

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetika Intézet

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT **XXXI. OTDK Biológia szekció**

A homoki ternye (*Alyssum tortuosum*) magyarországi populációinak vizsgálata RAPD markerek segítségével

Készítette: Kovács Szilárd

Biológus I. MSc szakos hallgató

Témavezető:

Dr. Endre Gabriella, tudományos főmunkatárs, MTA SZBK Genetikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Bagi István, egyetemi docens, SZTE-TTIK Növénybiológiai Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. Molekuláris genetikai módszerek az ökológiában.....	5
1.1.1. Szekvencia-specifikus amplifikáción alapuló módszerek	6
1.1.2. A RAPD módszer	7
1.1.3. A RAPD alkalmazása a gyakorlatban.....	8
2. A munka közvetlen előzményei és célkitűzések.....	11
3. Anyagok és módszerek	12
3.1. A vizsgált homoki ternye populációk	12
3.2. Homoki ternye mintagyűjtés.....	13
3.3. Genomi DNS tisztítás	13
3.3.1. RAPD reakciók	13
3.4. Statisztikai módszerek	14
4. Eredmények és megvitatásuk.....	15
4.1. A kísérleti körülmények optimalizálása	15
4.2. RAPD reakciók és elsődleges értékelésük.....	19
4.3. A populációk szerkezete	21
4.4. Statisztikai próbák.....	23
4.4.1. UPGMA klaszteranalízis	23
4.4.2. Neighbour joining	23
4.4.3. Mantel teszt.....	25
4.4.4. PCO.....	26
5. Eredmények összefoglalása	28
Irodalom.....	30
Köszönetnyilvánítás.....	33
Függelék.....	34
Nyilatkozat.....	42

1. Bevezetés

Az emberi populáció mérete jelentősen megnőtt az elmúlt évtizedek során, s ezzel nagymértékben emelkedtek igényei a Föld természeti forrásai iránt. Ezen igényeket felelőtlenül, a környezetben bekövetkezett változások figyelmen kívül hagyásával elégítette ki, amely példátlan élőhely és biodiverzitás csökkenést eredményezett az élővilág rendszereiben. A XXI. század hajnalán az emberiség ráébredt, hogy a fenntartható fejlődés érdekében paradigmaváltás szükséges és nagyobb figyelmet kell szentelni a környezetünkben bekövetkezett, általunk generált változásokra (MEA 2005). A fosszilis energiahordozók nagymértékű kitermelése és felhasználása, az esőerdők felelőtlen kitermelése, a légkörünkben egyre nagyobb mennyiségben jelenlévő, általunk kibocsájtott üvegházhatású gázok mennyiségének növekedése mind növelik az ökoszisztémánk terheltségét, és ehhez még hozzájárul a természetes élőhelyek felszámolása a mezőgazdasági és ipari területek javára. A biológiai rendszerek „megszokták”, hogy alkalmazkodniuk kell a bizonyos környezeti változásokhoz, ugyanakkor az emberiség által generált változásokkal kiegészített szelekciós nyomás sok esetben nagyobb, mint amikkel természetes körülmények között találkoznanak, ezért is figyelhető meg magas fokú leépülésük. A biológiai rendszerek alkalmazkodóképessége ezen új körülményekhez nagymértékben függ a fajok adaptációs képességétől, amely azok genetikai sokféleségén alapul (Laakso *et al.* 2006), hiszen minél sokfélébb genetikai állománnyal rendelkezik egy faj, annál nagyobb eséllyel kerülnek elő belőle olyan kombinációk, amelyek képesek reagálni a megváltozott szelekciós tényezőkre. Az ökoszisztémákat monitorozó alap kutatások egyik fontos feladata, hogy azonosítani tudják azon fajokat, amelyek adaptációs potenciálja kisebb, így képtelenek lennének külső segítség nélkül alkalmazkodni.

A különböző kutatási területek együttes alkalmazásával nagyobb esélyünk nyílik arra, hogy megértsük ezt a globális problémát, illetve képesek legyünk megoldani azt (Collins *et al.* 2007). Az eltérő megközelítési módok szintézisével lehetőségünk nyílik a rendszerek tökéletesebb megismerésére, valamint azonosítani tudjuk a rendszerek hátterében zajló mechanizmusokat, és a problémák ismeretében képesek lehetünk nagyobb hatásfokkal kezelni azokat.

A molekuláris biológiai módszerek használata a XX. században hatalmas fejlődésen ment keresztül és egy külön tudományággá nőtte ki magát. A módszerek mára megszokott rutinszerű alkalmazása és a kísérleti költségek csökkenése révén lehetőség nyílt a módszertan alkalmazásának kiterjesztésére és alternatív felhasználására. Kutatók rámutattak, hogy a molekuláris genetikai módszerek bevonásával, illetve azok ökológiai módszerekkel való kiegészítésével sokkal nagyobb hatásokkal tudjuk monitorozni a biológiai rendszereket, ezért kiemelik ezen kollaborációs törekvések minél általánosabb elterjedésének fontosságát (EPBRS 2003). A biológiai rendszerek jellemzésénél azok sokféleségét célszerű tehát vizsgálni, összefoglaló néven a biodiverzitást (McCann 2000). Nem meglepő, hogy a molekuláris módszerek alkalmazása is erre koncentrál.

A populációk fenotipikus sokféleségének az alapja a genetikai sokféleségük, azonban a környezeti faktorok is hozzájárulnak a fenotípushoz, ezt nevezzük reakciónormának. A tradicionális ökológia a vizsgált organizmus környezeti faktorokkal kiegészített fenotípusát vizsgálja, ami egy összetettebb képet ad a biodiverzitásról, nem állapítható meg pontosan, hogy a vizsgált populációk eltérései milyen arányban származnak a környezet hatásaiból és a populációk közti genetikai különbségekből. A szekvencia alapú módszerekről azonban elmondható, hogy kizárólag a genomi különbségeket vizsgálja, ezért alkalmas a biodiverzitás genetikai hátterének vizsgálatára. Általánosságban valószínűsíthető, hogy egy morfológiailag sokszínűbb populáció mögött álló genetikai diverzitás is magasabb összehasonlítva egy hasonló taxon kevésbé diverzebb populációjához képest (Frankham 1996), de a gyakorlatban lehetnek eltérések, így ennek az elméletnek az igazát, illetve mértékét minden egyes esetben érdemes kísérletesen vizsgálni.

Kísérleti eredmények rámutattak, hogy a növénypopulációkon belüli genetikai diverzitás mértéke hatással van a velük együtt élő más fajokra is (Vellend 2006), az ízeltlábú közösségek struktúrájára (Fritz & Price 1988), valamint az adott ökoszisztémában lezajló folyamatokra egyaránt (Schweitzer *et al* 2004). Megfigyelhető, hogy az endemikus fajok eltűnésével és a generalista fajok számának növekedésével az együtt élő fajok közösségei egyre homogénebbé válnak (McKinney & Lockwood 1999, Mace *et al.* 2005). Ezen kutatások rámutattak a biológiai rendszerek összetettségére, illetve arra hogy egyetlen egy faj eltűnésével is nagymértékű degradáció léphet fel egy élőhelykomplexben. Különböző biológiai rendszerek ellenállóképességét vizsgálva kiderült (Tilman 1996, Naeem & Li 1997), hogy az emberi zavarástól mentes és

fajgazdag rendszerek ellenállóképessége az új változásokkal szemben sokkal nagyobb, mint azon degradált rendszereké, amelyek az ember által generált különböző hatásoknak előzőleg ki voltak téve. A fajok adaptációs képessége a környezeti változásokhoz tehát függ a populációk genetikai diverzitásának nagyságától (Reed & Frankham 2003). A genetikai variációk megléte a különböző szinteken előfeltétele a populációk védettségének, mind a rövid -, mind a hosszú távú változásokkal szemben (Ditto & Frey 2007, Saccheri *et al.* 1998). Kimutatták azt is, hogy a magasabb fokú genetikai -, és fajdiverzitás növeli az ökológiai rendszerek védelmét akár olyan nagymértékű változásokkal szemben is, mint a klímaváltozás (Reusch *et al.* 2005), vagy akár növelheti az invazív fajokkal szembeni védelmet (Hughes & Stachowicz 2004). Annak ellenére, hogy a fajok genetikai diverzitásának vizsgálata mekkora jelentőséggel bír, nem elég széles körben foglalkoznak vele, különösen a Pannon Ökorégióban, mely terület magyarországi érintettsége jelentős mértékű. A térségben a kulcsfajok és közösségek érzékenységeinek megállapítása a környezeti változásokkal szemben nemcsak a magyar, hanem az európai közösség számára is fontos információval bír. Ezen folyamatok kivizsgálása szempontjából is jelentős a különböző kutatási területek együttes alkalmazása.

1.1. Molekuláris genetikai módszerek az ökológiában

A diverzitást négy különböző szinten lehet értelmezni: fajok között, fajok populációi között, a populációkon belül a szubpopulációkon, illetve egyedek között. A genetikai diverzitás becslése a vizsgált organizmusok allél összetételének vizsgálata alapján történik. A genetikai diverzitás vizsgálatára különböző módszerek állnak rendelkezésre (Baker 2000). A módszertant két alapvető csoportra lehet osztani: az első, amikor ún. specifikus markerekkel dolgozunk, amelyekhez szükséges a genom szekvenciájának bizonyos szintű ismerete, míg a másodiknál véletlenszerűen generálunk markereket, melyhez nem szükséges előzetes ismeret a genomról. Számos konkrét módszer alkalmazása terjedt el (Allan 2010), jelen munkában csak egy-két példát mutatunk be: az elsőre a mikroszatellit markereken alapuló, illetve az EcoTILLING módszert, míg utóbbira a RAPD technikát, melyet a bemutatott munkában is használtunk.

1.1.1. Szekvencia-specifikus amplifikáción alapuló módszerek

Ezen módszerekhez az adott fajból bizonyos szekvenciaismeretek szükségesek, melyek segítségével primereket tervezhetünk, így PCR-rel amplifikálhatjuk a kérdéses genomi régiót, majd különböző technikákkal vizsgálhatjuk a különböző egyedekben fellelhető változatokat, vagyis allélokat.

Az egyik az ún. mikroszatellit alapú módszer. Lényege, hogy a genomban vannak olyan részek, ahol néhány bázispáros (leggyakrabban 1, 2, vagy 3 - tagú) ismétlődések vannak. A DNS megkettőződése során a polimeráz ezeknél a szakaszoknál hajlamos hibázni, így keletkezhetnek olyan változatok, melyek eltérő tagszámú ismétlődést hordoznak. Ezeket akár egyszerű agaróz gélelektroforézissel vagy a jobb felbontást eredményező poliakrilamid gélelektroforézissel tehetjük láthatóvá. Azonosítva az ilyen szakaszokat tartalmazó genomi részeket, és rájuk primert tervezve lehetőség nyílik az adott régió változatainak vizsgálatára és ezáltal a diverzitás jellemzésére a különböző szinteken.

A másik ilyen módszer az ún. EcoTILLING, melynek alapja a TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) módszer, melyet eredetileg a kémiai ágensek által kiváltott pontmutációk detektálására fejlesztették ki (Colbert *et al.* 2001). A módszer kiterjesztésével azonban a természetes populációkban az evolúció során felhalmozódó mutációk karakterizálására is felhasználható (Comai *et al.* 2004). Az EcoTILLING során először szintén PCR amplifikációt végzünk gondosan megtervezett primerekkel, célzott genomi régiókban ha lehet, ismert funkciójú génekhez kapcsoltan, azok intron vagy 5'/3' át nem íródó szakaszain, ahol több polimorfizmus várható. Ezt követően a PCR reakcióban képződött termékeket denaturáljuk, illetve renaturáljuk, vagyis a kétszálú DNS szálait szétválasztjuk, majd újraegyesítjük. Ha a vizsgált DNS szakasz eltérő allélokból amplifikálódott fel, akkor a homoduplexeken kívül ún. heteroduplexek is képződik, melyben az esetleges eltérések (egyedi nukleotid különbségek, röviden SNP-k /Single-nucleotid polymorphism/, vagy rövid inszerciós/deléciós különbségek, röviden INDEL-ek) deformációt eredményeznek a kettős spirál láncon és kihurkolódnak. Ezt a hurkot képes felismerni az ún. *Cell* enzim, és ezen a ponton belevág a DNS szálba, ezért a renaturálás után a reakcióelegyet enzimatisz kezelésnek vetjük alá (*Cell*), mely révén a heteroduplexekből rövidebb fragmentek vágódnak ki. A reakcióelegyben keletkező fragmenteketdenaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) detektáljuk, és a fragmentek mintázatát

értékeljük, azonosítjuk az allélokat. A vizsgálatban kapott különböző allélok közvetlenül is alkalmazhatóak a diverzitás jellemzésére, azonban a jellemzését később szekvenálással még pontosabbá is tehetjük.

1.1.2. A RAPD módszer

Az egyik legelterjedtebb multilókuszos technika a RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). A RAPD módszernél nem szükséges az adott fajból előzetes szekvencia információ, mely megmagyarázza miért olyan népszerű a genetikai diverzitás térképezésénél a molekuláris ökológiában. Ehhez az is hozzájárul, hogy az előzőeknél kisebb költséggel járó módszer, azonban nagy technikai kihívást is jelent, megbízható eredményekhez csak akkor jutunk, ha megfelelő ismételhetőséggel tudjuk végezni a kísérleteket.

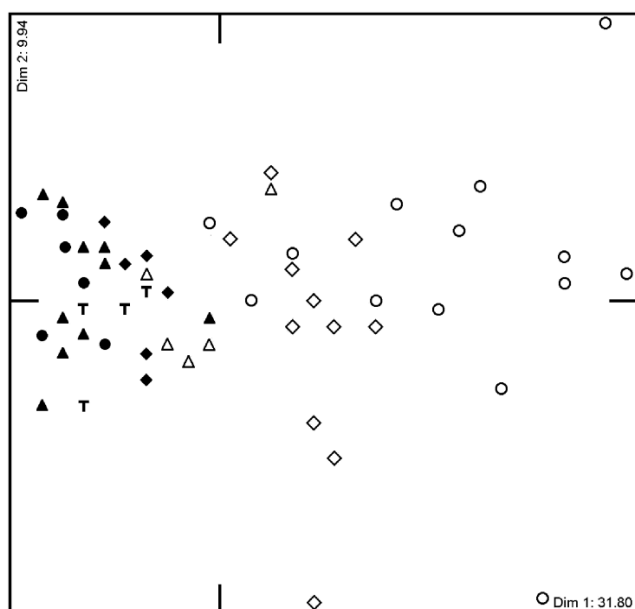
A RAPD (Williams *et al.* 1990, Welsh & McClelland 1990), az egyik legáltalánosabban használt PCR alapú genetikai újlenyomat előállítására alkalmas eljárás. Ezzel a módszerrel képesek vagyunk detektálni a szekvencia szintű polimorfizmusokat a genomban, tetszőleges szekvenciájú primerekkel. RAPD markerek sikeresen alkalmazhatóak a gének vagy genomi régiók kapcsoltságának kiderítésére csoportszegregációs analízissel (Michelmores *et al.* 1991, Törjék *et al.* 2002) és genetikai térképezéssel (Williams *et al.* 1993). Ez az eljárás szintén széles körben alkalmazott genetikai variabilitás detektálására, mint például genetikai analízisre az egyedek illetve a populációk szintjén, keresztezési ráta vizsgálatára és filogenetikai kapcsolatok kiderítésére (Kresowich *et al.* 1992, Kiss *et al.* 2001).

A RAPD módszernél véletlenszerű összetételű rövid (10-mer hosszúságú) primereket használunk amplifikációra a tisztított genomi DNS mintákon. A kapott DNS fragmenteket gélelektroforézissel megfelelően szétválasztjuk, a mintázatot értékeljük. A rövid primerekkel végzett PCR precíz kivitelezést kíván, máskülönben megbízhatatlan amplifikációkat kapunk. Csak az ismételt kísérletekben megbízhatóan amplifikálódó fragmenteket vonjuk be a vizsgálatba, ezek egyedi jelzést kapnak, és jelenlétük vagy hiányuk jelzi az adott egyedben, populációban a vizsgált lókuszt jelenlétét vagy hiányát. Az így generált adathalmaz megfelelő statisztikai kiértékelésével kaphatjuk meg a válaszokat a diverzitásról a feltett kérdésekre.

1.1.3. A RAPD alkalmazása a gyakorlatban

1.1.3.1. Nemesített és vad típusú növények összevetése

A RAPD módszert előszeretettel használják a nemesített növények genetikai állományának összehasonlítására a vad típusával, annak megállapítására, hogy mennyire különül el ez utóbbtól a domesztikálódott csoport. Az Afrikában természetesen tehénborsó (*Vigna unguiculata*) genetikai variabilitásának leírása során (Ba *et al.* 2004) például kimutatták, hogy a nemesítéssel a termesztett fajta genetikai állománya és a genetikai variabilitása eltér a vad típusétól. A vad típus karakterizálása során összesen 198 RAPD fragmentet detektáltak, melyből 181 bizonyult polimorfnak a 30 vad csoport között, míg a 26 termesztett csoport 146 RAPD fragmentet adott, melyből 108 mutatott polimorfizmust. A két csoport 142 RAPD lókuszbán mutatott egyezést, amíg 56 fragment csak a vad csoportban volt jelen, addig a termesztett csoport csak 4 lókuszbán mutatott különbséget. Az adatok ábrázolására és értékelésére UPGMA és Neighbour joining módszereket használtak, és mindkét dendrogram megegyezett abban, hogy a két csoport jól elkülönült egymástól. Hasonló képet kaptak az ún. PCO-val (Principal Coordinate analysis), melyet az 1. ábra szemléltet.



1. ábra. A tehénborsó (*Vigna unguiculata*) vadon élő és termesztett csoportjainak elkülönülésének bemutatása PCO segítségével. A kitöltött és a „T” alakzatok a termesztett, az üregek a vad típusokat reprezentálják (Ba *et al.* 2004).

Az ábrán az is látszik, hogy a két nagy csoport egyértelmű szétválása mellett a vad típusú csoportok egymástól is jobban elkülönülnek, míg a termesztett csoportok egymáshoz is jobban hasonlítanak.

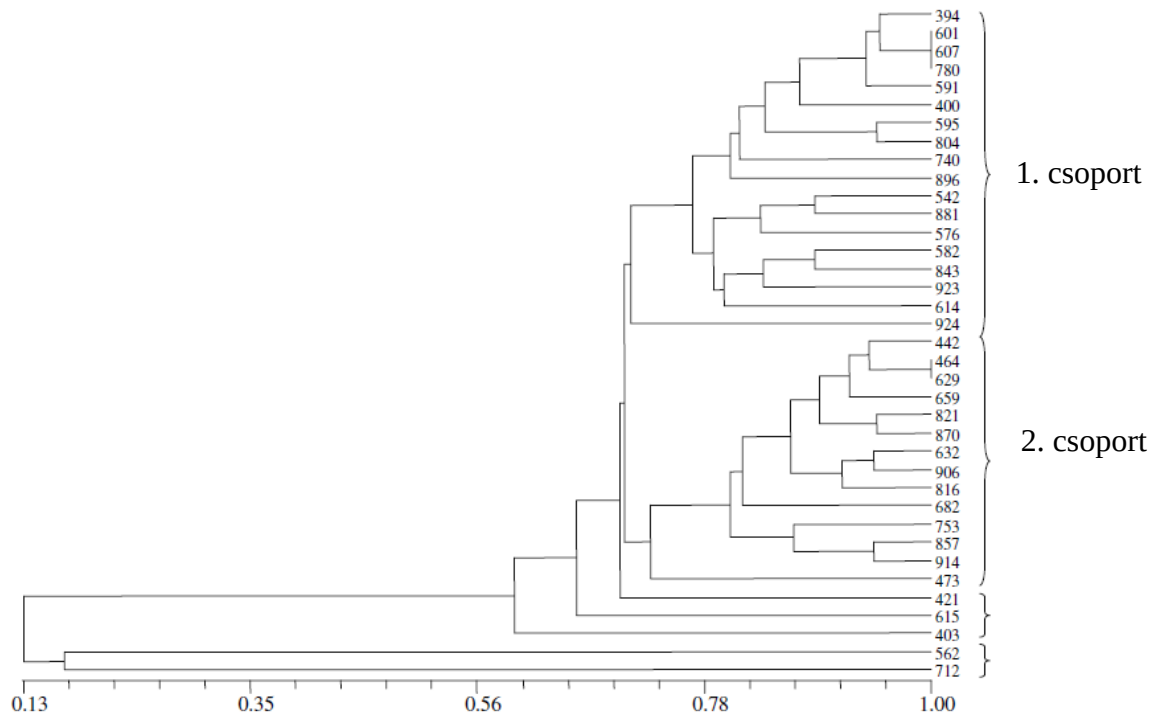
1.1.3.2. Felhasználási példák az ökológiában

A molekuláris ökológiában számos példát találunk a RAPD használatára, melyek közül a biodiverzitás monitorozása és a populációk szerkezetének leírása a legjelentősebb.

A Himalájában élő, ajakosok családjába tartozó és veszélyeztetett *Eremostachys superba* populációinak vizsgálata során a kutatók (Verma *et. al.* 2007) hat populációt vizsgáltak RAPD módszerrel. Az adatokat a genetikai távolságokon alapuló Neighbour joining (Saitou 1987) módszert alkalmazva kimutatták az egyik populáció nagyfokú elkülönülését a többitől. Mantel tesztet (Mantel 1967) alkalmaztak arra, hogy a földrajzi és genetikai távolság közötti kapcsolatra fényt derítsenek. A Mantel teszt rámutatott, hogy a genetikai és fizikai távolság között erős az összefüggés ($r = 0.9033$), de a korreláció nem volt szignifikáns a 95 %-os konfidencia intervallumban.

Egy másik tanulmány során az Észak – Vietnámban élő *Flemingia macrophylla* populációinak vizsgálata során 37 élőhelykomplexből gyűjtöttek mintákat, melyek egy része alföldi, másik része lejtős területekről származtak (Heider 2007). A RAPD kísérletek kiértékelését nyolc primerrel kapott mintázatokból végezték el és 47 RAPD lókuszt vizsgáltak, melyből 38 bizonyult polimorfnak. A genetikai távolságokat a Jaccard féle hasonlósági koefficiensből számították, és ezen koefficiens segítségével készítettek UPGMA dendrogrammot, mely a 2. ábrán látható. A nagyszámú polimorf RAPD lókuszok ellenére az átlagos hasonlósági index ($JSC = 0.67$) alapján a csoportok nem mutattak nagyfokú elkülönülést. Az UPGMA módszerrel azonosítottak nagymértékben elkülönülő csoportokat az alacsonyabb, illetve magasabb helyről származó minták között. Mantel tesztel nem mutattak ki korrelációt (Mantel teszt: $R = 0.21$; $P = 0.016$), mely azt mutatja, hogy a csoportok elkülönülése nem a földrajzi távolságuknak köszönhető. Egyértelmű az elkülönülés a 300 méteres tengerszint feletti magasságtól lentebb és fentebb élő csoportok között, és a kutatók felhívták a figyelmet

arra, hogy ennek valószínűleg a génáramlás hiánya lehet az oka, és a faj védelmének szempontjából ez nem elhanyagolható.



2. ábra. A lejtőn (1. csoport), illetve az alföldön (2. csoport) élő *F. macrophylla* populációk elkülönülését bemutató UPGMA dendrogram (Heider 2007).

Az irodalomban már leírt példák alapján elmondható, hogy a populációk szerkezetének leírására és a csoportok elkülönülésének detektálására rendelkezésre állnak jól használható módszerek. A molekuláris biológiai technikákkal nyert adatsorok segítségével a genetikai távolság kiszámítására több módszer is alkalmazható (például: Nei's és Jaccard féle), és az ezeken alapuló UPGMA és a Neighbour joining jól ábrázolja a csoportok esetleges elkülönülését. A csoportok elkülönülésének ábrázolására a PCO is jól használható. Az kapott genetikai elkülönülések és az aktuális földrajzi távolság lehetséges korrelációjának feltárására a Mantel teszt alkalmazható. Ezen tesztek elvégzése elegendő a populációk szerkezetének leírására, illetve a földrajzi távolságtól eltérő hatások indikációjának kimutatására.

2. A munka közvetlen előzményei és célkitűzések

Munkánk egy nagyobb projekt része, melynek célja, olyan, a Pannon Ökorégióra jellemző fajok kiválasztása és diverzitás vizsgálata, melyek jól reprezentálják élőhelyüket, illetve jó indikátorai az emberi zavarásnak. A projekten belül a mi munkánk a homoki ternye (*Alyssum tortuosum*) különböző homokbuckás populációinak RAPD markerekkel történő molekuláris genetikai jellemzése.

A faj kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy a Pannon Ökorégióra jól jellemző faj legyen, endemikus faj legyen, de legalább a régióra jellemző valamely élőhelykomplexben általánosan előforduló fajok közül kerüljön ki. A faj taxonómiai szempontból tisztázott legyen, illetve a terepi mintagyűjtést megkönnyítendő, jól felismerhető legyen ugyanakkor kellően változatos legyen, de alfajokra ne különüljön. Fontos szempont volt továbbá, hogy a faj kellően nagymértékben reagáljon a zavarásra, de ellenálló is legyen vele szemben (ne pusztuljon ki, ennél fogva vizsgálható legyen).

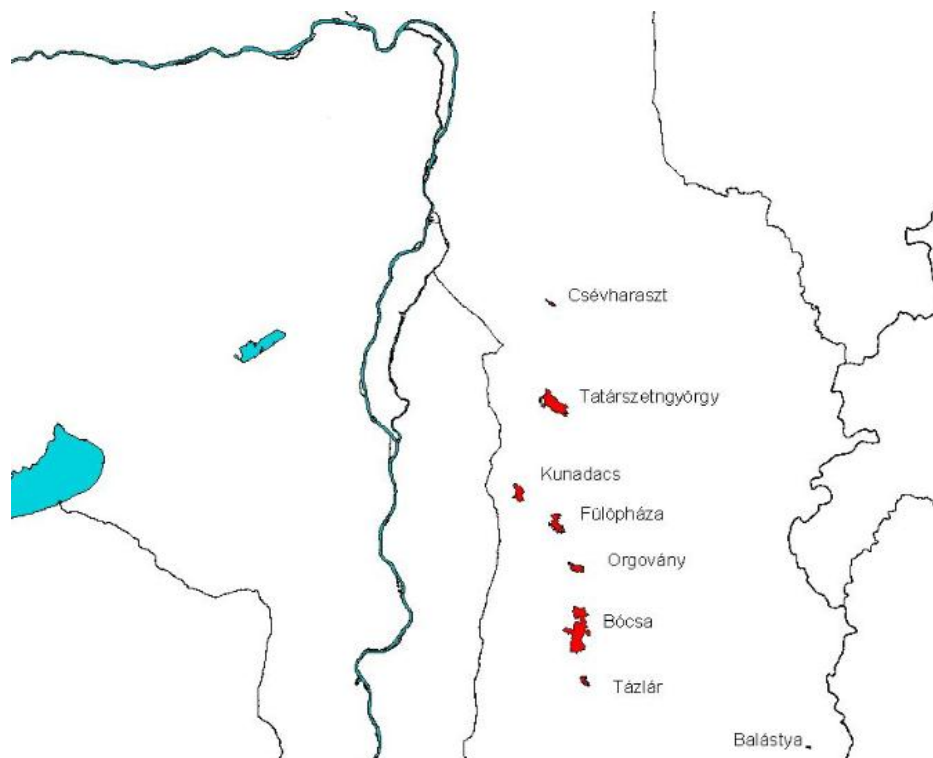
Ezen iránymutatók figyelembevételével került kiválasztásra a homoki ternye (*Alyssum tortuosum*). A homoki ternye a keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) csoportjába tartozó apró termetű, általában erősen elágazó félcserje, 10 – 30 cm magasra nő, gyakran elheveredő habitusú. Nyílt és enyhén záródó homokpusztagyepekben él, illetve dolomit és mészkősziklagyepekben, igen jól bírja a szárazságot és a tűző napot. Régóta tiszta, önálló fajnak tekintik. A fajt különböző élőhelyeken azonosítottuk és célunk minél teljesebb körű morfológiai, és molekuláris markerekkel történő jellemzése. A morfológiai jellemzést másik kutatócsoport végzi, így jelen dolgozat ezt nem tartalmazza. .

Jelen munka célja az volt, hogy a rendelkezésünkre álló eszköztár segítségével, RAPD markerek felhasználásával elvégezzük a vizsgálatban résztvevő homoki ternye populációk molekuláris jellemzését. A faj populációiból gyűjtött mintákon elvégzett kísérleteknél a populáción belüli és a populációk közötti genetikai variabilitásának a leírását tartottuk szem előtt. Ugyanakkor arra kerestük a választ, hogy a faj miképpen reagál az emberi zavarásra a genetikai állományában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A vizsgált homoki ternye populációk

A vizsgálatba bevont populációk a Duna – Tisza közti homokbuckás területekről kerültek kiválasztásra. A kiválasztott nyolc, méretében és tulajdonságaiban eltérő populációt az 3. ábra szemlélteti. A kiválasztott populációk közül a bócsai, fülöpházai és a csévharaszi populáció a legnagyobb, emberi zavarásoktól mentes, illetve az előfordulási területükön összefüggő foltokban fordultak elő, méretük százezres nagyságrendben mérhető. A tatárszentgyörgyi és az orgoványi populációk 5 és 10 ezer egyedet tartalmaztak, emberi zavarásnak közepesen kitett, foltokban feldúsuló populációk, a kunadaci populáció csak méretében különbözik az előbbiektől, 1 és 5 ezer közötti egyedet számlált. A tázlári és a balástyai populációk erősen legeltetett területeken fordultak elő, a populációk erősen degradáltaknak bizonyultak. A balástyai populáció mérete 40 egyedet, a tázlári területen 80 egyedet sikerült találni.



3. ábra. A homoki ternye (*Alyssum tortuosum*) vizsgált populációinak elhelyezkedése a Duna – Tisza közén. A tájékozódás megkönnyítése érdekében feltüntettük a térképen Magyarország vízrajzát.

3.2. Homoki ternye mintagyűjtés

A mintagyűjtéseket a nyári vegetációs periódusban végeztük Lhotsky Barbara vezetésével. A mintagyűjtéseknél törekedtünk az egyedek elkülönítésére, mégpedig úgy hogy az egy összefüggő kicsi foltból csak egy növény (lehető legfiatalabb) leveleit gyűjtöttük, a következőt távolabbról szedtük, elkerülendő hogy azonos klónok legyenek.

Az egyes populációkon belüli adott területeken elkülönítettük a szubpopulációkat a foltok elkülönülése alapján, és szubpopulációként 10 egyedet gyűjtöttünk. A tázlári és a balástyai populációk oly mértékben voltak degradáltak, hogy a begyűjtött kevés egyed is egy kicsi foltban helyezkedett el, így onnan összesen csak 10 egyedet sikerült gyűjteni. A populációkon belül a szubpopulációk elhelyezkedése és az egyedek ábrázolása, valamint a RAPD vizsgálatba bevont szubpopulációkat a mellékletekben tüntettük fel.

3.3. Genomi DNS tisztítás

A növényi minták szárított leveleiből 5 db-ot dörzsöltünk el 275 µl CTAB extrakciós pufferben (2% CTAB, 0,1 M TRIS (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,5 % β-Merkaptoetanol) kvarchomok segítségével, majd 56 °C-os vízfürdőben 1 óráig inkubáltuk. Ezt követően 5 perces centrifugálás (15000 rpm) után a felülúszót leszívtuk, majd a DNS izolálást oszlopon folytattuk a gyártó által megadott protokoll szerint. A kapott DNS minta minőségét és mennyiségét agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük (1 %-os gélen), majd a mintákat a megfelelő módon hígítottuk a RAPD-hez szükséges koncentrációra.

3.3.1. RAPD reakciók

A RAPD primerekkel végzett PCR reakciók alapjául a Williams *et. al.* (1990) által leírt módszer szolgált. A RAPD reakcióelegy összetétele a következőképpen állt össze: 25 ng növényi DNS minta, 5 pmol RAPD primer és 1 unit Taq polimeráz enzim 25 µl 1x Taq polimeráz pufferben, amely tartalmazott 200 µM mindegyik dNTP- ből és

2,5 mM MgCl₂-ot. A RAPD PCR reakció egy 4 perc hosszúságú 94 °C- os denaturációs lépéssel kezdődött, és egy ugyancsak 4 perc hosszúsági 72 °C-os fázissal zárult. A két fázis között 40-szer ismétlődtek a következő ciklusok: 94 °C 5 másodpercig, 37 °C 1 percig és 72 °C 1 percig. A tesztelésnél használt 60 db 10-mer primer mindegyike különböző nukleotid sorrendű volt, a közös bennük az volt, hogy legalább 60 % volt a G – C tartalmuk. A 60 primer az OPAA 1 – 20, OPAB 1 – 20 és az OPAF 1 – 20, mely számozás a gyártótól származik (Operon technologies, Alemada, California, USA). A részletes RAPD elemzéshez a következő 10 primert használtuk: OPAE 15 (TTCCGAACCC), OPAF 04 (GGTGATCAGG), OPAF 06 (GGGAATTTCGG), OPAF 14 (TGCTGCAGGT), OPAB 02 (TGATCCCTGG), OPAB 07 (GGTGACGCAG), OPAB 09 (TGGGGGACTC), OPAB 10 (CTGCTGGGAC), OPAB 14 (TCCGCTCTGG), OPAB 18 (CCACAGCAGT). A PCR reakciókat PTC-100 (MJ Research) termocyclerrel végeztük. A PCR reakciók elvégzése után a reakcióelegyet 2 %-os agaróz gélre vittük fel, és a fragmentek szétválasztásához megfelelő hosszan végeztük a gélelektroforézist. A DNS-t Etídium-bromid festéssel és UV fény segítségével tettük láthatóvá, a gélfotókat a Kodak Molecular Imaging Software version 5.0 segítségével készítettük. A reakciók fragment mintázatát vizuálisan értékeltük.

A RAPD reakciókban kapott DNS fragment mintázatok megbízhatóságát ismételt reakciókban igazoltuk. A megbízhatóan amplifikálódó fragmenteket egyedi jelzéssel láttuk el.

3.4. Statisztikai módszerek

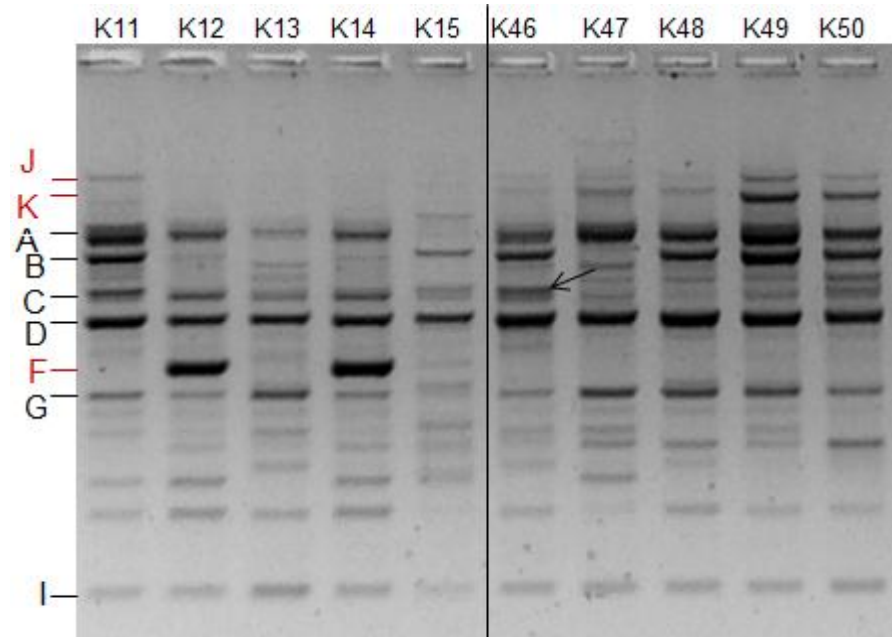
Az adatok feldolgozásához a Microsoft Excel és a Past ver. 2.17. (Hammer 2001) programokat használtuk. A RAPD reakciókban kapott DNS fragmentmintázatokat binárisan kódoltuk (1 = fragmentum jelenlét; 0 = nemlét), az egyes primerekhez tartozó adatokat külön Excel táblázatokba vittük, majd ezeket összesítettük. A genetikai távolság (Nei's 1972) kiszámítására és a statisztikai próbák elvégzésére a Past programot használtuk. A populációk elkülönülésének vizsgálatára UPGMA és Neighbour joining klaszteranalíziseket, valamint PCO-t (Principal Coordinate analysis) végeztünk szintén a Past program segítségével. A földrajzi és a genetikai távolság korrelációjának vizsgálatára Mantel tesztet végeztünk el az Excel XLSTAT bővítménye segítségével.

4. Eredmények és megvitatásuk

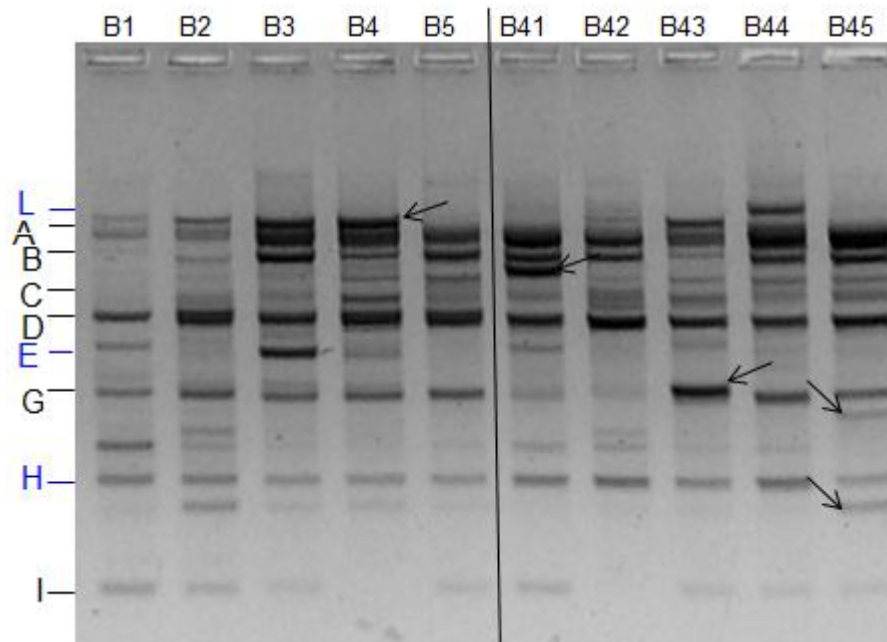
4.1. A kísérleti körülmények optimalizálása

Kísérleteink célja a homoki ternye különböző élőhelyekről származó mintáinak genetikai változatosságának jellemzése volt molekuláris (RAPD) módszerrel, melyhez célunk volt a leghatékonyabb kísérleti rendszer beállítása. A nyolc helyen gyűjtött 280 egyedi minta egyenkénti vizsgálatát kiváltandó először azt teszteltük, hogy a minták elegyben történő jellemzése milyen összetételben lenne optimális. Mivel a populációk közötti eltérések mellett a populációkon belüli különbségek kimutatására a megfelelően megválasztott szubpopulációk vizsgálata is elegendő adatot szolgáltat, így eszerint állítottuk össze a teszteket. Az első lépésben néhány egyedi növény DNS mintájával végzett RAPD mintázatot hasonlítottuk össze az egyedi DNS mintákból készített elegyeken, ahogy ezt a 4. és 5. ábrák szemléltetik. A RAPD reakciók során kapott DNS fragment mintázatokban a megbízhatóan amplifikálható fragmenteket egyedi betűjelzésekkel láttuk el, a különböző gélek mintázatain ezeket megfeleltettük egymásnak és így követtük az egyes fragmentek jelenlétét, illetve hiányát az egyedi (4. ábra), és az elegyeken (5. ábra) végzett reakciókban. Jól látható, hogy az adott primerrel végzett RAPD reakcióban számos megbízhatóan amplifikálódó fragmentet reprezentálnak az elegyek (fragmentek A-L), ezen fragmentek között az szubpopulációkban azonos (fekete betűjelű) és eltérő fragmentek (színes betűjelű) is vannak. Az is kiderült a kísérletekből, hogy néhány (az 5. ábrán nyilakkal jelölt) fragment csak az egyedi DNS mintákon végzett reakciókban mutatkozik meg, az elegyekkel nem, ám ezek számát az elegyek alkalmazásával nyert információ mellett nem tűnt szignifikánsnak. Az 5. A ábrán látható egy kísérlet, melyben vizsgáltuk, hogy egy adott szubpopulációt vajon megfelelően reprezentál-e egy 5 egyedből álló eled. A kunadacsi K41-45, K46-50, valamint a K41-50-nek nevezett tíz egyedi DNS mintából készített elegyeken végzett RAPD nagyban megegyező eredménye nem mutatott érdemi különbséget. Mindent összevetve úgy ítéltük meg, hogy az egy szubpopulációból származó öt egyedi DNS minta elegyei megfelelően reprezentálják az adott szubpopulációt a tervezett összehasonlításokhoz.

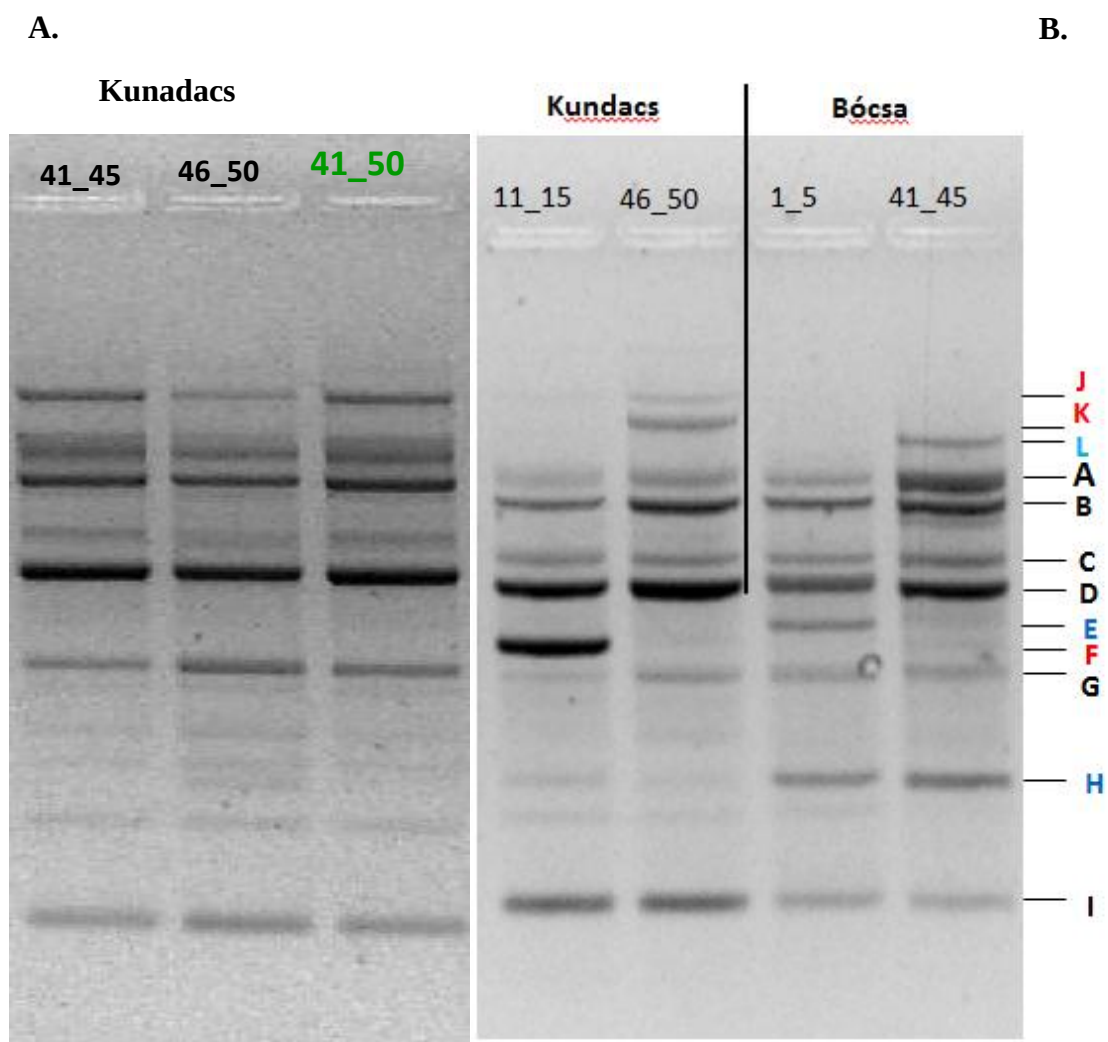
A.



B.



4. ábra. Az OPAB18 primerrel egyedi DNS mintákon végzett reakciók gélképe. Az ábra **A.** részében a „K” jelű minták a Kunadacsból származó, míg **B.** részben a „B” jelzésűek a bócsai populációból származnak. Az A – L jelzésű fragmentek a jól ismételterően amplifikálódó fragmenteket jelölik, melyek az elegyekben is jelen vannak. A piros, illetve kék jelzésű fragmentek az elegyekben polimorfnek bizonyuló fragmentek. Nyilakkal jelöltük azokat a fragmenteket, amelyek csak az egyedi DNS mintákkal végzett reakcióban azonosítottunk.



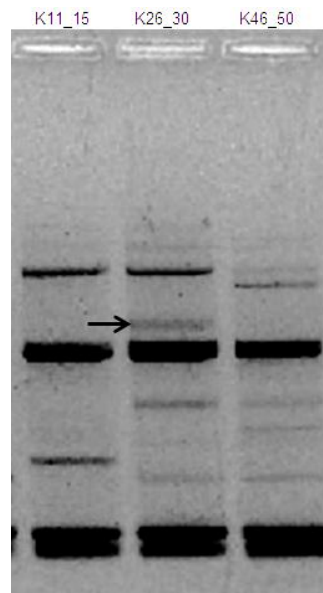
5. ábra. Az OPAB 18 primerrel végzett RAPD kísérlet egyedi DNS minták elegyein.

A. A Kunadacsról származó egyedek 5 tagú, illetve 10 tagú elegyein végzett RAPD mintázatok összehasonlítása. K41-45, K46-50, K41-50.

B. A Kunadacsról származó elegyek: K11-15 (11, 12, 13, 14, 15 sz. egyedek) K 46-50 (46, 47, 48, 49, 50 sz. egyedek) egyedeinek, valamint a Bócsáról származó elegyek: B1-5 (1, 2, 3, 4, 5 sz. egyedek) és B41-45 (41, 42, 43, 44, 45 sz. egyedek) RAPD mintázata. A-L-ig terjedően jelöltük a fragmenteket a 4. ábránál leírtak szerint. A polimorfizmust mutató fragmentek közül pirossal jelöltük a kunadacsi populációban megjelenő, míg kék jelzéssel a bócsai populációban jelen lévő fragmenteket.

A következő felmerülő kérdés, hogy vajon egy populáción belül hány szubpopuláció elegyén végzett RAPD reprezentálja megfelelőképpen a populáció

fragmentösszetételét a más populációkkal való összevetésben, illetve melyekkel lehet a populációkon belüli diverzitást is jellemezni. Értelemszerűen először a populációkon belül két, egymástól távol eső szubpopulációt választottunk ki az öttagú DNS elegyek elkészítéséhez, majd egy harmadik, „közbülső” szubpopuláció egyedeiből is készítettünk elegyet. Több primerrel és két populációban is vizsgálatokat végeztünk, melynek eredményeként megállapítottuk, hogy a két, egymástól távol eső szubpopulációhoz képest a harmadikként bevont szubpopuláció nem eredményezett számottevő új fragmentet. Egy példát erre a 6. ábra szemléltet. Úgy ítéltük meg, hogy vizsgálatainkhoz egyelőre két, egymástól távol eső szubpopuláció elegye elegendő mértékben reprezentálja az adott populációt.



6. ábra. Az OPAB 14 primerrel elvégzett PCR reakciók képe. A K jelű elegyek a kunadacsról származó 11-15, 26-30 és 46-50-es számú egyedeiből készültek. Nyíllal jelöltük azt a fragmentet amely a harmadik elegy bevonásával jelent meg.

A fenti eredmények tükrében elmondható, hogy bár az egyedi DNS mintákkal kapott RAPD mintázatok a legrészletesebbek, az elegyek használata megfelelő számú és

minőségű fragmentet eredményez, melyek alkalmasak a populációk összehasonlítására, illetve költséghatékonyabb is. Továbbá az 5 egyedből álló elegy megfelelően reprezentálja az adott szubpopulációt. Két szubpopuláció elégséges mértékben képviseli az adott populációt. Ezen eredmények tükrében végeztük el a homoki ternye nyolc populációjának összehasonlítását.

4.2. RAPD reakciók és elsődleges értékelésük

Miután meghatároztuk, hogy a Homoki ternye mely DNS elegyeit akarjuk vizsgálni RAPD reakciókban templátként, egy másik fontos összetevőt, a használandó primereket is kiválasztottuk. Hatvan különböző 10-mer primert teszteltünk (lásd Anyagok és Módszerek fejezet) két-két templáton. A primerek kiválasztásánál a primer által generált fragmentek számát és megbízhatóságát tartottuk szem előtt, melyet ismétlésben teszteltünk. Ennek eredményeként 10 primert választottunk ki, melyekkel elvégeztük a RAPD reakciókat mind a 14 DNS elegyen megfelelő ismétlésekkel. Az így kapott RAPD fragment mintázatokon a fragmenteket egyedi azonosítóval láttuk el és primerenként minden egyes mintaelegy fragmentösszetételét táblázatban rögzítettük. Ezáltal azonosíthatók lettek az egyes mintaelegyek közt polimorfizmust mutató fragmentek, és azok is, melyek mindegyik mintában megtalálhatók voltak (azonos vagy monomorf fragmentek). Az ily módon a fragmentek különböző szubpopulációkban jelenlétéről, illetve hiányáról kapott adatokat táblázatos formában összesítettük.

A használt tíz primer által a 14 mintaelegyen kapott fragmentek számát, illetve a detektált polimorfizmusok mennyiségét az 1. táblázat szemlélteti.

Primer kód	szekvencia	Kapott fragmentek száma		
		Polimorf	Monomorf	Σ
OPAE 15	TTCCGAACCC	11	2	13
OPAF 04	GGTGATCAGG	8	6	14
OPAF 06	GGGAATTTCGG	17	3	20
OPAF 14	TGCTGCAGGT	6	2	8
OPAB 02	TGATCCCTGG	15	3	18
OPAB 07	GGTGACGCAG	9	4	13
OPAB 09	TGGGGGACTC	13	4	17
OPAB 10	CTGCTGGGAC	7	1	8
OPAB 14	TCCGCTCTGG	14	3	17
OPAB 18	CCACAGCAGT	17	4	21
Összes		117	32	149
PFA (%)		78.5		

1. táblázat. Az egyes primerekkel a 14 mintaelegyen végzett RAPD reakciókban kapott fragmentek száma, megoszlása, illetve a detektált polimorf fragmentek aránya (PFA).

Az egyes RAPD primerek által kapott mintázatokot aztán a vizsgált szubpopulációk szerint összesítettük egy összefüggő adatsort kapva ezzel a mintaelegyenkénti fragmenteloszlásról.

Az Excel táblázatban vezetett összesítő táblázatot a Past programba beolvasva kiszámítottuk a vizsgált szubpopulációk közötti hasonlóság mértékét a Nei's féle koefficiens alapján. Így megkaptuk a mintaelegyek által reprezentált szubpopulációk közötti genetikai távolságok mátrixát, melyet a 7. ábra szemléltet.

	K11-15	K46-50	B1-5	B41-45	C1-5	C41-45	F6-10	F36-40	O1-5	O21-25	TS1-5	TS21-25	T1-5	Ba1-5
K11-15	1													
K46-50	0,94	1												
B1-5	0,70	0,70	1											
B41-45	0,73	0,74	0,89	1										
C1-5	0,66	0,67	0,71	0,78	1									
C41-45	0,70	0,71	0,73	0,79	0,92	1								
F6-10	0,66	0,65	0,76	0,79	0,73	0,73	1							
F36-40	0,63	0,65	0,74	0,77	0,71	0,74	0,91	1						
O1-5	0,65	0,63	0,71	0,78	0,73	0,74	0,79	0,77	1					
O21-25	0,61	0,61	0,69	0,74	0,74	0,73	0,77	0,77	0,92	1				
TS1-5	0,66	0,67	0,73	0,78	0,74	0,76	0,77	0,77	0,84	0,83	1			
TS21-25	0,66	0,67	0,71	0,78	0,73	0,75	0,74	0,74	0,83	0,80	0,95	1		
T1-5	0,62	0,63	0,71	0,73	0,71	0,73	0,77	0,76	0,75	0,76	0,81	0,79	1	
Ba1-5	0,60	0,61	0,69	0,73	0,71	0,73	0,75	0,73	0,71	0,72	0,78	0,76	0,86	1

7. ábra. A mintaelegyek közötti genetikai távolság mátrixa. A mátrixon látható elegyek rövidítései: K11-15; K46-50 (Kunadacsról származó szubpopulációk a fentebb leírtak szerint), B1-5; B41-45 (Bócsáról származó szubpopulációk), C1-5; C41-45 (Csévharasztról származó szubpopulációk), F6-10; F36-40 (Fülöpházáról származó szubpopulációk), O1-5; O21-25 (Orgoványról származó szubpopulációk), TS1-5; TS21-25 (Tatárszentgyörgyről származó szubpopulációk), T1-5 (Tázlárról származó szubpopuláció), illetve a Ba1-5 (Balástyáról származó szubpopuláció).

4.3. A populációk szerkezete

A kapott RAPD fragmentek populációkon belüli megjelenését és eloszlását a 2. táblázat mutatja, melyben feltüntettük az adott populációk becsült egyedszámát is.

Bár a 10 primerrel végzett kísérlet során azonosított 149 RAPD fragment közel 80 %-a mutatott polimorfizmust a mintaelegyek között, a populáción belüli polimorfizmus jóval kevesebb, átlagosan 15,2 %-os ($SD \pm 4,12$).

Populáció	BE	Σ	PFSZ	PFSZ%	GT _{pop}	ÁGT
Bócsa	>20000	66	14	21,2	0,89	0,72 (0,69-0,75)
Csévharaszt	>20000	71	11	15,5	0,92	0,7 (0,66-0,74)
Fülöpháza	>20000	75	13	17,3	0,91	0,73 (0,65-0,79)
Kunadacs	1-5000	57	7	12,3	0,94	0,64 (0,6-0,69)
Tatárszentgyörgy	5-10000	76	7	9,2	0,95	0,74 (0,66-0,79)
Orgovány	5-10000	76	12	15,8	0,92	0,72 (0,6-0,79)
Tázlár	80	70	n.a.	n.a.	n.a.	0,74 (0,6-0,86)
Balástya	40	67	n.a.	n.a.	n.a.	0,72 (0,6-0,86)

BE: populáció becsült egyedszáma

Σ : populációban detektált összes RAPD fragment

PFSZ: populáción belül polimorfizmust mutató fragmentek száma

PFSZ%: polimorf fragmentek százalékos értéke

GT_{pop}: populáción belüli genetikai távolság

ÁGT: populáció átlagos távolsága és intervalluma a többi populációtól

2. táblázat. A vizsgált populációk általunk vizsgált primerekkel kapott szerkezete (polimorf fragmentek száma, genetikai távolság), becsült egyedszáma látható.

A 8 populáció vizsgálata során azonosításra került 149 fragment közül átlagosan 69,7 (SD $\pm$ 6,4) fordult elő populációnként. Továbbá az is megfigyelhető, hogy a legváltozatosabb szubpopulációk (bócsai szubpopulációk) is nagyobb hasonlóságot mutatnak, mint a legközelebb álló populációk (Tázlár és Balástya). A Nei's féle genetikai távolság (hasonlóság) a populáción belül 0,88 és 0,95 között mozgott, a populációk között ugyan ez az érték 0,59 (Balástya és Kunadacs között) és 0,86 (Balástya és Tázlár között) volt.

4.4. Statisztikai próbák

A populációk és a populációkat alkotó szubpopulációk egymáshoz való viszonyának leírására és vizualizálására több próbát is alkalmaztunk. A Nei's féle genetikai távolságon alapuló klaszteranalízisek közül az UPGMA és a Neighbour joining módszereket alkalmaztuk

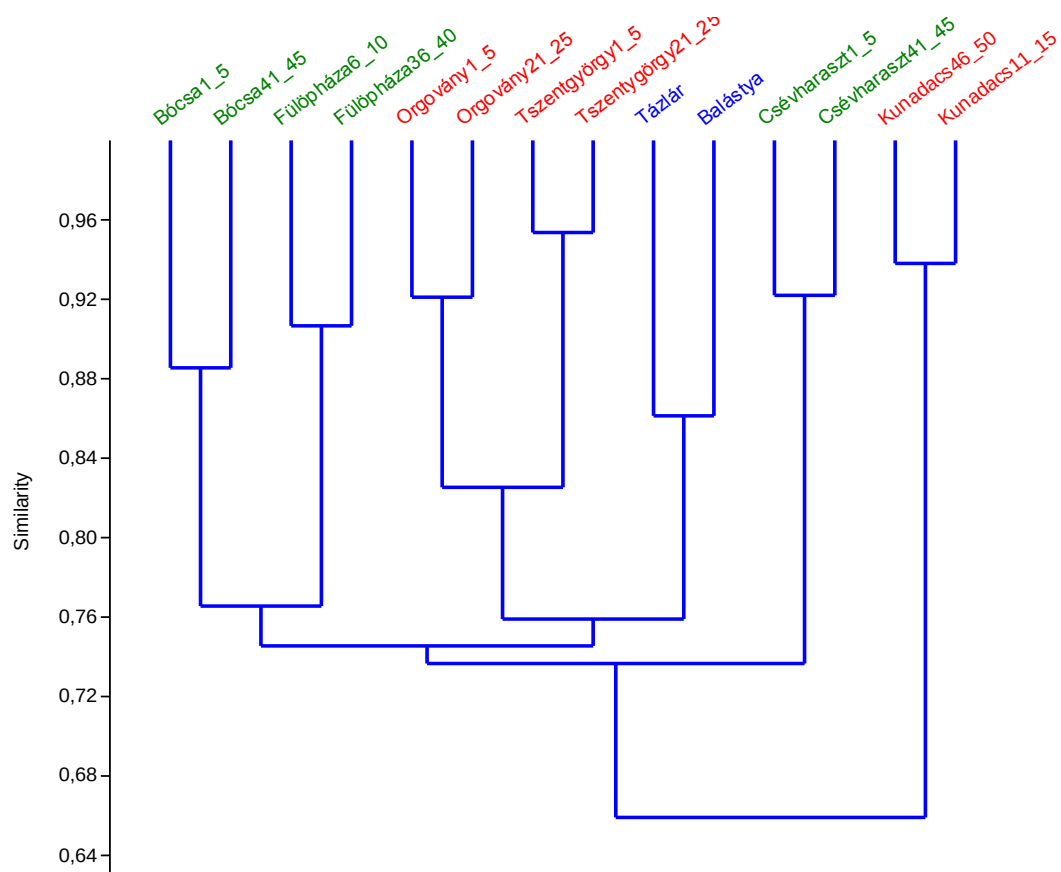
A földrajzi és a genetikai távolság korrelációjának kiderítésére Mantel tesztet végeztünk el. A populációk egymáshoz való viszonyának leírásához egy másik módszert, a Principal Coordinate analysis-t (PCO) is elvégeztük.

4.4.1. UPGMA klaszteranalízis

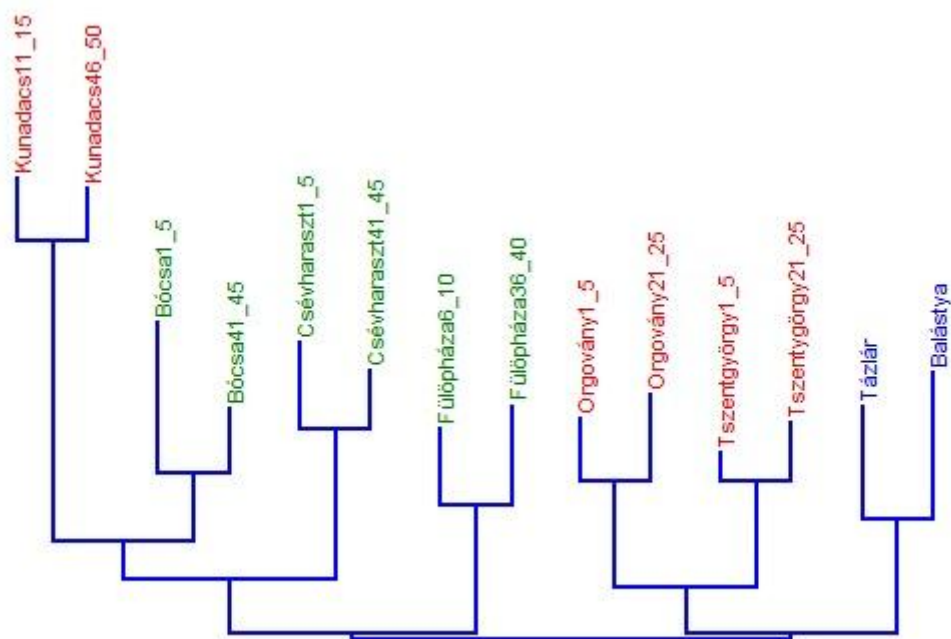
A populációk elkülönülésének leírására a genetikai távolságon alapuló UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) klaszteranalízissel kapott eredményt a 8. ábra szemlélteti. Az ábrán színkóddal jelöltük a populációk csoportosítását. Zöld színnel a zavarásnak kevésbé kitett, piros színnel a közepesen zavart, míg kék színnel az erősen zavart és degradálódott populációkat jelöltük. A dendogrammon jól látszik, hogy a populációk szubpopulációi minden esetben egymáshoz közel kerültek. A dendogrammon a kunadaci populáció korai leválása látszik a többi populációtól. Az erősen zavart populációk hasonlósága is jól látszik, illetve az hogy a két másik közepesen zavart területtel alkotnak közös kládot, de azoktól elválnak. A csévharaszi populáció korai leválása, illetve a további kettő kevésbé zavart populáció csoportosulása olvasható még le a dendogramról.

4.4.2. Neighbour joining

Ugyancsak a genetikai távolságon alapuló módszer a Neighbour joining, mely elsősorban közel rokon csoportok egymáshoz való viszonyának az ábrázolására való. Az általunk vizsgált populációk így kapott dendogramja a 9. ábrán látható.



8. ábra. A Nei's féle genetikai távolságon alapuló UPGMA dendrogram ábrája, a szubpopulációk és a genetikai távolság feltüntetésével.



9. ábra. A Nei's féle genetikai távolságon alapuló Neighbour joining dendrogramja a szubpopulációk feltüntetésével.

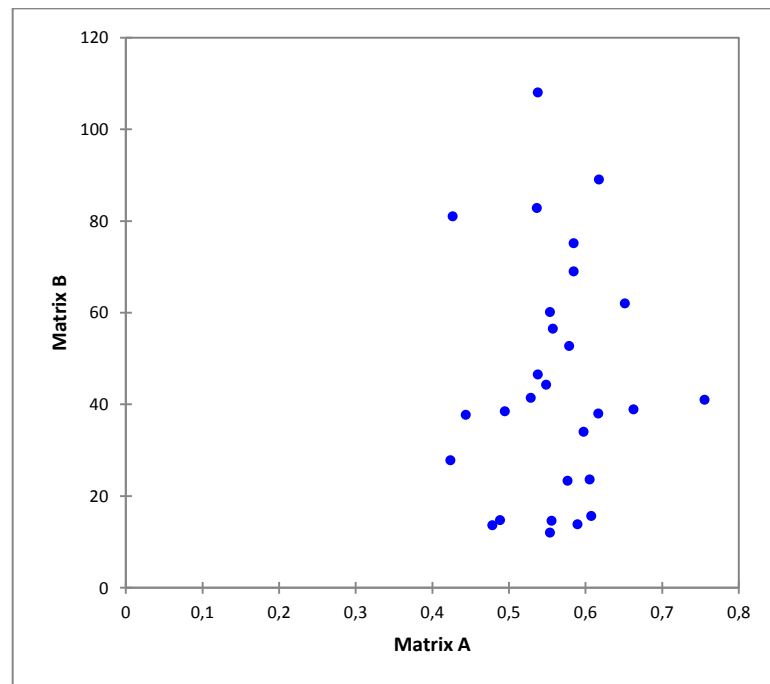
A Neighbour joining módszerrel kapott dendrogram megerősíti az UPGMA módszerrel készült dendrogramot a szubpopulációk hasonlóságában; az orgoványi, tatárszentgyörgyi és a két erősen degradálódott populáció hasonlóságát, illetve azon belül is a két degradálódott populáció elkülönülését. A dendrogramon jól látszik, hogy a 3 kevésbé zavar terület bár egymáshoz közelebb kerültek, mint a többihez, de egymással parafiletikus kapcsolatban vannak. Továbbá láthatjuk a kunadacsi populáció elkülönülését is.

4.4.3. Mantel teszt

A populációk genetikai távolsága mögött álló okok felderítésére Mantel tesztet végeztünk, amellyel a földrajzi és a genetikai távolság korrelációját próbáltuk kideríteni. A 10. ábrán látható a földrajzi távolság mátrixa, míg a 11. ábrán a Mantel teszt grafikus eredménye. A teszt alapján elmondhatjuk, hogy a populációk elkülönülése mögött nemcsak a földrajzi távolság, hanem egyéb tényező(k) is áll(nak) a populációkban detektált különbségek hátterében.

	Kunadacs	Bócsa	Csévharaszt	Fülöpháza	Orgovány	T.szentgyörgy	Tázlár	Balástya
Kunadacs	0							
Bócsa	41,4	0						
Csévharaszt	38,47	75,12	0					
Fülöpháza	13,6	34	44,29	0				
Orgovány	27,8	14,6	60,08	15,6	0			
Tsentedgyörgy	14,7	52,7	23,33	13,8	38,9	0		
Tázlár	37,7	12	82,8	38	23,6	62	0	
Balástya	81	46,5	108	69	56,5	89	41	0

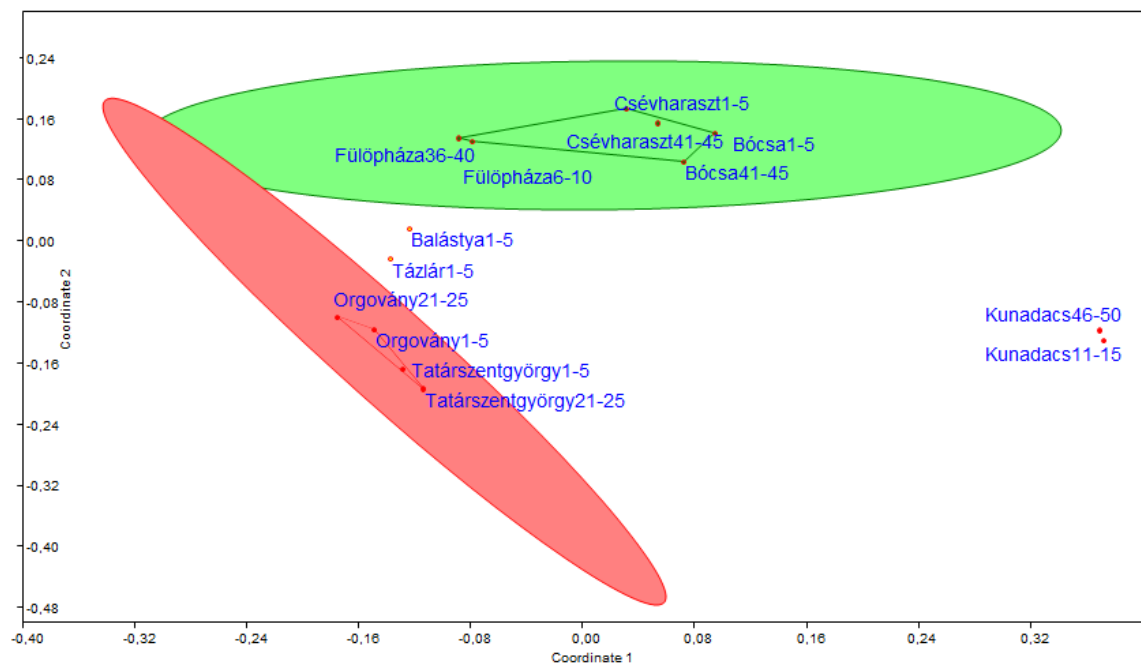
10. ábra. A populációk közötti földrajzi távolság (km-ben értendő).



11. ábra. A Mantel teszt eredménye. Az „A” mátrixon a genetikai, míg a „B” mátrixon a földrajzi távolság szerepel. (Mantel = $R = 0,025$; $P = 0,888$).

4.4.4. PCO

PCO-t alkalmaztunk a populációk csoportosulásának ábrázolására, a feltételezett viszonyok megerősítése céljából. A teszt eredményét a 12. ábra szemlélteti. A PCO megerősíti a klaszteranalízisekkel kapott eredményeket a három nagyméretű populáció (melyet a zöld ellipszisben látható hat szubpopuláció reprezentál) és a két közepes méretű populáció (melyet a piros ellipszisben található négy alpopuláció reprezentál) kapcsolatát illetően, továbbá a kunadaci populáció helyzetét is alátámasztja. A populációk elkülönülése is jól látszik az ábrán, a nagyméretű és a közepes méretű populációk jól láthatóan két csoportra oszlanak, illetve a két kis méretű populáció helyzetét is megerősíti.



12. ábra. A PCO teszt eredménye. Az ellipszisek a 95 %-os konfidenciaintervallumot jelölik. Az 1. koordináta 25%, a 2. 14 %-os megbízhatóságot jelentenek.

5. Eredmények összefoglalása

Munkánk a homoki ternye (*Alyssum tortuosum*) különböző homokbuckás populációinak RAPD markerekkel történő molekuláris genetikai jellemzése volt. A nyolc populációt képviselő 14 szubpopuláción végzett RAPD reakciók mintázatából kapott 149 fragment kiértékelése alapján elmondható, hogy a detektált polimorfizmusok magas száma (78,5 %) elsősorban a vizsgált populációk közötti különbségekből tevődik össze, a populációkon belüli polimorfizmusok száma sokkal kevesebb, átlagosan 15,2 % -os (SD: 4,12). A populációk közötti genetikai hasonlósági értékek is alátámasztják az előbbi megfigyelést, hiszen a populációkon belüli genetikai hasonlóság értéke 0,88 és 0,95 között változott, míg a populációk között ugyanez az érték 0,6 és 0,86. A legváltozatosabb populáción belül is kisebb volt a genetikai távolság, mint a leghasonlóbb két populáció közötti. A populáción belüli legnagyobb polimorfizmust a bócsai populáció esetében detektáltunk, a polimorf fragmentek száma a két vizsgált szubpopuláció között 21,2 %.

Az UPGMA és a Neighbour joining klaszteranalízisekkel kapott dendogrammok rávilágítottak a nagy egyedszámú és zavarásoktól mentes, illetve a zavarásnak kitett közepes, és csekély egyedszámú populációk elkülönülésére, azonban a kunadacsi populáció helyzete némiképp ellentmondásos. Főleg a Neighbour joining klaszteranalízis eredménye azt mutatja, hogy a nagy egyedszámú populációk egymástól jobban elkülönülnek és nem adnak genetikai állományukat tekintve olyan összefüggő képet, mint a kisebb egyedszámú populációk, ez valószínűleg annak tudható be hogy a populációk variabilitása nagyobb. Továbbá érdekes megfigyelés, hogy az erősen zavart élőhelyek mennyire hasonlóvá válnak a populációméretükben bekövetkezett változás hatására, annak ellenére, hogy egymástól távol helyezkednek el. A Mantel tesztel kapott eredmények tükrében kijelenthetjük (Mantel = $R = 0,025$; $P = 0,888$), hogy a populációk genetikai állományukban történő elkülönülés mögött, nemcsak azok földrajzi távolsága áll, hanem egyéb tényezők is befolyásolták azt. PCO-val kapott eredmények alátámasztják a dendogramokkal kapott eredményeket, továbbá a látszik a két csoport elkülönülése, és a két erősen degradált populáció egyértelmű elkülönülése is a két csoporttól, továbbá a kunadacsi populáció ugyancsak megkérdőjelezendő helyzete.

Eredményeink összeegyeztetése a morfológiai paraméterekkel kapott eredményekkel nem képezi jelen dolgozat tárgyát. A két módszerrel kapott eredmények összeegyeztetése, a köztük lévő korrelációs viszonyok megállapítása folyamatban van. Az ily módon integrált eredmények remélhetőleg magyarázattal szolgálnak majd a kunadaci populáció helyzetére is. Mindezek után tervezzük a dolomiton élő homoki ternye populációkkal kiegészített RAPD analízisét és összevetését a dolgozatban szereplő homokbuckás területekről származó populációkkal, mely választ adhat a két eltérő élőhelykomplexben élő növénypopulációk egymáshoz viszonyított helyzetére, valamint mint külső kontrollként is hozzájárulhatnak ezen kísérletben vizsgált populációk helyzetének minél tökéletesebb megértéséhez.

Irodalom

Allan, G. J. & Max, T. L. (2010): Molecular Genetic Techniques and Markers for Ecological Research. Nature Education Knowledge 3 (10):2

Baker, A. J. (ed) (2000): Molecular methods in ecology. Blackwell Science, Oxford, UK

Ba, F. S., Pasquet, R. S., Gepts, P. (2004): Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as revealed by RAPD markers. Genet Resour Crop Evol 51:539–550.

Colbert, T., Till, B. J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M. N., Yeung, A. T., McCallum, C. M., Comai, L. & Henikoff, S. (2001): High-throughput screening for induced point mutations. Plant Physiol. 126: 480-484.

Collins, S. L., Swinton, S. M. & Anderson, C. W. (2007): Integrative Science for Society and Environment: A Strategic Research Initiative. LTER Network Office Publication No. 23. <http://www.lternet.edu/decadalplan/>

Comai, L., Young, K., Reynolds, S. H., Codomo, C., Enns, L., Johnson, J., Burtner, C., Henikoff, J. G., Greene, E. A., Till, B. J., Henikoff, S. (2004): Efficient discovery of nucleotide polymorphisms in populations by EcoTILLING. Plant J 37:778-786.

Ditto, A. M. & Frey, J. K. (2007): Effects of ecogeographic variables on genetic variation in montane mammals: implications for conservation in a global warming scenario. Journal of Biogeography, 34:1136–1149.

EPBRS (2003): European Platform for Biodiversity Research Strategy Recommendations concerning: Genetic biodiversity in natural, agricultural and other economically used systems: measurement, understanding and management. 21-24 November 2003, Florence. (www.epbrs.org)

Frankham, R. (1996): Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conservation Biology, 10:1500-1508..

Fritz, R. S. & Price, P.W. (1988): Genetic variation among plants and insect community structure: willows and sawflies. Ecology 69:845–856.

Hammer, Ř., Harper, D. A. T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Heider, B., Andersson, M. S., Schultze-Kraft, R. (2007): RAPD Variation Among North Vietnamese *Flemingia macrophylla* (Willd.) Kuntze ex Merr. accessions, *Biodivers Conserv* 16:1617–1631.

Hughes, A. R. & Stachowicz, J. J. (2004): Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:8998–9002.

Kiss, J., Kondrák, M., Törjék, O., Kiss, E., Gyulai, G., Mázik-Tőkei, K. & Heszy, L. E. (2001): Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica* 118: 213-221.

Kresowich S., Williams J.G.K., McFerson J.R., Routman E.J. & Schaal B.A. (1992): Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85, 190–196.

Laakso, J., Kaitala, V. and Ranta, E. (2006): Population dynamic consequences of adaptive growth rate in fluctuating environment. *Ecological Modelling*, 194:132-140.

Mace, G., Masundire, H. & Baillie, J. (2005): Biodiversity. *Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends, Volume 1* (eds. Hassan, R., Scholes, R. & Ash, N.) pp. 77-122. Island Press, Washington, Covelo, London. (URL: <http://www.maweb.org/en/Products.Global.Condition.aspx>)

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Res* 27:209– 220.

McCann, K. S. (2000): The diversity-stability debate. *Nature* 405, 228-233.

McKinney, M. L. & Lockwood, J. L. (1999): Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 450–453.

MEA (2005): Millennium Ecosystem Assessment, *Ecosystems and Human Well-Being. Our human planet – Summary for Decision-Makers*. Island Press, Washington D.C. pp. 109.

Michelmore, R., Paran, I. & Kesseli, R. V. (1991): Identification of marker linked to disease resistance gene by bulk segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.

Naeem, S. & Li, S. (1997): Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390, 507-509.

Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283–292.

- Reed, D. H. & Frankham, R. (2003): Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17:230-237.
- Reusch, T. B. H., Ehlers, A., Hammerli, A. & Worm, B. (2005): Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2826-2831.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W. & Hanski, I. (1998): Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392, 491–494.
- Saitou N. & Nei M. (1987): The Neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., Rehill, B. J., Hart, S.C., Lindroth, R. L., Keim, P. & Whitham, T.G. (2004): Genetically based trait in a dominant tree affects ecosystem processes. *Ecol. Lett.* 7:127–134.
- Tilman, D, Wedin, D. & Knops, J. (1996): Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379, 718-720.
- Törjék, O., Bucherna, N., Kiss, E., Homoki, H., Finta-Korpelova, Z., Bócsa, I., Nagy, I., Heszky, L. E.(2002): Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. *Euphytica* 127: 209-218.
- Vellend, M. (2006): The consequences of genetic diversity in competitive communities. *Ecology* 87:304–311.
- Verma S., Karihaloo J. L., Tiwari S. K., Magotra R., Koul A. K. (2007): Genetic diversity in *Eremostachys superba* Royle ex Benth. (Lamiaceae), an endangered Himalayan species, as assessed by RAPD, *Genet Resour Crop Evol* 54:221–229.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 19: 303-306.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J. & Rafalski, J. A (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Williams, J. G., Reiter, R. S., Young, R. M. & Scolnik, P. A. (1993): Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acids Res.* 21: 2697–2702.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Endre Gabriellának a munkám irányításáért, illetve a felmerülő kérdések megválaszolásáért, továbbá a TDK dolgozatban nyújtott segítségéért. Szeretnék még köszönetet mondani az SZBK Genetika Intézet Lucerna Genetika csoport minden tagjának a segítőkészségükért.

Szeretném megköszönni Lhotsky Barbarának a gyűjtésben nyújtott segítségét

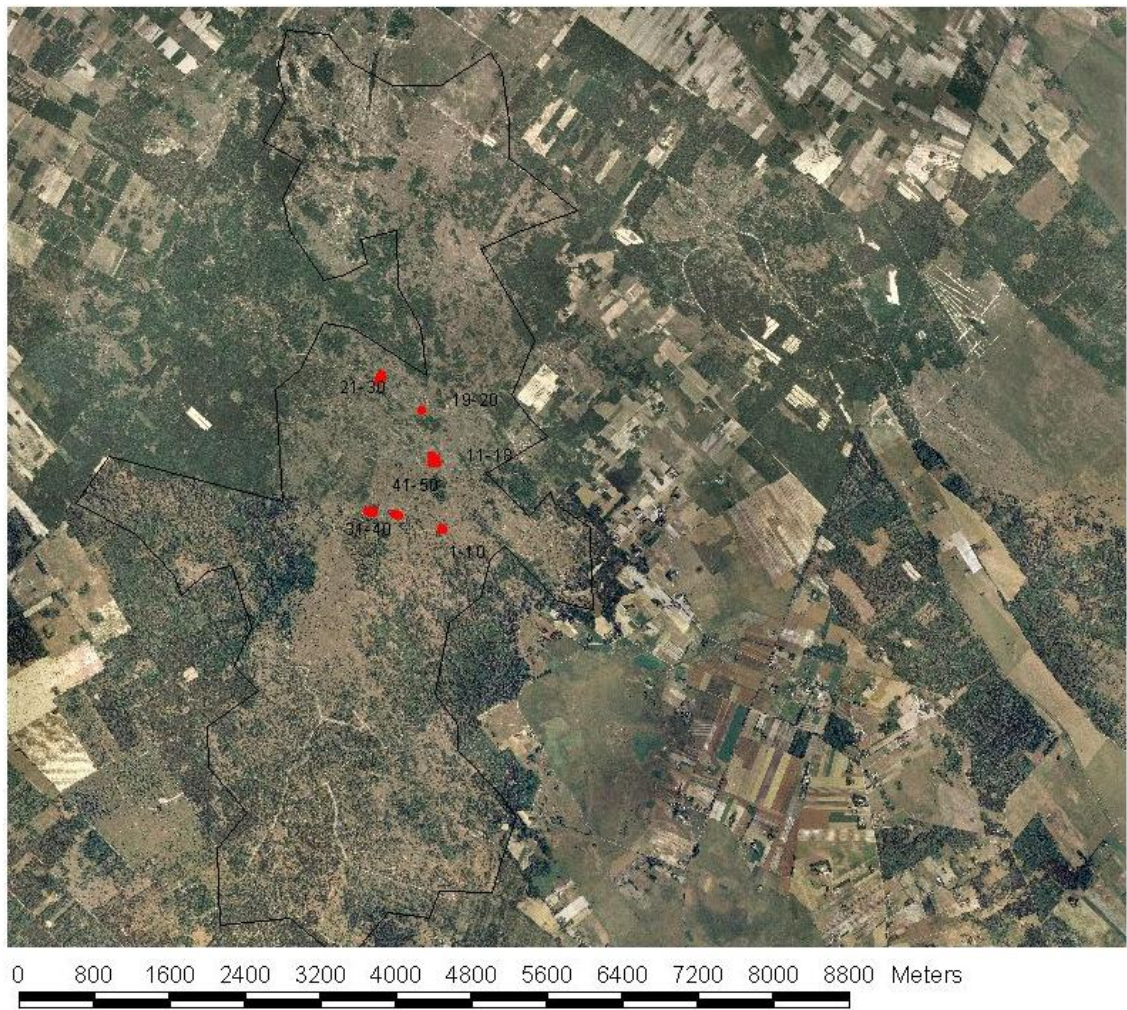
Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Dr. Bagi István egyetemi docensnek, hogy elvállalta a belső konzulens szerepét.

Függelék

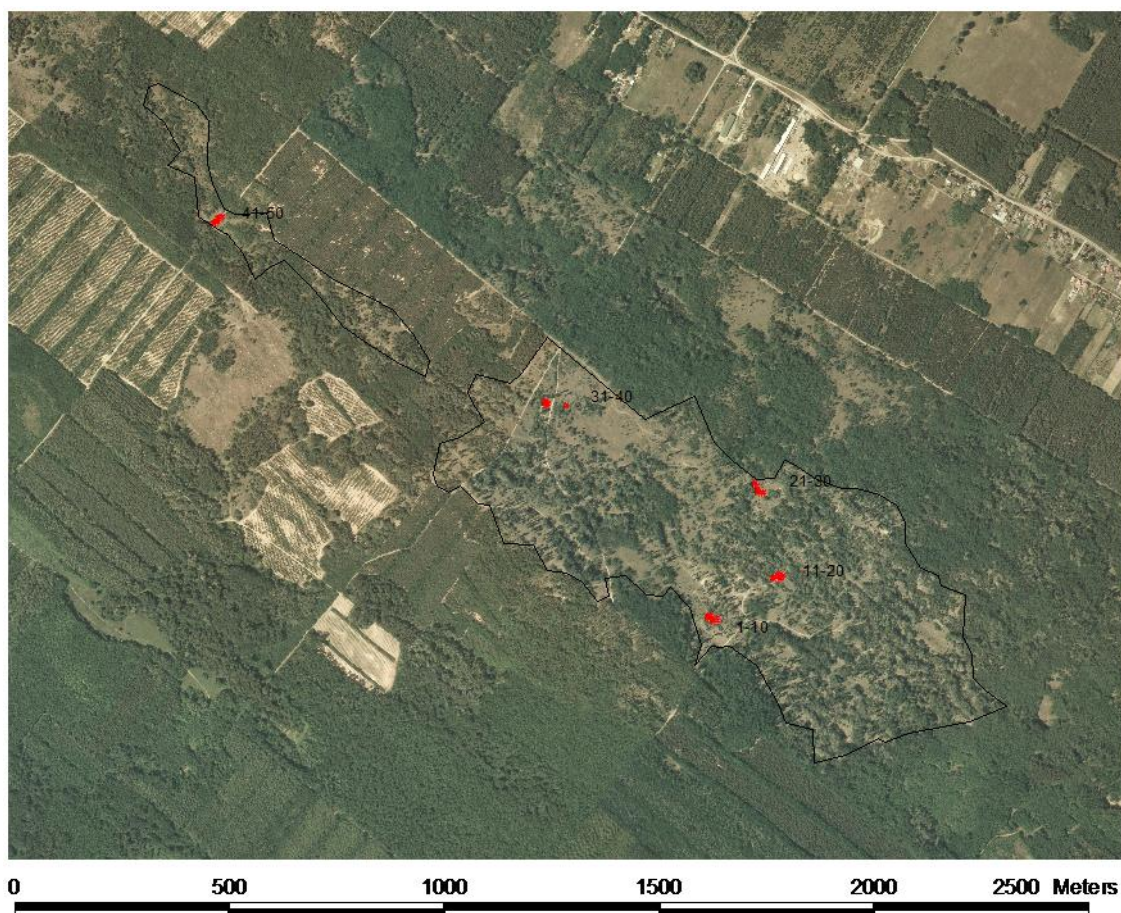
A homoki ternye nyolc populációját mutató térképek. A populációkon belül, a mintavételi szubpopulációk számozással jelöltek az őket alkotó egyedekkel (pl.: 1-10).



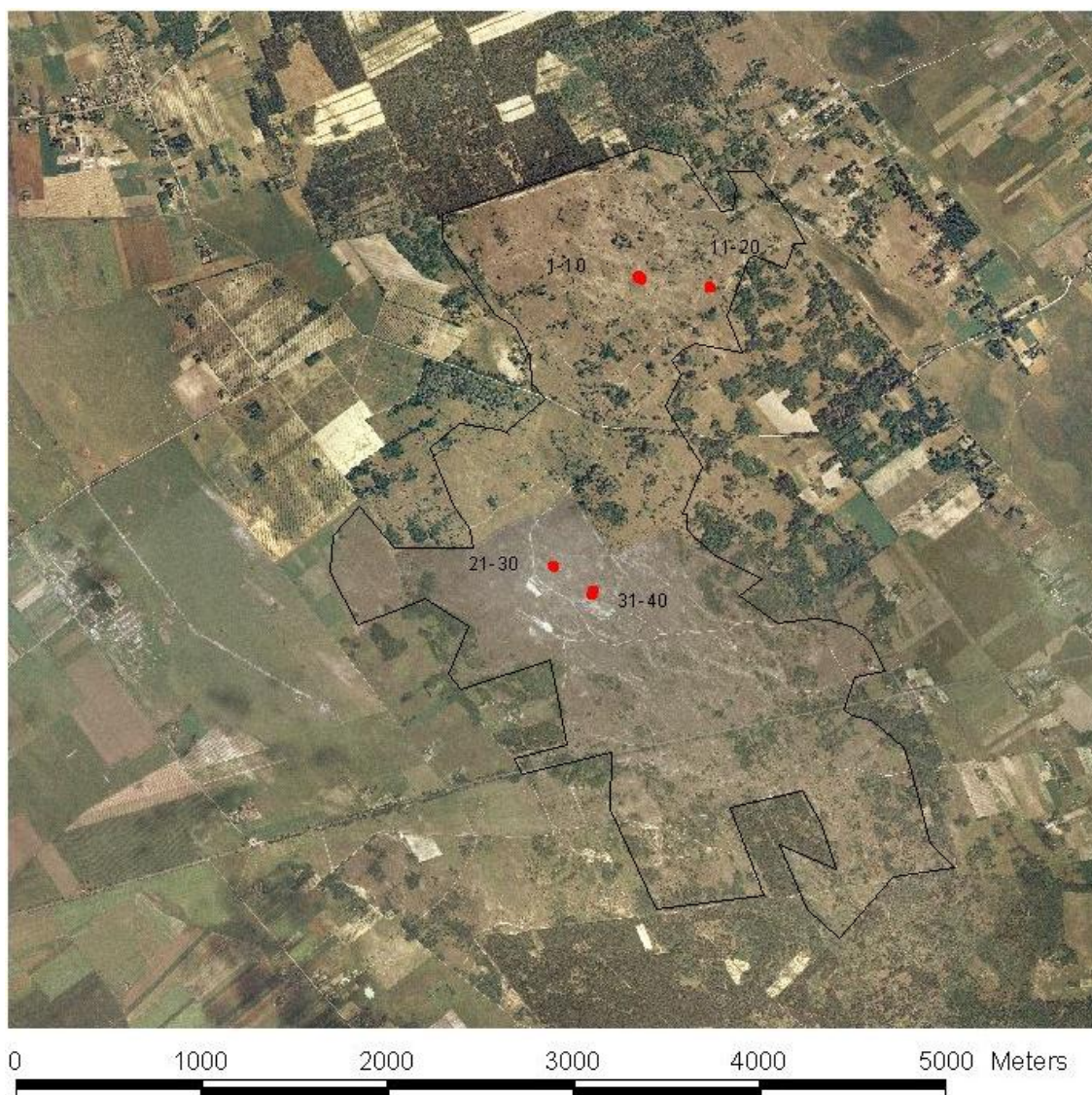
1. függelék. A balástyai populáció térképe.



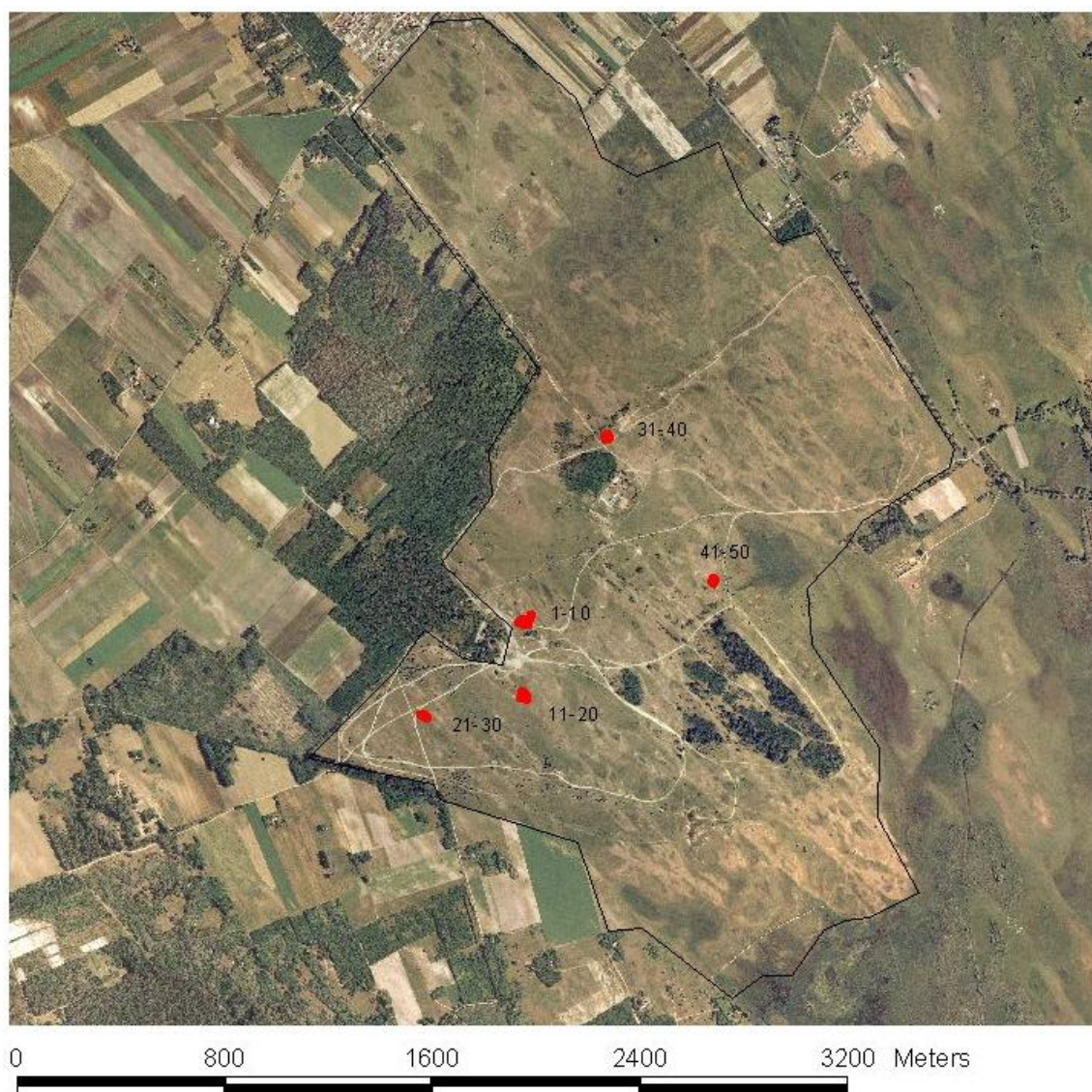
2. függelék. A bócsai populáció térképe.



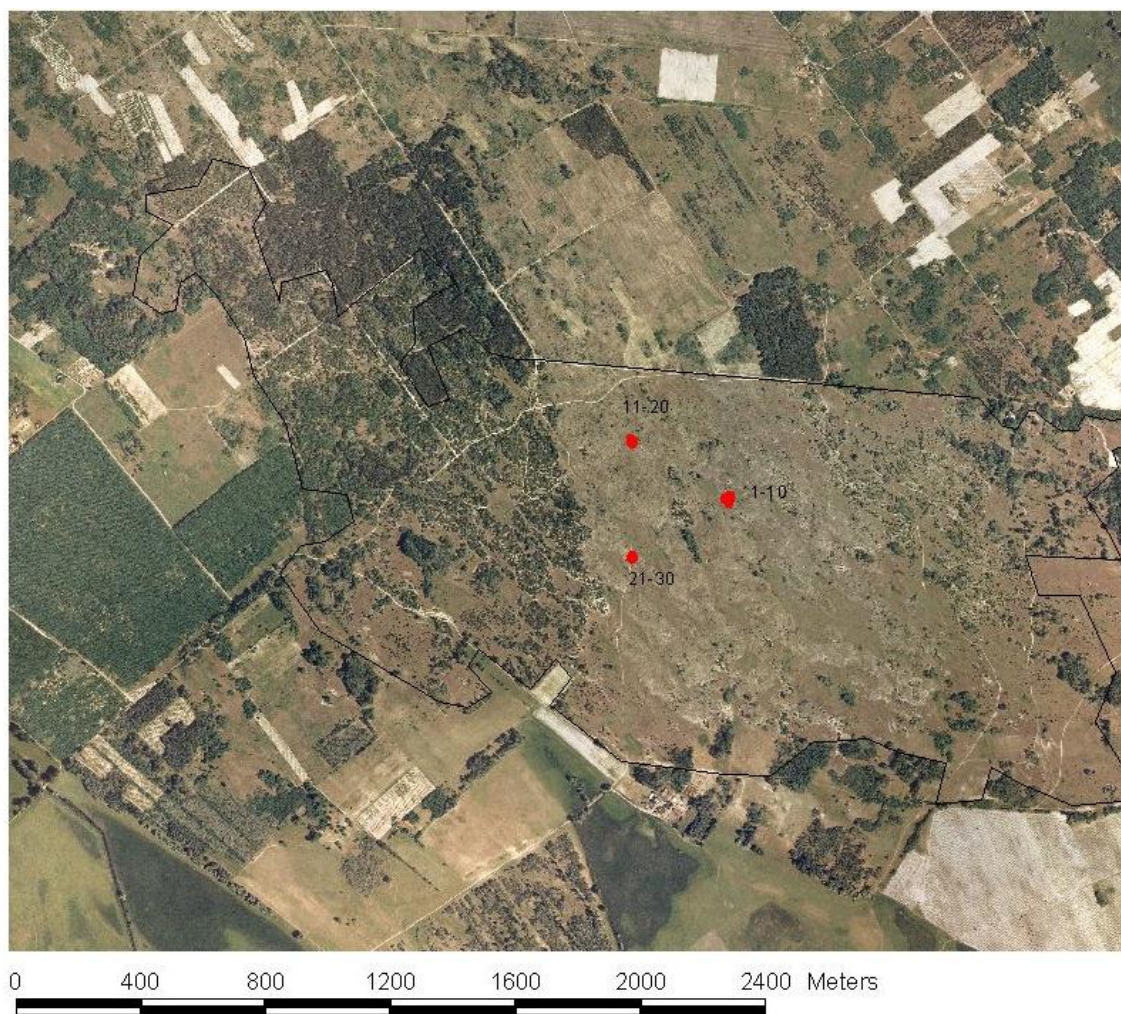
3. függelék. A csévharaszi populáció térképe.



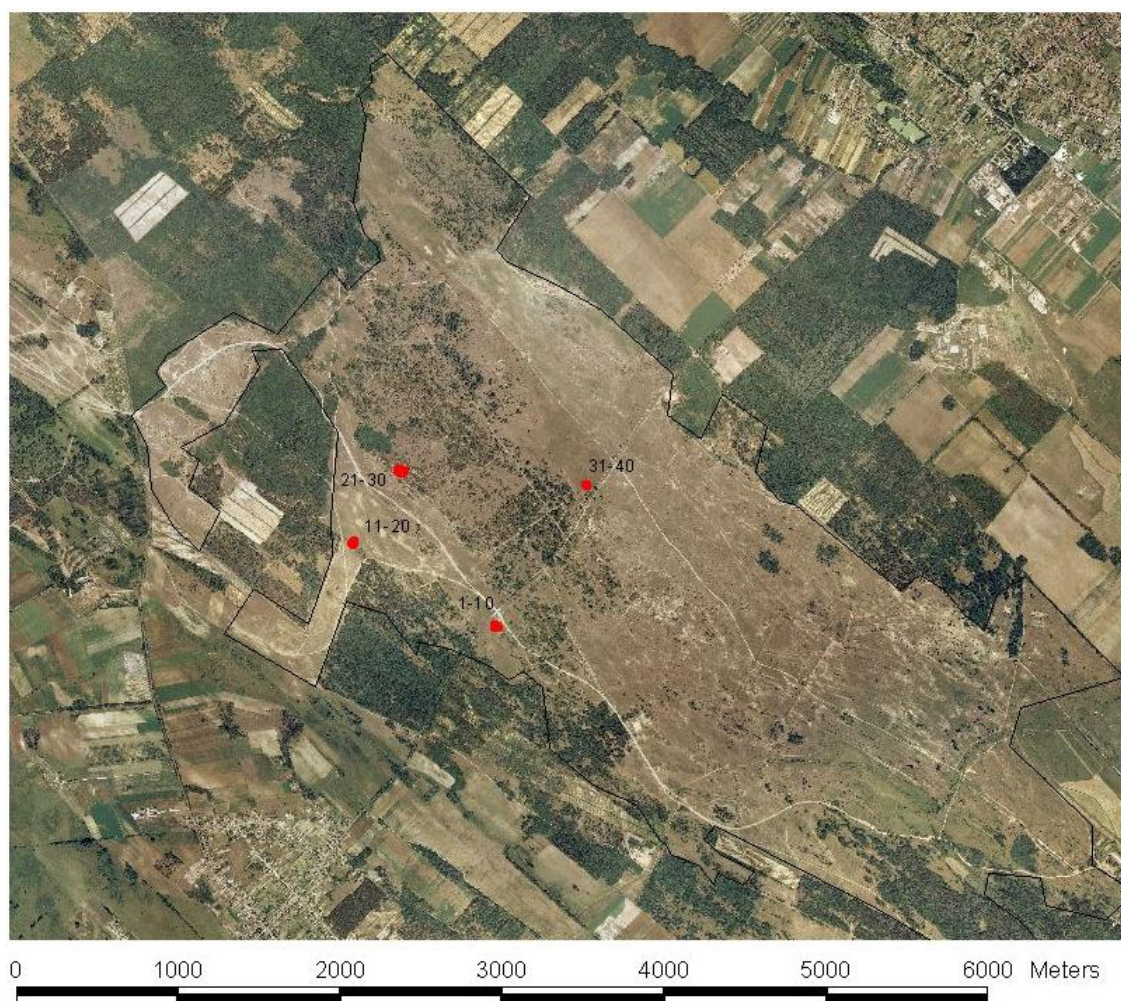
4. függelék. A fülöpházi populáció térképe.



5. függelék. A kunadacsi populáció térképe.



6. függelék. Az orgoványi populáció térképe.



7. függelék. A tatárszentgyörgyi populáció térképe.



8. függelék. A tázlári populáció térképe.

Nyilatkozat

Alulírott Kovács Szilárd, Biológus I. MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) tartalmazzák.

.....

Kovács Szilárd

2012. 11. 04.