményítő és alacsonyabb cukortartalmat mértünk minden fajnál augusztusban, míg a télen gyűjtött, feldolgozott, és áprilisig tárolt mintákban a koncentráció értékek épp ellentétesek voltak (a mérési eredményeket az 5. táblázat tartalmazza). A keményítő tartalom tehát nyártól télig lecsökkent, és ezzel párhuzamosan megnőtt az oldható cukrok mennyisége. Ez a konverzió mérsékelt övi fáknál egy jól ismert fiziológiai megnyilvánulása a hideg edződésnek. A hőmérsékletcsökkenés indukálta keményítőlebontás eredményeképp főként szacharóz képződik, de emellett megfigyelhető raffinóz és sztachióz is. A konverzió mértéke a vizsgált lengyelországi eredetű rezgő nyárnál volt a legkifejezettebb, míg a legkisebb mértékű az olaszországi fehér nyár klónnál, ami jól szemlélteti azok eredetét, illetve eltérő, de áttelelésük sikerességét ez esetben lényegesen nem befolyásoló hideg-toleranciájukat.

faj	keményítő (mg g ⁻¹ sz.t.)		oldható cukor (mg g ⁻¹ sz.t.)	
	augusztus	március	augusztus	március
fekete nyár	24.5	5.8	25.3	38.5
fehér nyár	21.3	22.1	33.9	45.8
szürke nyár	31.6	4.8	25.2	46.7
rezgő nyár	33.4	3.6	24.8	55.6

5. táblázat: A nyári, illetve téli gyűjtésű dugványok keményítő és oldható cukortartalma (mg g⁻¹ száraz tömeg)

A gyökeresedés szempontjából természetesen a könnyebben hozzáférhető oldott cukrok magasabb koncentrációja a kedvezőbb, ami a téli mintákban körülbelül másfélszeres a nyári dugványokhoz képest, viszont az utóbbiak jelentősen, akár egy nagyságrenddel is magasabb keményítőtartalma az elhúzódó gyökeresedés során biztosíthat hosszabb ideig energia és szerves anyag utánpótlást. A gyengén gyökeresedő fajoknál ez meghatározó lehet a tekintetben, hogy egyéb tápanyagellátás hiányában mennyi ideig maradhat a dugvány a

nyugalmi állapot megszűnte után élet- és gyökeresedő képes, de rossz gyökeresedési hajlamuk nem ennek a következménye, hisz a gyökeresedési hajlam tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést sem a keményítő, sem az oldható cukorkoncentrációban.

2. Az auxin és antiauxin kezelés hatása a gyökeresedésre:

A járulékos gyökérképződésre a növényi hormonok közül legjelentősebb hatással az auxin van. A gyengén gyökeresedő fajoknál egyrészt a természetben is előforduló indolecetsav (IES) és egy auxin hatású vegyület, az indol-3-butirilsav (IBS) hatását teszteltük, míg a jól gyökeresedő fajoknál egy auxin transzportot gátló vegyület, a 3,4,5-trijód-benzoésav (TIBS) kezelést teszteltük. Vízkultúras kísérletben az alkalmazott hormonkoncentrációk mindhárom vegyületnél 10 μM volt, a homokágyas kísérletekhez talkumban megforgatott mintákat használtunk, az alkalmazott koncentráció az IES és IBS esetében 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ talkum, a TIBS esetében 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ talkum volt.

Az alkalmazott IES és IBS kezelések negatív eredményt hoztak a hajtás dugványok átmérőjétől, vastagságától függetlenül, azaz a csekély gyökeresedési hajlam oka a fehér és szürke nyár esetében nem a hormonkoncentráció különbségekre vezethető vissza. Ezt bizonyítja az a megfigyelés is, hogy megfelelő körülmények között a gyengén gyökeresedő fajoknál is kialakul az alsó vágási felszínen kallusz, ami szintén auxin függő folyamat. A kallusból azonban nem indul meg gyökér differenciálódás, a gyökérprimordiumok helyett csupán a differenciálatlan kallusz növekedik.

A jól gyökeresedő fekete és fehér nyár esetében hormonkezelés nélkül is igen sűrűn képződtek a dugványok teljes hosszában gyökérkezdemény dudorok (kb. 1.5-2 cm-enként 10 db), még a felső vágási felszín közelében is, legtöbbször a lenticellák helyén, melyekből szinte 100 %-ban kifejlődtek a gyökerek.

Ugyanakkor az auxin transzport gátló TIBS kezeléssel a gyökérképződést és a gyökérnövekedést is jelentős mértékben gátolni lehetett az utóbbi két fajnál a dugványok átmérőjétől függetlenül. A kezelt dugványokon a fejlődésnek indult gyökérkezdemények száma (63%) és a fejlődő gyökerek mérete is (46%) elmaradt a kezeltlen kontroll dugványokéhoz képest. Ez az eredmény szintén azt támasztja alá, hogy a gyengén gyökeresedő fajok gyökeresedési hajlama (a jól gyökeresedő fajokhoz viszonyítva a gyökérképződés mértéke csupán 8-14% körüli volt) nem az auxin mennyiségével függ össze, hanem vagy a dugványok szöveteinek auxin érzékenységgel, vagy egyéb más hormonális különbséggel.

3. A leveles dugványok gyökeresedése:

A nyáron gyűjtött, leveles fehér, szürke és rezgőnyár dugványok gyökeresedésével kapcsolatosan egyrészt a IES, IBS kezelés hatását vizsgáltuk, továbbá azt is, hogy a 1.2 – 1.5 m hosszú levágott vesszőket 3 egyenlő (40-50 cm-es) részre felosztva a hajtásdugvány eredeti pozíciója és átmérője milyen hatással van a gyökeresedésre.

A gyűjtést megelőző időszak kedvezőtlen csapadékviszonyai miatt szárazság-stressznek kitett dugványalanyok levágott vesszőiről a levelek – a kizárólag tápoldatos elhelyezés és a biztosított magas relatív légnedvesség-tartalom ellenére is – rövid időn belül lehullottak, így ebben a kísérletsorozatban a levelek jelenlétének befolyásoló hatását (mint auxin és szénhidrát források) nem tudtuk megvizsgálni.

Hat hét alatt gyökeresedést – a télvégi dugványokhoz hasonlóan – most is csak a jól gyökeresedő két fehér nyár klónnál figyeltünk meg, és a levél honalji rügyek is csupán ezeknél a vesszőknél hajtottak ki. Hegszövet minden fajnál gyengébben fejlődött ki, és főként csak talpgyökerek képződtek és növekedtek. A lenticellák helyén nagyon gyenge volt a járulékos gyökérképződés. Ez a különbség a tavaszi gyökereztetéshez képest a leveles

állapotban gyűjtött vesszők eltérő hormontartalmával és hormoneloszlásával, továbbá a szénhidrát-tartalmában megfigyelt különbségekkel állhat összefüggésben.

Egy hajtáson belül az alsó harmadból származó vesszők gyökeresedése nem volt lényegesen jobb, mint a felső kétharmadból származóké, a gyökeresedési erély azonban lényegesen elmaradt – feltehetően főképpen a kedvezőtlen nyári szárazság miatt a télvégi gyűjtésű és tavasszal eldugványozott vesszőkéhez képest. Az adventív gyökerek képződéséhez egyrészt hosszabb időre volt szükség, másrészt darabszámra is kevesebb fejlődött.

4. Az etilén hatása a járulékos gyökérbővízésre:

Az auxinok mellett – több tanulmány egybehangzó eredménye alapján – az etilénnek mint gáz halmazállapotú növényi hormonnak van jelentős hatása a járulékos gyökérbővízésre, ami elárasztott növényeknél jelentkezik legszembetűnőbben a kialakuló hipoxia, illetve anoxia miatt indukálódó etilénszintézis hatására. Etilén-inszenzitív növények esetében például ugyanúgy hatástalannak bizonyult az auxin vagy auxin-homológ kezelés a járulékos gyökérbővízés serkentésében, mint a gyengén gyökeresedő nyárfajok esetében, továbbá olyan esetekben is, amikor az auxin kezelés mellett az etilén szintézisét gátló kezelést is alkalmaztak. Az etilénszintézisét serkentő vegyületekkel ugyanakkor az auxinra érzéketlen növényeknél is fokozni lehetett a járulékos gyökérbővízést.

Kísérletesen az etilén szint megváltoztatása az etilénszintézis prekursorainak koncentráció növelésével lehetséges. Erre a célra leggyakrabban az S-(5'-adenozil)-L-metionin kloridot (ACC) alkalmazzák.

Télvégén gyűjtött szabványos hajtásdugványokkal a következő kezeléseket állítottuk be: két jól gyökeresedő fehérenyár, és egy szürkenyár fajtánál auxin transzportot gátló 3,4,5-trijód-benzoésav (TIBS) kezelést, továbbá két rezgőnyár és egy további szürkenyár fajtánál auxin-homológ indol-butirilsav (IBS), etilén szintézist serkentő S-(5'-adenozil)-L-metionin klorid (ACC), és egy kombinált, IBS+ACC kezelést. Valamennyi esetben talkumos kezelést alkalmaztunk a következő vegyszerkoncentrációkkal: 1000 µg IBS g⁻¹talkum, 500 µg TIBS g⁻¹talkum, valamint 50 µg ACC g⁻¹talkum.

A gyengén gyökeresedő fajoknál az alkalmazott etilén szintézist fokozó kezelés hatására egyes dugványoknál 40-45 %-ban megnőtt a gyökérbővízések száma, és ezt követően a gyökérbővízés is, ami az IBS kezelés mellett kifejezettebb volt, átlagosan további 10-15 %-os növekedést eredményezve, a jól gyökeresedő fajoknál korábban megfigyelt auxin kezeléshez hasonlóan. Szintén a megelőző vizsgálatokkal összhangban, önmagában az IBS kezelés most sem volt hatásos a szürke és rezgő nyár dugványokra.

A kezelések kiértékelését, az eredmények igazolását azonban nagymértékben nehezítette, hogy kezelésként jelentős eltérés mutatkozott az egyes dugványok között. Úgy véljük, ennek oka az alkalmazott kezelési módszerből adódott, mely nem tűnt kellően megbízhatónak a rendkívül alacsony ACC koncentrációérték miatt (relatív nagy mennyiségű talkumban igen kis mennyiségű ACC-t kellett elkeverni és homogenizálni).

Az eredmények alapján viszont biztonsággal megállapítható, hogy a nyár fajok közötti gyökeresedési hajlam különbsége az eltérő etilén szintre vezethető vissza.

A mezőgazdasági gyakorlatban szintén alkalmazzák az etilénszintézis fokozását érésszabályozó hatása miatt. A kereskedelemben erre a célra kapható vegyszer az Ethrel (Bayer CropScience SA, Franciaország), mely oldat formájában tartalmazza a hatóanyagot (40 % etafon). Tápoldatos kísérletben ennek a szernek a hatását is teszteltük, de előtanulmányok híján sem a megfelelő koncentrációra, sem a kezelés időtartamára vonatkozóan nem áll rendelkezésünkre adat. Ennek megfelelően az egyéb hatások kiváltására javasolt közepes koncentrációhoz (10ml l⁻¹) igazítva készítettünk koncentráció sorozatot (1, 5 és 10 ml l⁻¹), amiben a szokott módon egy napot áztattuk a dugványokat, majd vízkultúrában

tartottuk a dugványokat. Azonban a legkisebb koncentráció esetében is pár napon belül a rügyek pusztulása, elszáradása és leválása következett be. Ennek megfelelően a megfelelő koncentráció megállapítása, és a gyakorlatban is alkalmazható, a gyökeresedést hatékonyan elősegítő eljárás kidolgozása – például a fertőtlenítő szerves áztatással egybekötött kezelés – további vizsgálatok elvégzését igényli.

A RÉSZTVEVŐ KUTATÓK SZEMÉLYÉBEN BEÁLLT VÁLTOZÁSOK

Cseke Klára tudományos segédmunkatárs 2005-ben a pályázat írásakor még mint PhD hallgató szerepelt a kutatásban résztvevők között. 2006 során ugyanakkor az Erdészeti Tudományos Intézet alkalmazottja lett, így az Intézet alkalmazásában lévő kutatóként vett részt a pályázati munkában. Ezen változás az előzetesen tervezett kutatási feladatok elvégzése tekintetében előnyt jelentett az Intézet számára.

KÖLTSÉGTERVTŐL VALÓ ELTÉRÉS INDOLKÁSA

A pályázat írásakor a terepi munkálatok során évente 125 mintafa kijelölését terveztük, melyre kutatási évenként 4 hetes terepi időszakot láttunk szükségesnek. A terepi mintagyűjtések hatékonysága ugyanakkor indokoltá tette a mintagyűjtésekkel kapcsolatos költségek (szállásköltség, gépkocsifutás, napidíj) arányos csökkentését, valamint a megnövekedett mintaszám végett a laboratóriumi költségek emelését (készletbeszerzés), néhány kisebb értékű, a vizsgálatok hatékonyságát növelő eszköz (pl.: minicentrifuga, digitális pipetta, 8 soros pipetta), illetve szoftver (Kodak 1D képelemző szoftver) beszerzését, illetve a pályázati munka hatékonyságát elősegítő rövid külföldi tanulmányúton való részvételt. A költségvetési módosítási kérelmeket az OTKA Iroda írásban jóváhagyta.

A végrehajtott költségvetési módosítások hozzájárultak a tervezett molekuláris genetikai munkálatok gyorsabb elvégzéséhez.

PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

A pályázati munka során végzett kutatásról ez idáig két publikációban (a XIII. és XV. Növénynevelési Tudományos napokon egy poszter és egy előadás keretében) adtuk számot. A pályázat lezárultával a rendelkezésünkre álló eredményekről ezeken felül további legalább négy írásos publikáció megjelentetését tervezzük 2010 és 2011 során. Közülük egyet az Erdészeti Kutatásokban magyarul, hármat pedig angol nyelven a következő folyóiratokban: *Acta Silvatica*, *Silvae Genetica* (J.D. Sauerländer's Verlag), *Journal of Biogeography* (Blackwell Publishing).

IRODALOMJEGYZÉK

- 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>
- Bandelt H-J, Forster P, Roehel A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phzlogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- Brown A., Weir, B.S. (1983): Measuring genetic variability in plant populations, in *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, (Tanksley SD, Orton TJ, Editors). Elsevier Science Publ.: Amsterdam. p. 219-239.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A, Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Fluxus Technology Ltd. – <http://www.fluxus-engineering.com>
- Gencsi, L., Vancsura, R. (1997): Dendrológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 332-344.
- 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>
- 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*,
- Mátyás, Cs. (2002): Erdészeti – természetvédelmi genetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 35-40.
- Peakall, R., Smouse P.E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.
- 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>