

Populációgenetikai módszerek alkalmazhatóságának
összehasonlítása az invazív magas aranyvessző (*Solidago
gigantea*) példáján

Készítette:

Weisz Anett

Biológus Msc, II. évfolyam

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar

Godi Alíz

Biológia Bsc, IV. évfolyam

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar

Témavezetők:

Dr. Stranczinger Szilvia és Nagy Dávid

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológiai Intézet



Pécs, 2015

Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Biológiai inváziók	5
2.2. Terjedés	6
2.3. A kutatózott növényfaj.....	7
2.4. Az invazív fajok genetikája.....	10
2.4.1. A növényi ploidia	10
2.4.2. Az invazív fajok evolúciós genetikája	12
2.4.3. A mikroszatellit régiók.....	14
3. Anyag és Módszer	16
3.1. A genetikai minták begyűjtése	16
3.2. DNS izolálás	17
3.3. A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása	18
3.4. A szekvenciák statisztikai kiértékelése	18
3.5. Ploidia analízis	18
4. Eredmények és megvitatásuk.....	20
4.1. Ploidia vizsgálat eredményei	20
4.2. ITS vizsgálat eredményei	20
4.3. Mikroszatellit vizsgálat eredményei.....	21
5. Összefoglalás	28
6. Köszönetnyilvánítás	31
7. Függelék.....	32
7.1. Irodalom jegyzék	32

1.Bevezetés és célkitűzés

Az invazív fajok problémája napjainkra központi kérdéssé vált az ökológiai kutatások területén, elsősorban az életközösségek diverzitására kifejtett negatív hatása, valamint anyagi kártétele miatt. Ösztönzőleg hat a kutatások folytatására az a tény is, hogy még most sem értjük pontosan, melyek azok a komponensek, amik egy őshonos populációt, dominánsan megváltoztatva, invazív közösségé alakítanak. Az invazív fajok és populációik a legnagyobb károkat a biodiverzitásban, az ökoszisztéma sértetlenségében, a mezőgazdaságban, a halászatban és olykor a közegészségben okozzák. Egy közgazdasági felmérés szerint az egzotikus özőnfajok – gyomok, növénypatogének, mezőgazdasági kártevők – évente 137 milliárd dolláros kárt okoznak csak az USA államaiban (Pimentel et al., 2000). Az özőnfajok gyorsuló terjedése és az egyre fokozódó kártételek felkeltették a nemzetközi közösségek figyelmét is, melynek köszönhetően egyre nagyobb körben kezdték vizsgálni az invázió ökológiai hátterét. Ezzel a növekvő tendenciával ellentétben az invázió evolúciós, illetve genetikai megközelítése viszonylag kisebb szakirodalommal bír (Lee, 2002). Az Invázióképesség Evolúciója hipotézis szerint az invazív fajok sikerének egyik kulcsa, hogy az előzőnlött területen rájuk ható új környezeti hatásokhoz rendkívül gyorsan alkalmazkodnak. Ennek következményeként differenciálódás indul meg a honos és az invazív populációk egyedei között, amelyeket a genetikai szegregáció okozhat.

A kutatás modell organizmusa a *Solidago gigantea* (magas aranyvessző), egy Észak Amerikában honos, Európába behurcolt invazív, évelő növény. A kontinensen már a XVIII. századtól jelen lévő faj, alapító populációja nem ismert, de valószínűleg a XIX. század közepén, Franciaország területén jelent meg (Voser-Huber, 1983). Napjainkra már szinte egész Nyugat- és Közép-Európában elterjed, Magyarország teljes területén megtalálható, különböző élőhely típusokban (ruderalis területeken, fél-természetes és természetes élőhelyeken).

Célul tűztük ki egy olyan genetikai vizsgálati módszer megtalálását, amely segítségével felmérhető a faj populációinak genetikai elkülönülése. Korábbi tanulmányok már foglalkoztak a magas aranyvessző populációinak geográfiai elkülönítésével (Schlaepfer et al., 2008). Az általuk használt markerek segítségével az őshonos populációkat képesek voltak elkülöníteni egymástól, ám az európai, invazív populációk esetében nem működtek megfelelően, ezért nem javasolták további populáció genetikai vizsgálatokra.

A kísérleti módszer kidolgozásához más *Solidago* fajoknál alkalmazott mikroszatellit fragmenthossz analízist vettünk alapul, mely segítségével igyekeztünk az egyes populációkat elkülöníteni egymástól. A kísérlet eredményeként a legmegfelelőbb módszer kiválasztása érdekében különböző laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk és az elkülönítésre legalkalmasabb módszer eredményeit tárgyaltuk a dolgozatban.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Biológiai inváziók

Egy állat vagy növény inváziója alatt „populációik tömeges, feltűnő módon és gyorsan lezajló mozgását értjük, amellyel új területeket özönlének el”(Láng, 1993). Ezen definíció egy szűkített formája a faj káros hatásán alapuló inváziónak. A fogalom egyik gyengepontja, hogy emberközpontúan próbálja értelmezni a károsan invazív növényeket, tehát azokat sorolja ide, amik „ott nőnek, ahol nem kívánatosak” (Hunyadi, 1988). A fogalom mégis helytálló és szükséges, mivel nem minden populáció terjedésekor beszélhetünk káros invázióról. Egy ökoszisztémába érkező új faj nem feltétlenül válik invazívvá. Legtöbb esetben nem képes életben maradni, vagy ritkább esetben az életközösség stabil tagjává lesz. Olykor-olykor előfordul, hogy egy faj tömegesen nagy számban terjed el, majd lassan egy egyensúlyi állapot alakul ki az élőhelyen. Addigra viszont számos őshonos fajt kiszoríthat a területről, illetve hatalmas károkat okoz a homogén mezőgazdasági területeken.



1. kép: *Solidago gigantea* által előzönlött terület. Készítette: Pál Róbert

A gazdaság gyors globalizációja miatt a fajokat eddig nem látott ütemben hurcolják be olyan területekre, ahol nem számítanak honosnak (Ward et al., 2008). Ugyan ezen egzotikus fajok csak kis része képes megtelepedni az új élőhelyen, mégis ezek alkotják azon kiindulási populációk alapjait, melyek a későbbiekben invazívvá válhatnak (Mack et al., 2000). A nem bennszülött, behatoló fajok miatt az utóbbi két és fél évtizedben jelentősen megnőtt a szakirodalma az invázió biológia témakörének (Daehler, 2003). Számos hipotézis született,

mely az invazív fajok sikerességének mechanizmusát igyekszik magyarázni (Hinz&Schwarzlaender, 2004).

Több kutatás vizsgálta, hogy egy bizonyos genotípus jelenléte a populációban vajon növeli-e az invázió sikerességét (Maron et al., 2004; van Kleunen&Schmid, 2003). Ezen tanulmányok szerint az invázió képessége valamilyen genetikai változás hatására alakulhatott ki (Maron et al., 2004; van Kleunen&Schmid, 2003).

Ezen tanulmányok szerint az invázió képesség valamilyen genetikai változás hatására alakulhatott ki.

2.2. Terjedés

Egy növény inváziója során elsőként leküzdendő akadályok a földrajzi barrierek. Mára, antropogén hatásra, ezen akadályok könnyebben és gyorsabban leküzdhetők, mint a korábbi időkben (a nagy földrajzi felfedezések előtt). Amely fajnak sikerül bejutni egy új területre, onnantól *behurcolt* vagy *idegen* fajnak nevezi a szakirodalom. Az ez után következő, úgynevezett *meghonosodás* során a behurcolt egyedeknek legalább egy önfenntartó méretű populációt kell létrehozniuk, ahhoz hogy tartósan megtelepedhessenek az adott területen (Richardson et al., 2000). A meghonosodás során alkalmazkodniuk kell az új élőhely adta környezeti feltételekhez (környezeti barrier), illetve rendszeresen és önállóan szaporodniuk kell (reproduktív barrier). Amíg egy faj nem képes ezeken a folyamatokon túljutni, addig folyamatos egyed utánpótlásra van szüksége ahhoz, hogy megtarthassa új előfordulási területét (Mihály&Botta-Dukát, 2004). Ezen a szinten megragadt fajokat *alkalmi fajoknak* nevezzük (Richardson et al., 2000). Az invázió következő szintjén a meghonosodott növényeknek le kell küzdeni a természetes növénytársulás behatolással szembeni ellenállóképességét, azaz a meglévő területéről kitörve újabb (önálló) állományokat kell tudniuk létre hozni (Mihály&Botta-Dukát, 2004). Richardson és munkatársai (2000) alapján javasolt tér és időbeli skálán monoton növekvő nem őshonos faj invazívnek tekinthető, ha maggal vagy más szaporító képlettel 5 éven belül száz méterre jutva szaporodó képes utódai vannak. Míg a csak vegetatívan szaporodó fajoknál a 3 év, 6 méter távolság a javasolt.

Napjainkban több elmélet kidolgozásával is igyekeznek magyarázatot találni az invazív fajok terjedésére (Cronck&Fuller, 1995; Hierro et al., 2005). Ezek közé tartozik például a *természetesellenségek kikerülése hipotézis*, mely szerint az őshonos területeiről

kikerült növény sikeresen megszabadul kártevőitől (patogének, herbivorok). A hipotézis értelmében az invazív populáció kettős előnnyel indul, mivel közvetlen módon mentes a specialista herbivóroktól, ugyanakkor a területen élő őshonos fajoknak lehetnek herbivórjaik, patogénjeik. Az *üres niche hipotézis* alapja, hogy a megszálló faj képes a területen eddig ki nem használt niche forrásait kiaknázni. Az *újfajta fegyverek hipotézise* már egy elfogadott és több tanulmány által támogatott hipotézis, mely szerint az új élőhelyre érkező faj valamilyen biológiai fegyver (például allelopatikus vegyületek) birtokában van, mely segítségével kiszorítja az őshonos fajokat. Ezek az allelopatikus vegyületek általában nem közvetlen hatnak a növényekre, hanem a környezet valamely paraméterét változtatják meg. Számos invazív faj zavart élőhelyen fordul elő, ezért az invázió biológiai kutatásában fontos szerepe van a *zavarás hipotézisnek*. Ennek magyarázata, hogy a legtöbb invazív faj eredetileg ruderalis elem, ezért a zavarásokkal szemben hatékonyabban képesek reagálni (Hierro et al., 2005). Fontos még a *magnyomás hipotézis*, mely szerint azok a növények, amelyek már magukban képesek nyomást gyakorolni az őshonos fajokra, jelentős előnnyel indulnak az élőhely birtokba vételéhez (Maron, 2006). A *megnövekedett kompetícióképesség evolúciója (EICA) hipotézis* szerint egyes fajok invazívvá válásuk során a természetes ellenségeik hiányában a „megspórolt” energiát más folyamatokba tudják átforgatni: méretük vagy a fitnesszük növelésébe (Blossey&Notzold, 1995). Mára számos tanulmány szól a hipotézis ellen (van Kleunen&Schmid; Vila et al., 2003; Willis et al., 2000), a zárt rendszerben együtt nevelt honos és invazív populációk egyedei sok esetben nem mutatnak különbséget a növekedésükben vagy versenyképességükben (Bossdorf et al., 2004; Vila et al., 2003,2005).

2.3. A kutatott növényfaj

A *Solidago gigantea* AIT. a *Solidago* nemzetségbe, az Asteracea családkhoz tartozik (Weber&Jakobs, 2005). A nemzetség jelenleg több mint száz fajt számlál, ám a tisztázatlan taxonómiai helyzetük miatt pontos adat nem áll rendelkezésre. A legtöbb faj az észak-amerikai kontinensen őshonos, ahol a nemzetség génközpontja is található. A Flora Europaea szerint Európában hat fajuk található meg, köztük a *S. gigantea* is (Mihály&Botta-Dukát, 2004). A *S. gigantea* és a *S. canadensis* együttesen a *Triplinervae* subgenusba tartoznak, amiket hármass erezetű levelek jellemeznek (Weber&Jakobs, 2005).

A *S. gigantea* egy magas, egyenes szárú, évelő lágyszárú, évenként megújuló földfeletti hajtásokkal és kitartó földalatti rizómákkal. A hajtások kizárólag a virágzás során

válnak elágazóvá. A magasabb egyedek hajlamosak később virágozni, mint a kisebbek. A méretbeli arányok nagyon eltérőek lehetnek a földrajzi elhelyezkedéstől függően. A növényt váltakozó levélállás, illetve a hosszú és a lándzsás alak közötti levelek jellemezik. Piramidális bugavirágzata nyitott, ezen bélyeg alapján könnyebben megkülönböztethető a sűrűbb, zártabb virágzatú rokonától, a *S. canadensis*től, amivel gyakran elegyedik. Rizómáját közel horizontális növekedés jellemzi, ami rametenként 3-50 lehet. Megfigyelték, hogy bolygatott területeken a rizómák száma nagyobb lehet, ami magyarázza az egyedszámban tapasztalható fluktuációt (Weber&Jakobs, 2005).



2. kép: A *Solidago gigantea* egy Európában invazívvá vált növényfaj.
Készítette: Andrea Moro

A *S. gigantea* egy magas, egyenes szárú, évelő lágyszárú, évenként megújuló földfeletti hajtásokkal és kitaró földalatti rizómákkal. A hajtások kizárólag a virágzás során válnak elágazóvá. A magasabb egyedek hajlamosak később virágozni, mint a kisebbek. A méretbeli arányok nagyon eltérőek lehetnek a földrajzi elhelyezkedéstől függően. A növényt váltakozó levélállás, illetve a hosszú és a lándzsás alak közötti levelek jellemezik. Piramidális bugavirágzata nyitott, ezen bélyeg alapján könnyebben megkülönböztethető a sűrűbb, zártabb

virágzatú rokonától, a *S. canadensis*től, amellyel gyakran elegyedik. Rizómáját közel horizontális növekedés jellemzi, ami rametenként 3-50 lehet. Megfigyelték, hogy bolygatott területeken a rizómák száma nagyobb lehet, ami magyarázza az egyedszámban tapasztalható fluktuációt (Weber&Jakobs, 2005).

Mint a *Solidago* genus tagja, a *S. gigantea* is Észak- Amerikában őshonos (Weber&Jakobs, 2005). Elterjedése a kontinensen igen nagy területet foglal magában az USA déli államaitól - vertikális és horizontális irányban egyaránt - egészen Kanada északi részéig megtalálható (Gleason et al., 1991; Semple et al., 1999). Európába a XVIII. században hurcolták be dísznövényként és nem egészen 100 év múlva kiszabadulva vált csak invazívá. Az eredeti alapító populáció ugyan ismeretlen, de első feljegyzés egy vadon élő populációról Franciaországból származik a XIX. század közepéről (Voser-Huber, 1983). Ötven évvel később már Németországban és Svájcban is megjelentek vad populációi, majd az 1850 és 1880-as évekre elérte Közép-Európát (Keller, 1891; Wartmann&Schlatter, 1881; Wirz, 1885; Wagenitz, 1979). Herbáriumi egyedek alapján Weber (1998) megállapította, hogy akkoriban a faj terjedési sebessége 910 km²/év volt. Az 1950-es évekre már egész Európában megtalálható volt (Tutin et al., 1964). A faj igen tág klímaviszonyok mellett is életképes populációkat képes alkotni: a (szub)-mediterrántól a szubóceánig át a szubkontinentális területekig megtalálható szinte Európában (Meusel&Jager, 1992). Annak ellenére, hogy főleg 1200m tengerszint alatt fordulnak elő, magasabb tengerszinten is megélnek (Polatschek, 1997). Közép-Európában elterjedt, míg például Skandináviában, Észak-, és Dél-Németországban viszonylag ritkán fordul elő (WEBER&JAKOBS, 2005). Európán kívül már megjelent Japánban (Enomoto, 2000; Tsuyuzaki, 2002), Koreában, Oroszországban, Hawaii és Új-Zéland szigetén valamint Ausztráliában is (Weber&Jakobs, 2005). Élőhely-preferenciáját tekintve is széles képet mutat: ruderalis területeken (utak és folyók mentén), fél-természetes és természetes élőhelyeken is előfordul (Guzikowa&Maycock, 1986; Lohmeyer&Sukopp, 1992). A növekvő urbanizáció, az útépitések és az elhagyatott földterületek talán még segítik is a terjedését, mivel az eldobott zöldhulladék nyersanyag forrása segítheti a *S. gigantea* fejlődését, terjedését (Walter, 1987).

2.4. Az invazív fajok genetikája

2.4.1. A növényi ploidia

A növény- és állatvilágban a kromoszómaszám igen nagy változatosságot mutat. Közel rokon fajok esetében a kromoszóma szám eltérő, míg bizonyos nemzetségek és családok esetében azonos is lehet. Az állatok világával szemben a növényeknél a ploidia változása ritkábban okoz sterilitást, ezzel jelentősen megnövelve a fajt jellemző genetikai diverzitást.

Diploid élőlények esetében az ivarsejtek az alap-kromoszómaszerelvény egyszerűsítését, míg a szomatikus sejtek a kétszeresét hordozzák. Poliploidok szomatikus sejtjei 3 vagy több alap-kromoszómaszerelvényt hordoznak. Ezek alapján megkülönböztethetünk: triploid ($2n=3x$), tetraploid ($2n=4x$), pentaploid ($2n=5x$), hexaploid ($2n=6x$), oktaploid ($2n=8x$) citotípusú élőlényeket (Sutka, 2004). Létrejöttük alapja az ivarsejtek többszörös alapkromoszóma szerelvényeinek számában rejlik. Triploid egyedek létrejöttükor a megtermékenyülő petesejt kétszeres, a hímivarsejt egyszeres kromoszóma szerelvényt tartalmaz, tetraploid esetében mindkét ivarsejt kétszeres információtartalommal rendelkezik, míg a magasabb ploidiaszintek a többszörös kereszteződések következményei. Ploidia szempontjából a legszélsőségesebb fajok az *Ophioglossum* genus tagjai, ahol a ploidia következtében a sejtek kromoszómaszáma a százas, egyes esetekben akár az ezres nagyságrendet is elérheti (Khandelwal, 1990).

AS. gigantea-nál három különböző ploidiaszintű genotípus ismert: diploid, tetraploid és hexaploid. Az Észak-Amerikában őshonos és az Európába behurcolt invazív populációk ploidiaszintű összehasonlításakor megfigyelték, hogy az európaiak kizárólag tetraploidok, míg az amerikai populációkban mindhárom citotípus előfordul. Melville és Morton (1982) kísérletet tett a - morfológiai alapon (eltérő levélfogazottság és pelyhesség) nyugvó - három citotípus faj szintű különválasztására, azonban a diploidoknál megfigyelhető átfedő variációk miatt ez a törekvésük megbukott. Ezért javaslatuk alapján – az eltérő genetikai információk ellenére – a három citotípust egy fajként kell kezelni (Morton, 1984).

Schlaepfer több alkalommal is foglalkozott a növekedési ráta és ploidia kapcsolatával (Schlaepfer et al., 2010). A natív diploid és tetraploid, illetve invazív tetraploid egyedekkel végzett kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy az őshonos diploidok nagyobb biomassza termelésre képesek, mint a szintén őshonos tetraploidok, de kevesebb gyökér és rizóma fejlődött rajtuk. Az invazív tetraploidok kisebb valószínűséggel virágoztak, ugyanakkor

nagyobb biomassza mennyiséget értek el, mint észak-amerikai tetraploid társaik. Tehát *S. gigantea* esetében a ploidiaszint meghatározása elengedhetetlen a natív és invazív populációk összehasonlító vizsgálatakor (Schlaepfer et al., 2010).

A szerző egy korábbi tanulmányában a poliploidizáció és a kolonizáció kapcsolatát vizsgálta a honos diploid és a tetraploid *S. gigantea* populációkban. Feltételezhetően sikerült megtalálniuk azokat a haplotípus vonalakat, mely kiindulási alapjai lehetettek az Európát előzőnlő alapító populációknak. A vonalakra jellemző, hogy kizárólag tetraploid egyedei ismertek, míg az őshonos populációkban diploid, tetraploid és hexaploid egyedek vegyesen alkotják. Észak-Amerikában szignifikáns különbséget tudtak kimutatni az egyes régiók között egyedi haplotípusok és genetikai izoláció alapján. Ploidiaszint szempontjából a vizsgált északi régiók jóval differenciáltabbak voltak, mint a déli területek. Az általuk használt módszerben a kloroplasztisz DNS intergenikusspacer régiójában 18 primer párt teszteltek, melyek alapján 3 markert sikerült elkülöníteniük egymástól (*trnH*, *trnK*, *trnK*, *trnK5*). A markerek segítségével az amerikai diploid és tetraploid egyedei a populációkban eredményesen elkülöníthetők voltak egymástól, ám az európai tetraploidok ezekre a markerekre homogénnek voltak. Eredményeik alapján, a magas aranyvessző tetraploid citotípusa multiploidizációs eseményként jöhetett létre, tehát nem egyszeri eseményként. A kloroplasztisz DNS szekvenciák alapján a tetraploid vonal elterjedése Észak-Amerikában nem volt sikeres, ugyanakkor ez a citotípus könnyedén teret nyert az európai és ázsiai kontinensen. Az Európában kimutatott 3 haplotípusból kettő, ami hozzájárult az invázió sikerességéhez Európában és Ázsiában. Ugyanakkor a harmadik haplotípus sikeres volt Európában, de Észak-Amerikában viszonylag csak kis területen terjedt el. Feltételezhetően azért, mert ez egy újonnan kialakult citotípus. Adataik alapján az európai tetraploid *S. gigantea* populációk legalább 4 behurcolt szülő növényre vezethetők vissza, melyek az USA két eltérő területéről származnak: New England és az Appalache hegység déli része. Eredményeik összhangban állnak egy korábbi szerzőpáros munkájával (Weber&Schmid, 1993), mely történelmi adatok alapján állította, hogy a *S. gigantea* európai populációi kis számban behurcolt egyedek leszármazottai lehetnek. Végeredményben az általuk vizsgált markerek alapján a behurcolt populációk haplotípus száma és diverzitása redukción mutatott. Ezen okból nem találtak bizonyítékot arra nézve, hogy a magas aranyvessző a behurcolás során mutációt szenvedett volna, mely segítette az invazívvá válásban (Schlaepfer et al, 2008).

2.4.2. Az invazív fajok evolúciós genetikája

Az invazív fajok evolúciós genetikája viszonylag kevésbé kutatott terület annak ellenére, hogy jobb képet kaphatnánk az invazívvá válás és az invázió mechanizmusairól. Lee (2002) szerint egy faj inváziós sikere leginkább attól függ, hogy mennyire erőteljes a válaszuk a természetes szelekcióra, míg a fiziológiai toleranciájuk és plaszticitásuk kevésbé fontos. Kihangsúlyozandó a genetikai architektúra és a szelekció fontossága, amelyek következményei az evolúciós adaptáció és a speciáció lehetnek. Például az episztatikus és a gének közötti interakciók megkönnyíthetik az invázió sikerességét. Ezen következtetések alapján már érthetővé válik a genomikai megközelítés, amellyel meghatározhatjuk az invázió mechanizmusát. A génexpressziós analízisek, a gén interakciók és a genomi átrendeződések vizsgálata során kapcsolatba hozhatók az egyes mechanizmusok az inváziós eseményekkel. Az inváziók evolúciós vizsgálata tehát fontos, különösen azért, mert az inváziók folyamata során gyakran gyors evolúciós események zajlanak le.

A populációk genetikai jellemzői komoly hatással lehetnek a faj további terjedésére (Tsitui et al., 2000; Ellstrand&Schierenbeck, 2000). A természetes szelekció és a genetikai sodródás együttesen alakíthatják a genetikai struktúrát, ezáltal változtatva a populáció tolerancia spektrumát és viselkedését. Ezzel együtt az invazív populációk képesek evolúciós változásokat indukálni a natív fajokban (Filchak et al., 2000; Carroll et al., 2001). Ahhoz, hogy determinálni tudjuk az invázió sikerességéhez szükséges jellemzőket, szükségünk van evolúciós genetikai vizsgálatokra is (Lee, 2002).

Az invazív fajok genetikai szerkezetük vizsgálatakor a legfontosabb tényező a populációk természetes szelekcióra adott válasza. A biológiai inváziók egy érdekes evolúciós problémát vetnek fel, mivel gyakran az invázió egy gyors stochasztikus eseményként jön létre és általában kis kezdeti populációkat érintenek, amik túlélnek a hirtelen jelentkező élőhely váltást (Lee, 2002). Az invázió sikerességét jelentősen megkönnyítik a kezdeti populációban már jelen lévő genetikai szubsztrátok, amikre később a természetes szelekció válogathat. Számos esetben a genetikai drift már önmagában elegendő az invázió kialakulásához, bár ez inkább kivételnek számít mint szabálynak (Tsitui et al., 2000). Általánosan elterjedt, hogy az invázió sikerességét a széles tolerancia spektrummal és a plaszticitással igyekeznek magyarázni (Baker, 1965; Strayer, 1999; Wolff, 2000), ám ezekről gyakran bebizonyosodik, hogy téves feltevések (Lee, 1999; Davis&Shaw, 2001). Példaként említhető az *Eurytemora affinis* esete, ami egy széles só toleranciával bíró növényfaj, a hipersós mocsaraktól a

frissvízi tavakig megtalálható. Ugyanakkor bizonyos populációi nem képesek sem tolerálni sem akklimatizálódni a különböző sótartalmú területekhez, ugyanakkor mindez nem számít, ha új élőhelyekre törnek be (az erős szelekció és a heritabilitási shift kizárható) (Lee, 1999).

Az elegendő mennyiségű additív genetikai variancia (AGV) esszenciális az evolúciós adaptációhoz, a környezet változásaira adott válaszhoz (Reznick et al., 1997). Számos tanulmány foglalkozott a forrás populáció magas AGV szintjével, ami megkönnyítette az invázió folyamatát (Carroll et al., 2001; Hard et al., 1993; Pappert et al., 2000). Gyakran megfigyelt állapota a sikeres invázióknak a kezdeti időszakban megfigyelt „lemaradás”, ami az AVG adekvált szintjének akkumulációjához szükséges, hogy elérje a szükséges populáció méretet (Ellstrand&Schierenbeck, 2000). Ez alól kivételt képez a *Linepithema humile*. Ez a hangyafaj az Észak Amerikai területekre való invázióját követően elvesztette genetikai diverzitása nagy részét. Ennek következményeképpen csökkent a faj intraspecifikus agressziója és az úgynevezett superkolónia kialakulásához vezetett (Tsutsui et al., 2000).

Annak ellenére, hogy az AVG adja a fő szubsztrátját a szelekciónak, egyes tanulmányok úgy vélik, hogy az episztatikus genetikai variancia is ugyan olyan fontos tényező (Carroll et al., 2001; Bradshaw&Holzapfel, 2000). A generációnkénti új mutációk nélkül az episztázis újszerű szubsztrátját adhatja a szelekciónak a populáción belül és a populációk között. A fixálódott episztatikus variancia a populációk között emelheti a genetikai sodródást vagy a szelekciót, vagy akár mindkettőt (Carroll et al., 2001). A *Jadera haematoloma*, ami egy észak amerikai poloska faj, kolóniai különböző gazdanövényeken alakulhatnak ki, ez a szelekció feltehetően a nagy episztatikus variancia miatt lehetséges (a teljes genetikai variancia 40-78%-a (Carroll et al., 2001). Tehát az időleges palacknyak a nem additív tulajdonságokat szelekciós nyomás alá képes helyezni és hozzájárulhat az evolúciós ráták gyors mozgásához a megfigyelt inváziós események során (Reznick&Ghalambor, 2001).

Az invazív populációkban lezajló intra-, és interspecifikus hibridizációk enyhíthetik az additív genetikai variancia csökkenését az alapító hatás időtartama alatt, illetve új genotípusok jöhetnek létre (Ellstrand&Schierenbeck, 2000). Számos tanulmány foglalkozott az invazív populációk hibridizációja során bekövetkező pozitív hatásokkal, úgy mint gyorsabb növekedés, nagyobb méretek és a natív fajokkal szembeni fokozott „agresszió” (Ellstrand&Schierenbeck, 2000). Ezen tulajdonságok genetikai magyarázata a növekvő genetikai varianciában, az új gén interakcióiban, a káros recesszív allélok kiesésében, elfedésében, vagy a kedvezőbb gének transzferében keresendő. Például hibridizáció útján a

Brassica rapa gyomnövény bizonyos herbicid rezisztenciára tett szert a haszonnövény *Brassica napus*-tól (Snowet al., 1999), továbbá hasonló események zajlottak le: egy másik gyomnövény hidegtoleranciája szélesedett egy szintén gazdasági, rokon növényvel történő hibridizációja során (Milne&Abbot, 2000). Valószínű, hogy a szelekciós nyomás hatására számos hibrid variációból csak néhány marad fenn (Ellstrand&Schierenbeck, 2000).

Újjonnan, hibridizáció során létrejött allopoliploid növények mára széles körben elterjedt és sikeresen terjeszkedő populációik megtalálhatók világszerte (Ellstrand&Schierenbeck, 2000, Soltis&Soltis, 2000). A poliploid hibrid növényekre nagyobb fitness jellemző, ami a növekvő heterozigócia és a csökkenő beltenyészet miatt lehetséges (Soltis&Soltis, 2000). Hozzá kell tenni, hogy sok genetikai variáció többszörös poliploidiai eredetre vezethető vissza az allopoliploid „fajokon” belül (Soltis&Soltis, 2000). A steril vagy aszexualisan szaporodó allopoliploidok előnye a fixált heterózisból származik. Tehát mikor a hibrid populáció életképességének fenntartása egy fixált módszer alapján marad fenn, mert az egyedek aszexualisan szaporodnak, a kedvező genotípust rekombináció nélkül tartják fenn (Lee, 2002). A *S. gigantea* is a rizómáiról történő, asszexualis szaporodási módszert preferálja (Weber&Jakobs, 2004). A steril allopoliploidok valószínűleg felváltva használják a fixált heterózis előnyeit és az alacsonyabb szintű AGV költséghatékonyságát. Ezen mechanizmus még kevésbé ismert (Ellstrand&Schierenbeck, 2000). Megfigyelések alapján az AGV szintek változatossága igen eltérő a steril allopoliploidok között. A *S. partinaanglica* esetében igen alacsony (Ellstrand&Schierenbeck, 2000), míg a *Taraxacum officinale* triploid populációiba nem várt módon magas, a homológ kromoszómák rekombinációja miatt (van Baarlen et al., 2000).

A genomi átrendeződés további fontos szubsztrátjai lehetnek az adaptációnak az invázió során (Soltis&Soltis, 2000). A *Drosophila subobscura* faj esetében szelekció hatására egymástól független módon a kromoszómális inverziók azonos mintázatot alakítottak ki egy bizonyos szélességi fok mentén (Prevost et al., 1988).

2.4.3.A mikroszatellit régiók

A mikroszatellit régiók vizsgálata egyre elterjedtebb a növényi kutatásokban is. Gyakran alkalmazzák olyan esetekben, mikor a fajokon belül az egyes egyedek vagy populációk között nem mutatható ki más markerek segítségével genetikai különbség. A szatellit fragmentek egymás mellett akár ezres nagyságrendben ismétlődő tandem szakaszok alkotják.

Kísérletekkel igazolt, hogy a szatellit-DNS nagy része a kromoszómák centromer régiójában található, ahol feltehetően a mikrotubulusok kötődéséért felelősek, illetve a kromatidák összetartásában is szerepet játszhatnak. Mivel a régió nem tartalmaz működő gént és át sem íródik, ezért nincs vagy nagyon alacsony a rá nehezedő szelekciós nyomás. A szatellit-DNS egy speciális csoportja a mikroszatelliták, amelyek kis méretű, 2-4 bázisnyi tandem ismétlődések. Az ismétlődések száma nagyfokú egyedi varianciát mutat, ezért alkalmas egyed szintű elkülönítésre. Leggyakrabban a személyazonosításra, illetve rokoni kapcsolatok feltárására használják, mivel a mikroszatelliták genetikailag igen instabilak, ezért akár egyik generációról a másikra hirtelen megváltozhat az ismétlődések száma (Szeberényi, 2010).

A *Solidago* genus komplexitása miatt, már a fajok között is igen minimális a genetikai különbség (Schilling et al., 2008). Ez a marker a növényvilág más (özön) fajainál is alkalmazott fajon belüli, populációk közötti elkülönítési alap (Li&Ye, 2006; Liet al., 2008). Kutatásunk során a *S. gigantea* genetikai vizsgálatához elsőként a ploidiaszint meghatározására volt szükség, majd a populációk elkülönítésére a mikroszatellit régiók (SSR) szolgáltak alapul. A mikroszatellit markerek értékes adatokat szolgáltathatnak az egyes *Solidago* fajok rokonságával kapcsolatban, megállapítható az invázió genotípusa, vagy segítségével megbecsülhető a populációk közötti génáramlás mértéke. Továbbá a mikroszatellit analízis segítségével a *Solidago* fajok közötti határok is felállíthatók, mivel a genus taxonómiai komplexitása igen nagy. Ennek oka lehet a taxon fajgazdagsága, az összgenetikai különbözőség alacsony szintje, az alkalmankénti hibridizáció, és a gyakori poliploiditás. A *Solidago* fajok közötti és a fajon belüli elkülönítéshez adhat alapot a biodiverzitáson alapuló a mikroszatellit fragmentek analízise. Mivel már a *Solidago* fajok közötti genetikai különbség is igen alacsony, ezért az SSR lókuszok vizsgálata egy standard genetikai toolkit felállításához adhat segítséget, ami megkönnyítheti a fajok és a fajon belüli populációk elkülönítését (Beck et al., 2014). A kutatásunk szempontjából a mikroszatellit markereket az egyes populációk elkülönülésének megállapítására használtuk fel.

3. Anyag és Módszer

3.1. A genetikai minták begyűjtése

A minták begyűjtése 2 kontinensről (Észak-Amerika, Európa), 11 populációból történt. Honos területéről, Észak-Amerikából, illetve Magyarországon (Kelet-Közép-Európa) kijelölt területekről, ahol mint invazív növény okoz jelentős károkat. Populációnként 10-10 egyedről random módon történt a minták, levelek begyűjtése.

1. táblázat: Magyarországon kijelölt mintavételi helyek földrajzi adatai

Kód	Hely	Mintavétel dátuma	Tengerszint feletti magasság	GPS koordináták
HU1D	Máriakéménd	2008. 11. 12.	152 m	4601638 1827918
HU1W	Somberek	2008. 11. 15.	96 m	46030959 18393917
HU3D	Almáskeresztúr	2008. 11. 09.	130 m	4606558 1751664
HU3W	Mozsgó	2008. 11. 09.	124 m	4606709 1751210
HU4D	Almáskeresztúr	2008. 11. 09.	143 m	4607043 1753301
HU4W	Mozsgó	2008. 11. 08.	110 m	4606577 1750095

2. táblázat: Észak-Amerikában kijelölt mintavételi helyek földrajzi adatai

Kód	Hely	Mintavétel dátuma	Tengerszint feletti magasság	GPS koordináták
US2D	Moiese (MT)	2008. 11. 02.	786 m	472211.53
	National BisonRange			1141442.21
US2W	Moiese (MT)	2008. 11. 02.	786 m	472212.00
	National BisonRange			1141441.81
US3W	FlatheadlakeBiologicalStation	2008. 10. 28.	904 m	475247.01
				1140145.65
US4D	Missoula	2008. 11. 02.	986 m	465139.52
	Kim Williams Naturetrail			1135759.09
US4W	Missoula	2008. 11. 02.	974 m	465142.57
	Kim Williams Naturetrail			1135729.52

3.2. DNS izolálás

A minták homogenizálása folyékony N₂-nel történt. A DNS kivonásához, illetve tisztításához *Zenogene* 40 növényi szövet DNS tisztító kit-et (ZenonBio Kft., Szeged) használtunk, követve a gyártó által adott leírást. A homogenizált mintát (növényi szövet) 500 µl NA és 5 µl NB oldatban szuszpendáltuk. A feltárás után 20µl NC oldatot adtunk hozzá majd a mintát vortexeltük, ezután 15 percig 65°C-on inkubáltuk. A feltárt szövetet jégre tettük és 150 µl ND oldatot adtunk hozzá. A jól átkevert és jégen állni hagyott mintákat 5 percig centrifugáltuk. ZG⁴⁰ oszlopra pipettáztunk 825 µl NF oldatot, ehhez adtunk a centrifugálás utáni felülúszóból 500 µl-t, és összekevertük és 1 percig centrifugáltuk. A csőből ismételtelen eltávolítottuk a folyadékot, és az oszlopot visszahelyeztük a műanyag csőbe. Az előző 2 lépést megismételtük, és 1 percig centrifugáltuk. Az oszlopot ezután tiszta 2.0 ml-es csőbe helyeztük át, az oszlopra 200 µl 65-70°C-os E oldatot pipettáztunk. 5 percig

65-70°C-on állni hagytuk és ismételten 1 percig centrifugáltuk. Majd a mintákból tisztított; kinyert DNS minőségét nanodrop (spektrofotometer) készüléken vizsgáltuk.

3.3. A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása

A vizsgálatunk a használandó PCR (PolymeraseChainReaction) markerek kiválasztásával kezdődött, amihez a *Solidago* genusba tartozó különböző fajokhoz leírt primereket használtunk (Sakataetal., 2013; Wiczorek&Geber, 2002; Zhaoetal., 2012).

A vizsgált DNS szakaszok (mikroszatellit markerek és ITS nukleáris DNS) felszaporítása PTC-200 GradientCycler (MJ Research, INC.) készülékben történt. A PCR reakcióban résztvevő elegy térfogata 50 µl volt, amely 8 µl DNS templátot, 2-2 µl (10 pmol/µl) primert, 13 µl T-puffert (1,44 µl MgCl₂ (25mM), 2,5 µl 10x puffer, 4x0,05 µl dNTP (100mM), 7,86 µl 3xH₂O), 23 µl 3xH₂O-t és 1 µl U *Taq* DNS polimerázt tartalmazott. Az általunk használt PCR programok a fentebb említett publikációk szerint kerültek használatra. A mintáinkat 1,8 %-os, etidium-bromiddal festett gélen futattuk meg, a reakció eredményességét tesztelve. A polimorf mikroszatellit markerek kiválasztását követően, primereik fluoreszcens jelölése történt meg (FAM, NED, VIC, PET), majd a PCR reakciókat elvégeztük az összes vizsgált egyeden.

3.4. A szekvenciák statisztikai kiértékelése

A fragmenthossz analízis a Magyar Természettudományi Múzeum, Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában valósult meg. A kapott peak-ek leolvasása a PeakScanner Software v.10 segítségével történt. A leolvasott mikroszatellitek rögzítése a Microsoft Excel programban történt. Populációgenetikai vizsgálataink a POLYSAT az R-hez (Clark&Jasieniuk 2011) segítségével történt, amely során Genotípus diverzitást és Főkomponens analízist (PCA), Bruvo távolságfüggvény felhasználásával, végeztünk.

3.5. Ploidia analízis

A vizsgált populációk ploidiaszintjének vizsgálata a Prágai Károly Egyetem, Botanikai Intézetének, Flow Citometriai Laboratóriumában történt (Pruhonice, Csehország).

A vizsgálatban résztvevő populációkból 10-10 egyed friss levélmintáinak elemzése történt. Az elemzések során belső standardként borsót (*Pisum sativum*) használtunk. A vizsgálat során a levelek kis részét (~0,2 cm²) kimetszettük 0,5 ml OTTO 1 feltáró puffert alkalmazása mellett borotvapengével feltártuk a növényi szövetet. Ezután 42 µm pórusméretű selyemszűrőn átszűrtük, majd 1ml OTTO 2 puffer segítségével 1 percig festettük a mintát. A DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindo) fluoreszcens festék nukleinsavhoz nagy intenzitással képes kötődni. A preparált minták vizsgálata PartecPloidyAnalyser PA-II gép segítségével történt (3. kép).



3. kép: A plidia szint meghatározása flow citométerrel.
Készítette: Jan Suda

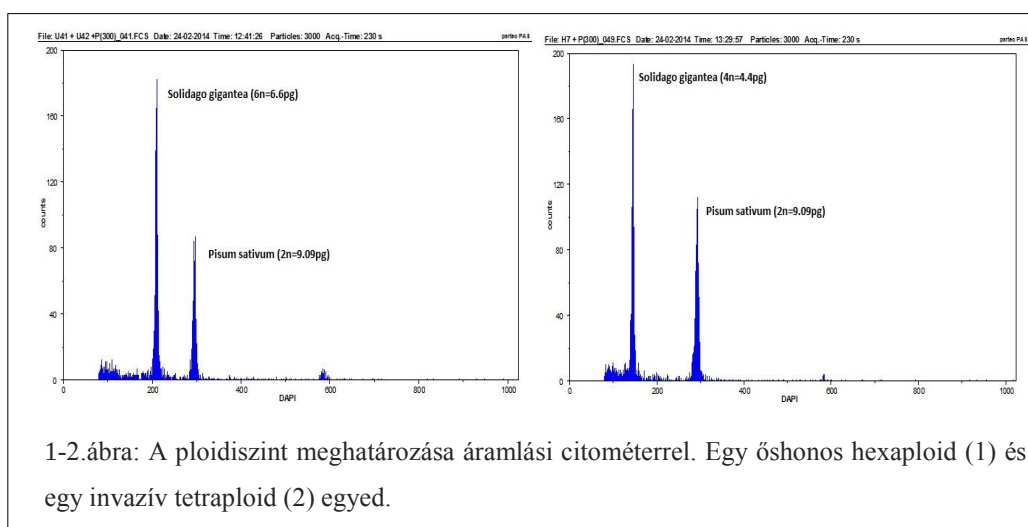
A mintát az áramlási citométerbe juttatva, egy hidrodinamikailag fókuszált folyadék áramban haladnak át egy gerjesztő fénynyalábon (ami lehet lézer vagy Hg-gőz lámpa stb). A műszer képes a fényszórási jelek detektálására, ami a DAPI festék fluoreszcens tulajdonságából származik. A flow citométer további előnye, hogy multiparaméteres adatok analízisére is alkalmas. A mintáink ploidiaszintjének meghatározása a belső standardként használt borsó (9.09 pg) és a diploid *Solidago gigantea* (2.1 pg) ismert nukleáris DNS tartalmának segítségével történt (Bai et al, 2012). Az eredmények elemzése a FloMax® Software forCytometry informatikai szoftver segítségével történt. A kapott csúcsok index-értékeinek segítségével meghatároztuk a Peak ratio-t, majd a kontroll csúcshoz tartozó nukleáris DNS-tartalom alapján kiszámítottuk a mérendő egyed nukleáris DNS-tartalmát. A kapott értékből következtethettünk az egyed ploidiaszintjére.

$$x \text{ Nukleáris genomtömeg} = \frac{x \text{ Peak Index}}{\text{kontroll Peak index}} * \text{kontroll Nukleáris genomtömeg}$$

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. Ploidia vizsgálat eredményei

Növények esetében a ploidiaszint meghatározása elengedhetetlen a genetikai vizsgálatokhoz, mivel erősen befolyásolhatja az ökológiai jellemzőit, így az invázióképességére is hatást gyakorolhat. A kutatás első lépéseként az általunk használt 110 egyed mindegyikén - flow citometriás módszerrel - meghatároztuk azok ploidiaszintjét (1-2.ábra).

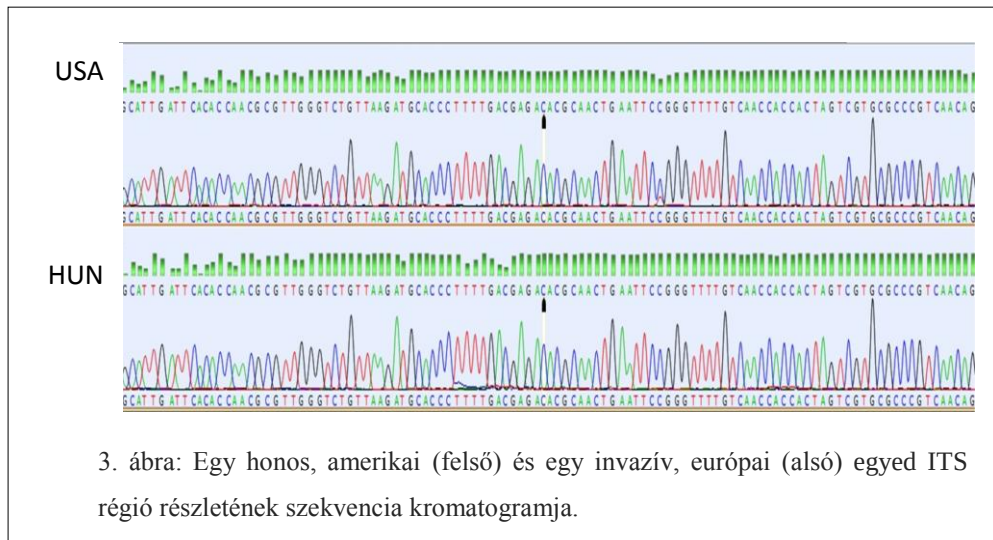


Az általunk vizsgált őshonos egyedek mindegyike hexaploid (1. ábra), míg az invazív populációk mindegyik tetraploid (2. ábra) volt. Ezen eredmény alátámasztja a szakirodalom korábbi eredményeit, miszerint az invazív populációk tetraploidok. Ugyanakkor az őshonos populációkban a tetraploid mellett diploid és hexaploid citotípus is előfordul. Ezen módszerrel sikerült különbséget kimutatni az őshonos és invazív populációk ploidiaszintjében.

4.2. ITS vizsgálat eredményei

Kísérleteink második részében a nukleáris intergenikusspacer régiók (nrITS, I nternal Transcribed Spacer) alapján igyekeztünk genetikai különbséget detektálni az egyes populációk között. Az ITS régiók vizsgálata jól bevált elkülönítési módszer a növényi filogenetikai osztályozásban, mivel ez egy igen variábilis régiója a növényi genomnak

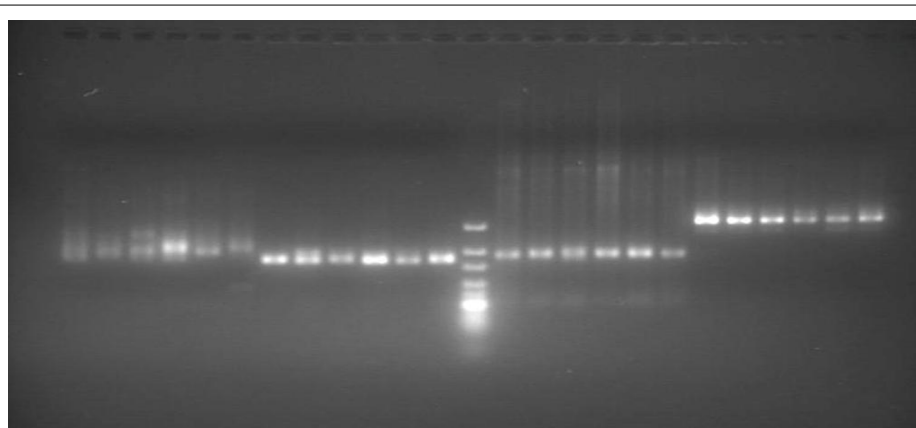
(Eriksson et al., 1997). Ám az ITS1, ITS2 és 5.8S rRNA régiókat felhasználva a random kiválasztott egyedekben bázisnyi különbséget sem tudtunk kimutatni, ezért ezzel a módszerrel nem végeztünk további kísérleteket.



4.3. Mikroszatellit vizsgálat eredményei

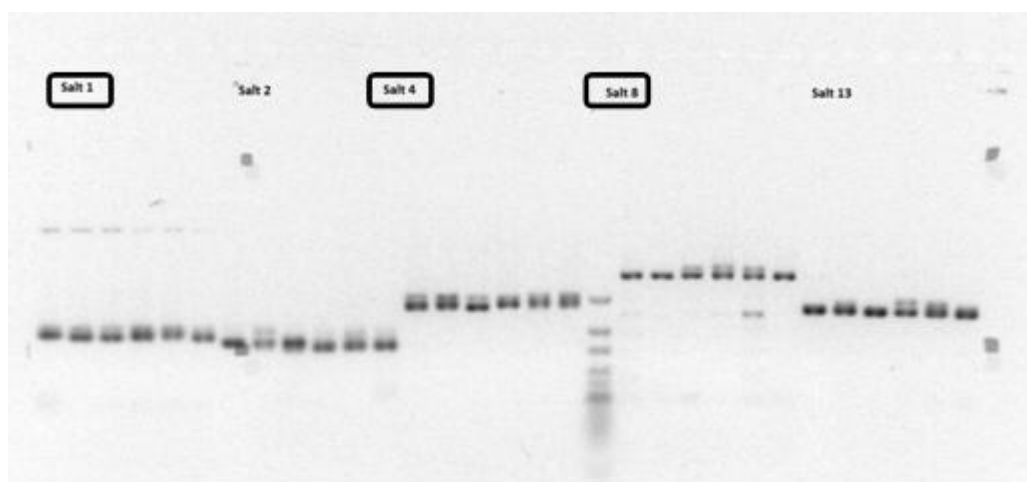
Az ITS régiók vizsgálata után, a mikroszatellit régiók analízisére tértünk át. A kísérlet kiindulási alapja egy hasonló jellegű *Solidago* rokon (*S. virgaurea*) fajon végzett mikroszatellit vizsgálat volt. A japán szigetvilágban invazív elemnek számító *S. virgaurea* komplexen belül az egyes populációk között magas morfológiai variáció figyelhető meg, illetve a populációk 5 eltérő élőhely típus között oszlanak meg. Ezen különbségeknek feltételezhetően genetikai háttere lehet. Ezen elgondolás alapján az EST-SSR (SimpleSequenceRepeatsIn Expressed SequenceTags) markerek segítségével igyekeztek elkülöníteni az eltérő populációkat egymástól. A primerpárok kétszeres, illetve háromszoros bázisismétlődésű oligonukleotidok voltak (Sakaguchi&Ito, 2014).

A japán kutató csoport (Sakaguchi&Ito, 2014) által használt 29 primerpár mindegyikét leteszteltük az általunk használt populációk egyedein (4.ábra). A cél a primerpárok működőképességének meghatározása volt, ezért az egyes populációkból random kiválasztott egyedeket teszteltünk le PCR segítségével. Egyes esetekben a reakció optimalizálására volt szükség. Végeredményben 15 működőképes primerpárt sikerült találni.



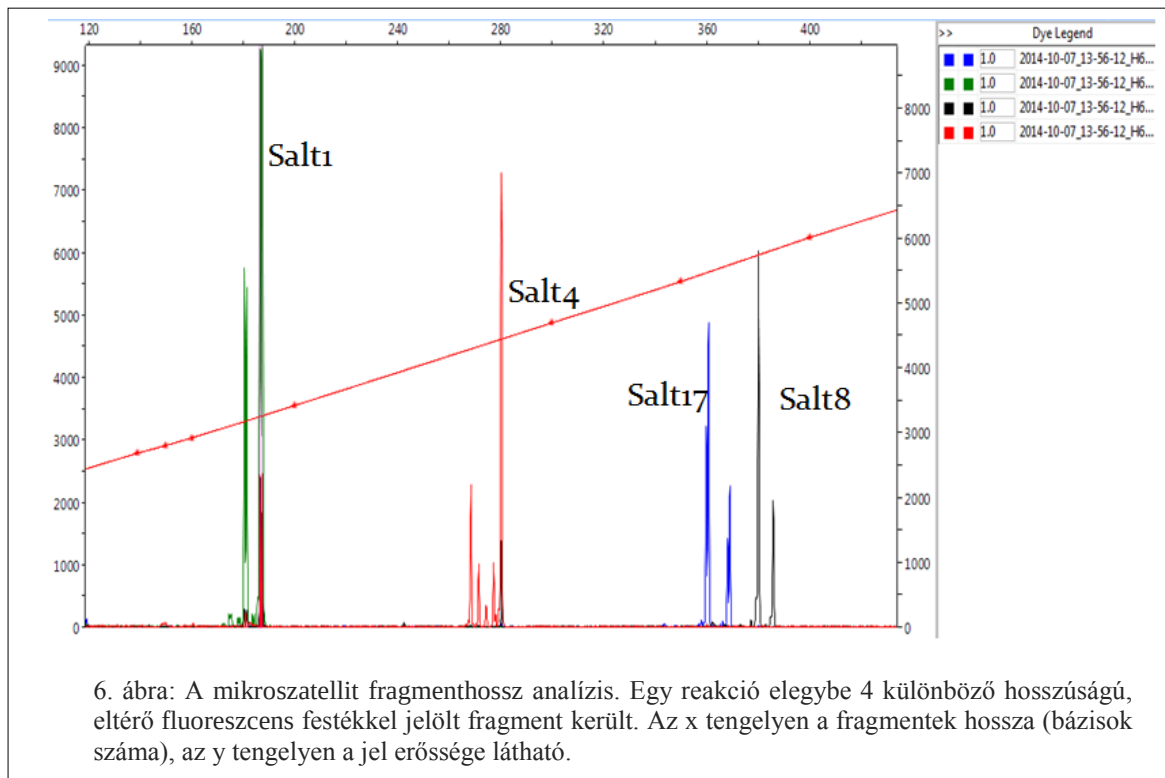
4. ábra: A szakirodalomból származó (Sakaguchi&Ito, 2014) 29 primerpár működőképességének tesztelése.

Ezután a populációkból ismételten random módon kiemelt egyedeken leteszteltük, hogy az egyes primerpároknál tapasztalható-e polimorfizmus a fragmentek hosszában (5. ábra). A tesztelés során 6 primer esetében találtunk polimorfizmust. Azok a primerek jutottak tovább, melyek PCR termékei 1,8%-os agaróz gélben megfutatva legalább két elkülöníthető méretű fragmentet adtak különböző egyedek esetében. Kizáró tényezőnek számított a polimorfizmus hiánya, illetve az úgynevezett *csóvasodás*, amely a fragment egy hosszan elnyúló csóvaszerű képe a gélben (5. ábra; SALT2 minta). Ez a későbbiekben megnehezítette volna a fragmenthosszának pontos meghatározását. Végezetül 110 egyed esetében a 6 primerpárral PCR segítségével felamplifikáltuk a megfelelő mikroszatellit régiókat.



5. ábra: A működőképes markerek polimorfizmus vizsgálata. A Salt 1,4 és 8 primerpárok polimorf fragment termékeket adtak, felhasználásra kerültek a későbbi mikroszatellit fragmenthossz analízishez.

A polimorf markerek kiválasztása után, a PCR-ral felszorzozott fragmenteket szekvencia analízisre küldtük (6. ábra). Mivel az egyes markerek fragment termékei között jelentős méretkülönbség volt, ezért egy reakcióba akár 4 különböző marker termékét is egy időben lehetett futtatni.



Az adatok feldolgozása során fontos volt, hogy csak a legerősebb jelhez tartozó fragmenthosszártékot vegyük figyelembe. Bizonyos populációk esetében előfordult, hogy a műszer vagy a reakcióelegy esetleges hibája miatt egy jellegzetes több csúcsú mintázat alakult ki (egybetartozó kisebb nagyobb csúcsok), ilyenkor minden esetben a mintázat ugyanazon részére eső hosszértékot kellett leolvasni. Az egyes markerekre jellemző fragmenthossz értékeket Excel táblázatban rögzítettük (2. táblázat).

SS4F		SS19D		Salt1		Salt4		Salt8		Salt17	
HUN	USA	HUN	USA	HUN	USA	HUN	USA	HUN	USA	HUN	USA
165	165	103	103	180	180	269	269	377	377	355	355
171	171	109	109		183		272	380	380	358	358
174	174	113		186	186	275	275	383	383	361	361
177	177	115	115		189		278	386	386	364	364
180	180	119			192	281	281	389	389	367	367
	183		127	195	195	284	284	392	392	370	370
		131	131	204			287				
		133	133		207						
		137			210						
		139	139								
		145	145								
		147	147								
		151	151								

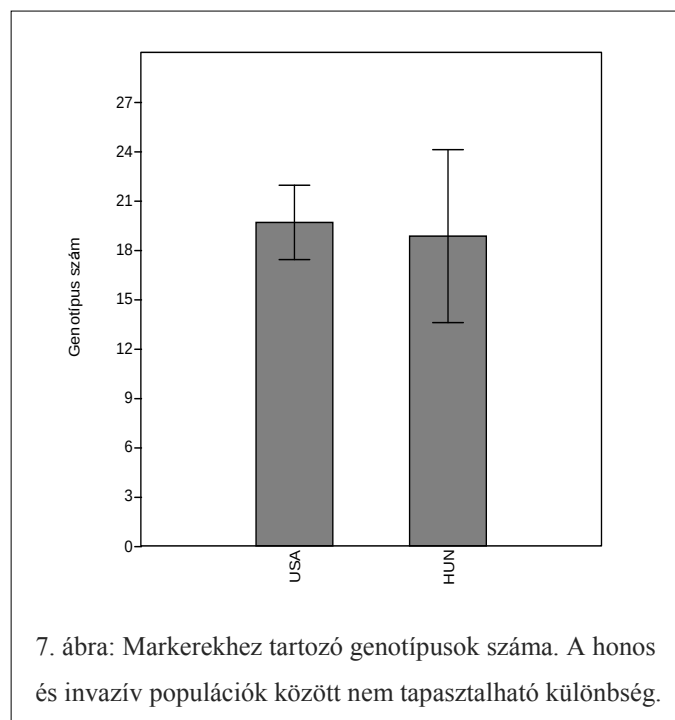
2. táblázat: Az egyes markerekre jellemző fragmenthosszok.

Az adatok feldolgozása után a 6 marker segítségével 47 különböző allélt tudtunk kimutatni az általunk használt mintapopulációban (3. táblázat). Páros Wilcoxon-előjelteszt segítségével megvizsgáltuk, hogy különbözik-e a honos és az invazív terület az egyes markerekhez tartozó allélszámban. Azonban szignifikáns különbséget nem detektáltunk ($t = -1,118$; $p = 0,2732$)

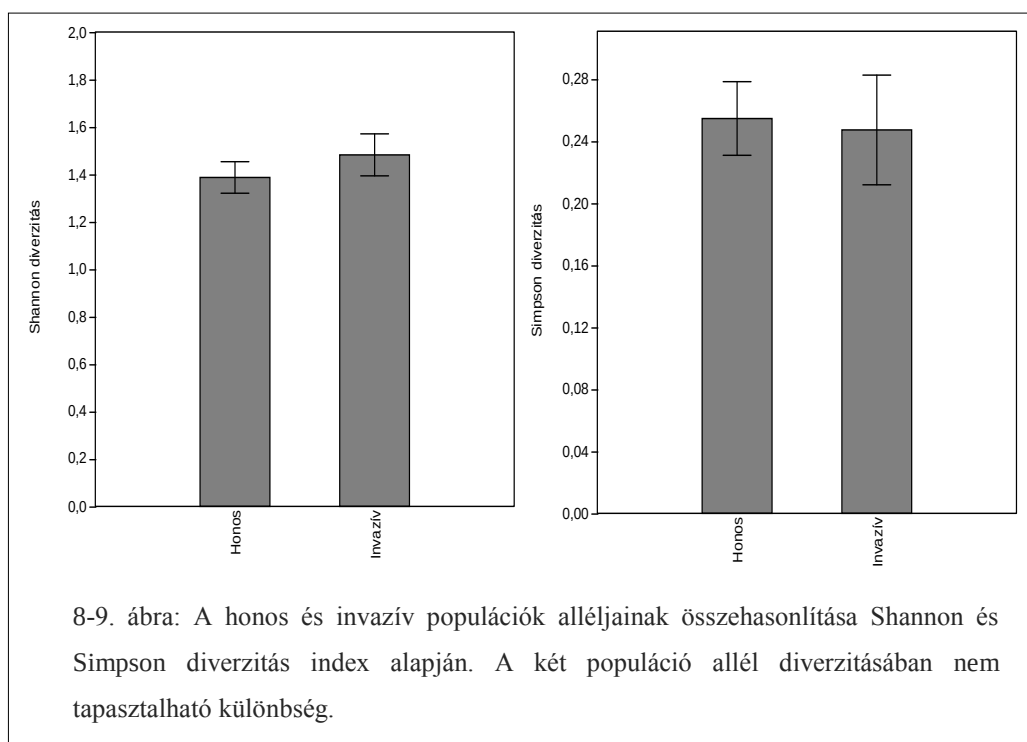
Primer	Allélok száma		
	HUN	USA	Összes
SS4F	5	6	6
SS19D	12	10	13
Salt1	4	8	9
Salt4	4	7	7
Salt8	6	6	6
Salt17	6	6	6

3. táblázat: Az egyes markerekhez tartozó allélok száma. A populációra jellemző allélok többsége mindkét populációban megtalálható, míg az egyedi allélok száma kicsi.

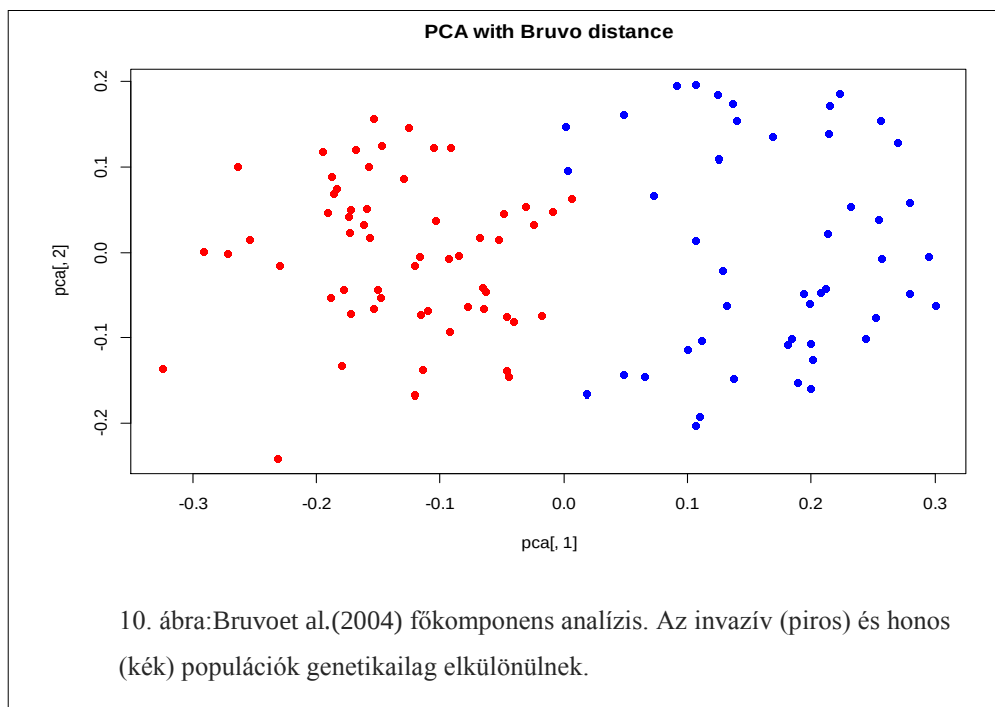
Megvizsgáltuk az egyes markerekhez tartozó genotípusok számát (7. ábra). Genotípus szám alatt az egy markerhez tartozó allél kombinációkat értjük az egyedekben. Az analízis eredménye szerint a honos és invazív egyedek genotípusainak mennyisége nem különbözik egymástól (Kétmintás T-próba: $t = -0,14564$; $p = 0,8871$).



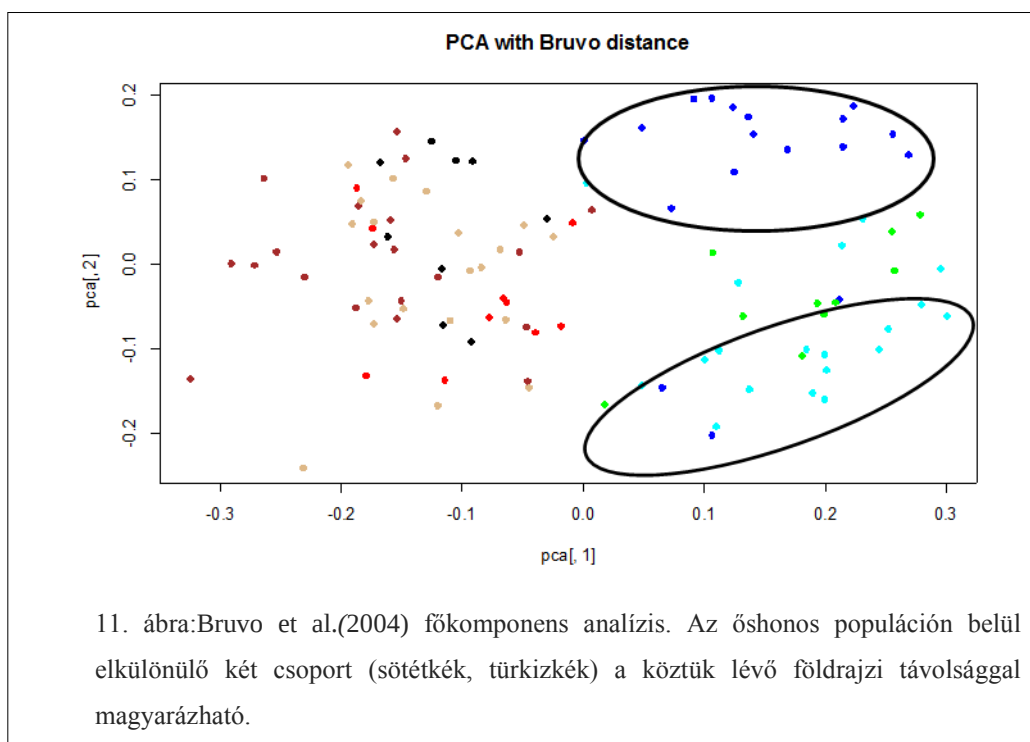
Az allélok diverzitását Shannon és Simpson diverzitás indexekkel vizsgáltuk (8-9. ábra). A Shannon index a ritkán előforduló elemekre, míg a Simpson a gyakoriakra érzékeny. A két diverzitás index alapján nem találtunk különbséget a honos és invazív populációk allél diverzitásában. (Mann-Whitney-U-teszt: Simpson diverzitás: $t = -0,9863$; $p = 0,324$; Shannon diverzitás: $t = -0,8505$; $p = 0,395$)



Bruvo et al.(2004)főkomponens analízis segítségével sikerült elkülönítenünk a honos és invazív populációk egyedeit egymástól (10.ábra). Ezen algoritmus kifejezetten poliploid élőlényekkel végzett allél összehasonlításokhoz lett kifejlesztve, tehát az eredményt nem befolyásolja a mintaelemek eltérő ploidiaszintje.



Bruvo distance analízissel végzett további vizsgálatok során igyekeztünk különbséget kimutatni az invazív és honos populációkon belül (11.ábra).



Az invazív populációk nagyfokú homogenitást mutattak, ezért ezekre a markerekre nézve nem lehetett további alpopulációkra osztani. Ellenben az őshonos populáción belül két alcsoportot sikerült megkülönböztetni. A genetikai távolság oka a gyűjtési helyszínek nagyobb földrajzi távolságában keresendő.

A *S. gigantea* őshonos populációiban diploid, tetraploid és hexaploid citotípusú egyedek is előfordulhatnak. Ellenben az invazív populációkban csak tetraploidokat figyeltek meg. Az általunk végzett kísérletben az őshonos egyedek hexaploidok, míg az invazívok tetraploidok voltak. Ezért a ploidiaszint meghatározása más módszerekkel kiegészítve (pl. mikroszatellit fragmenthossz analízis) alkalmas lehet a populációk elkülönítésére. Az ITS régiók nem alkalmasak a faj további populációgenetikai vizsgálataihoz, mivel nem eléggé variábilisak. Ellenben a mikroszatellit régiók megfelelőek, mivel a magas aranyvessző mikroszatellit régiói kellő variabilitást mutatnak az elkülönítéshez. A főkomponens analízis segítségével a két kontinens genotípus eloszlásában sikerült különbséget találni. A honos és invazív területeken a kisméretű mintavételezés miatt a populációk elkülönülése nem jelentős mértékű. Az allélok diverzitásában és az egyes markerekhez tartozó genotípusokban (egyeden belüli allélkombinációk) nem található különbség az őshonos és invazív populációkban. Tehát a *S. gigantea* populáció genetikai vizsgálataihoz a ploidiaszint meghatározás és a mikroszatellit fragmenthossz analízis együttesen alkalmas a populációk genetikai elkülönítésére. További vizsgálatokhoz a mintavételi területek bővítése javasolt.

.

5. Összefoglalás

A *Solidago gigantea* egy Észak Amerikában honos, Európába behurcolt invazív növényfaj. Első nyugat-európai populációi körülbelül a XIX. század közepén jelenhettek meg Franciaország területén (Voser-Huber, 1983). A kivadásukat követő 150 év alatt populációik egész Európában általánosan elterjedt gyommá nőtték ki magukat. Napjainkra már Európán kívüli is megjelentek Japánban (Enomoto, 2000; Tsuyuzaki, 2002), Hawaii-n vagy Új-Zélandon (Weber&Jakobs, 2005).

A növekvő globalizáció egyik mellékterméke az invazív fajok számának növekedése és gyorsuló terjedésük. Emiatt egyre fontosabb helyett foglal el a tudományban az invázió folyamatát, illetve az invazív fajokat vizsgáló tudomány terület, az invázióbiológia (Daehler, 2003). A növekvő információmennyiség ellenére még mára sem tisztázott az invázió kialakulásának pontos mechanizmusa, bár számos hipotézis igyekszik magyarázatot találni rá. A feltevések szerint az inváziót kiváltó okok ökológia, fiziológiai és genetikai változók miatt következhetnek be. Az invázió genetikai hátterének vizsgálata ugyan kisebb szakirodalommal bír, ám nem elhanyagolható. A hipotézis szerint egy faj invazívvá válásának oka valamilyen genomi szintű változással hozható összefüggésbe. Ez alapján vizsgálható, hogy egy bizonyos genotípus jelenléte egy populációban hatással van-e invázióképességére (Maron et al, 2004; van Kleunen&Schmid, 2003).

A növényvilágban nem ritka jelenség a poliploidia, ezen belül az allopoliploid növények (a *S. gigantea* is ide tartozik), melyek hibridizáció során létrejött fajok, világszerte előfordulnak és sikeresen terjeszkednek (Soltis&Soltis, 2000). A magas aranyvessző honos populációiban vegyesen fordulnak elő diploid, tetraploid és hexaploid egyedek. Ezzel szemben az invazív populációkban eddig csak tetraploid citotípusú növényeket figyeltek meg (Schleapfer et al, 2008). A honos és invazív tetraploid populációk közötti morfológiai különbségek vizsgálata során bebizonyosodott, hogy az invazív egyedek kisebb valószínűséggel virágoznak, de nagyobb biomassza mennyiséget képesek produkálni, mivel nagyobb gyökérzetet és több rizómát fejlesztenek. Tehát a faj genetikai vizsgálataihoz elengedhetetlen a ploidiaszint analízis (Schlaepfer et al, 2010). Ezért elsőként a mintaelemek ploidiaszintjének meghatározása történt (a mintákból 50 egyed őshonos, 60 invazív populációból származott). A honos populációkból származó egyedek hexaploidok, míg az invazívak tetraploidok voltak. Mindezek támogatják korábbi tanulmányok eredményeit

(Schleapfer et al, 2008), mely szerint az invazív populációkban tetraploidok egyedek figyelhetők meg.

A faj első, inváziót célzó genetikai vizsgálata során kloroplasztisz markerek segítségével igyekeztek bizonyítani a honos és invazív populációk közötti különbséget. Az általuk használt markerek megfelelőek voltak az diploid és tetraploid őshonos populációk elkülönítésére, ugyanakkor nem bizonyultak elégségesnek az invazív populációk elkülönítésére (Schlaepfer et al, 2010.). Célunk egy olyan genetikai módszer kidolgozása volt, aminek segítségével különbséget lehet kimutatni a *S. gigantea* populációkban. Elsőként a nrITS régiókban (nukleáris intergenikusspacer régiók) kerestünk genomi különbségeket, ám a populációk kontinens szintű elkülönítése sem volt lehetséges, mivel az általunk vizsgált területek szekvenciáiban bázisnyi különbséget sem lehetett kimutatni. Ezt a vizsgálati módszert elvetettük és helyette a mikroszatellit régiók vizsgálatára tértünk át.

A fragmenthossz analízis alapja egy *Solidago* rokon fajnál végzett sikeres mikroszatellit analízis volt, amely során a fajon belül genetikailag elkülöníthető populációkat mutattak ki (Sakaguchi&Ito, 2014). A mikroszatellit régiók széles körben használatosak a genetikai elkülönülés vizsgálatára, hiszen egyes régiókban igen nagyfokú variabilitás figyelhető meg (Raybould et al., 1998).

Ezen elgondolás alapján és az általuk használt primerpárok felhasználásával 6 marker esetében sikerült polimorfizmust kimutatnunk. A módszer segítségével a felhasznált 110 mintaelemből 49 allélt azonosítottunk. Az egyes markerekhez tartozó allélok és genotípusok (egyedenkénti allél kombinációk) száma, illetve diverzitása alapján nem találtunk különbséget az őshonos és invazív populációk között.

Főkomponens analízis segítségével sikerült különbséget kimutatni a két kontinens genotípusbeli eloszlása között. A két populáción belüli alcsoportok elkülönítése csak az őshonos egyedek között volt lehetséges. Mivel mintavételezésünk során viszonylag kis területekről történt a populációk kiválasztása (5-130km távolság az egyes mintavételi helyek között), ezért nem volt várható jelentős mértékű elkülönülés a honos vagy invazív területeken belül (Hierro et al., 2005; Hansen&Mensberg, 1998). Ugyanakkor a mikroszatellit lokuszok a populációkon belül erős hasonlóságot mutathatnak, ugyanakkor a távolságokkal nem korrelálnak (Raybould et al., 1998). Tehát a mikroszatellit analízis egy megbízható módszer az egyes populációk elkülönülése (Boys et al., 2005). Egyes feltételezések szerint a populációkon belüli genetikai elkülönülés és geográfiai távolság pozitív korrelációban állnak (Allendorf&Waples, 1996), ellenben számos tanulmány eredményei cáfolják ezen állítást

(Rayman, 1993; Nielsen et al., 1996). Ennek ellenére a honos populációk közti elválás (ebben az esetben volt a legnagyobb földrajzi távolság) megerősítést ad a későbbi vizsgálatokhoz az átfogóbb mintagyűjtés fényében.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy új, működő képes markereket találtunk a *S. gigantea* populációinak (őshonos és invazív) elkülönítésére. Az ITS régiók analízise a magas aranyvessző esetében nem alkalmazható, mivel a genomjuk ezen része nem eléggé variábilis. Ugyanakkor a mikroszatellit fragmenthossz analízis és a ploidia analízis együttes használatát ajánljuk a faj populáció genetikai vizsgálatára. Ezen módszerek és nagyobb léptékű mintavételezés felhasználásával részletesebb képet kaphatunk a faj földrajzi és genetikai elkülönüléséről.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni Dr. Stranczinger Szilvia és Nagy Dávid témavezetőinknek, illetve köszönjük azoknak, akik a labormunkában segítséget nyújtottak: Kovács Zoltán, Szénásy Dalma, Dr. Pál Róbert, Dr. Szalontai Bálint.

7. Függelék

7.1. Irodalom jegyzék