

## ZÁRÓJELENTÉS

a

***Genetikai diverzitás vizsgálatok őshonos *Pinus cembra* L. populációknál. Populáció-  
ökológiai, populáció-genetikai, erdészeti-, táj-, és vegetációtörténeti vonatkozások.***

című OTKA pályázathoz



A cirbolyafenyő populációi Európában mindenütt védettek!



**A pályázatban megfogalmazott kutatási célunknak megfelelően vizsgálataink során molekuláris alapon jellemeztük az európai cirbolyafenyő *Pinus cembra* L. közép-európai /Kárpátokbeli/ őshonos állományainak genetikai diverzitását.**

#### **A cirbolyafenyő és a munka időszerűsége:**

A populációsztintú biológiai diverzitás elemzésénél az a tény, hogy a molekuláris alapon történő genetikai diverzitási vizsgálatok egyre inkább nagyobb hangsúlyt kapnak abban a felismerésben gyökerezik, hogy a genetikai diverzitás az ökoszisztéma *önszabályozó* mechanizmusának szerves nélkülözhetetlen része.

A cirbolyafenyő -*Pinus cembra* L.- haploxyton /egynyalábú/ típusú, öttűs fenyőféle. Kontinentális jellegű, jégkorszaki maradványfaj, amely az Alpi hegrendszer montán ökoszisztémáinak lényeges diverzitás meghatározó eleme. A pleisztocén idején ez a nagy területeket borító fenyőfaj széles elterjedt volt Euráziában, de areája az utóbbi 100000 évben és különösen a holocén idején erősen fragmentálódott. Szibéria területén az ázsiai alfaj még nagy területeket borít, de Európában a populációk mára a Központi Alpok térségére koncentrálnak, ahol a felső lucos zóna elegy fafajaként nagyobb tömegben fordul még elő. A Kárpátok térségében azonban csak szórványos előfordulású, izolált kispopulációi az erdőzóna határán a luccal elegyednek, a magasabb havasokban a törpefenyő zónájáig hatolnak fel. Az Északi-Kárpátokban a 49. szélességi fokig húzódik, legdélebbi előfordulása a hegláncban a Déli-Kárpátok; a Godján-Szárkő-Retyezát hegységben van.

A védett cirbolyafenyő állományainak tanulmányozása azért is vált időszerűvé, mert az Alpok térségében, és az ázsiai területeken is, korábban már vizsgálták a faj genetikai variabilitási mutatóit, a hiányzó láncszem éppen a Kárpátok térsége volt. Továbbá, mivel ennek a kis elterjedésű elegyfajnak a Kárpátok hegyvidékein nincsen különösebb erdészeti jelentősége, a lucosokban végzett erdészeti tevékenység, favágások és telepítések, a populációk egyedszámának csökkenéséhez vezettek, így a természetes populációstruktúra feltérképezése természet- és tájvédelmi szempontból is indokoltá vált.

## A kutatásban alkalmazott vizsgálati anyag és módszerek

A Tátra és Kárpátok vonulatának teljes hosszában tíz természetes populációból gyűjtöttünk levélmintát.

### Kárpátok

Földrajzi hely	Rövidit.	Hegység neve	Ország	Földrajzi koordináták	Mintaszám
Morskie-Oko	Leng	Tátra	Lengyelország	49.12; 20.05	18
Velka Studena Dolina Nagy-Hideg völgy	Szlov	Tátra	Szlovákia	48.03; 18.18	27
Strbske Pleso Csorba-tó	Tatr	Tátra	Szlovákia	49.07; 20.04	10
Kedryn, Erdészeti rezervátum	Ukr	Erdős Kárpátok	Ukrajna	48.25; 24.00	14
Borsabánya	Rad	Muntii - Rodnei .- Keleti Kárpátok Radnai havasok	Románia	46.56; 23.43	15
Neagra Sarului	Suc	Muntii Calimani – Keleti Kárpátok Kelemen havasok É	Románia	47.14; 25.20	56
Negoiu	Kel	Muntii Calimani – Kelemen havasok D	Románia	47.06; 25.13	57
Cindrel	Cind	Muntii-Cindrel Szebeni Havasok Déli-Kárpátok	Románia	45.35; 23.48	15
Gentiana	Rety	Retezat Mts. Déli-Kárpátok Retyezát	Románia	45.24; 22.51	16
Gemenele	Ret	Retezat Mts. Déli-Kárpátok Retyezát	Románia	45.22; 22.50	20

Ezt később összevetettük 19 Alpokból származó populációval. Az összehasonlításba bevont mintákat Felix Gugerli, WSL Swiss Federal Research Institute munkatársa bocsátotta rendelkezésünkre.

### Alpok - Svájc

Mürtschen	Mür	Obstalden	GL	9.15; 47.05	32
Neuenalp	Neue	Grabs	SG	9.35; 47.17	18
Saflischtal	Saf	Gregniols	VS	8.14; 36.33	18
Kreuzboden	Kreu	Saas-Grund	VS	7.96; 46.13	34
Fôret de Derbellec	For	Chandolin	VS	7.60; 46.25	34
Siviez	Siv	Nendaz	VS	7.33; 46.13	34
Col du Pillon		Ormont-Dessus	VD	7.20; 46.34	33
Fôret du Lapé	Lape	Charmey	FR	7.23; 46.55	34
Rautialp	Rau	Näfels	GL	9.00; 47.07	33
Flumserberg	Flum	Quarten	SG	9.24; 47.08	30
Letziwald	Letzi	Avers	GR	9.50; 46.47	34
Sardonaalp	Sard	Pfäfers	SG	9.29; 46.92	24
Stazerwald	Sta	Samedan	GR	9.89; 46.51	31
God Baselgia	God	Zernez	GR	10.12; 46.70	34
God Tamangur	Tam	Scuol	GR	10.36; 46.67	34
Alp Sadra		Fuldera	GR	10.34; 46.60	34
Seebergalp	See	Zweisimmen	BE	7.44; 46.58	34

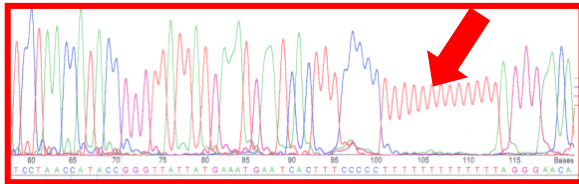
Sagiwald	Sagi	Kandersteg	BE	7.64; 46.44	34
Arvengarten	Arv	Grindelwald	BE	7.97; 46.60	34

## Módszer

A DNS kivonást követően Vendramin és mts. által kidolgozott kloroplasztisz SSR markerekkel végeztük el a vizsgálatot.

*A módszer lényege*

cpSSR markerek: /simple sequence repeats/



- mononukleotidos ismétlődés
- nagy polimorfizmus
- rekombináció hiánya
- fenyőféléknél apai (pollen általi) öröklődés

*Lépések*

- I. DNS-kivonás
- II. Amplifikáció PCR-készülékben

*7 primert teszteltünk*

*Pt1254; Pt15169; Pt26081; Pt30204; Pt36480; Pt63718; Pt87268*

- III. Agaróz gélelektroforézis: az amplifikáció sikerességének megállapítására
- IV. Fragmensanalízis szekvenáló készülékkel
- V. Statisztikai értékelés

6 SSR lókuszt bizonyult használhatónak (*Pt 1254* nem amplifikálódott minden esetben), 1 primer volt monomorf.

*A vizsgálat helyszínei:*

- A módszer tesztelését Firenzében - CNR Istituto di Genetica Vegetale- laborban végeztük G.G. Vendramin hozzájárulásával.
- Sikeres tesztelés követően a DNS kivonást és a PCR reakciót, a termékek minőségi tesztelését agaróz gélen Budapesten végeztük.
- A fragmensanalízist ugyancsak a firenzei laboratóriumba végeztük el.
- Az eredményeket és a statisztikai elemzéseket Budapesten végeztük.

A Kárpátok esetében 6 SSR régiót értékeltünk ki.

Az Alpokkal történő összehasonlítást 3 SSR régió mentén végeztük el.

## Eredmények

Az 5 variábilis cpSSR marker mentén megállapított haplotípus variabilitás magas volt minden populációban.

Vizsgált populáció	$n_e$	$f_{\alpha}$	$H_e$
Szlovák-Tátra	15,54	0,148	0,9716
Lengyel-Tátra	11,49	0,167	0,9667
Erdős-Kárpátok (Ukr.)	15,14	0,095	0,9806
Radnai-havasok	4,57	0,214	0,8412
Cindrel	7,74	0,200	0,9331
Retyezát	12,92	0,125	0,9841
Populáció menti átlag	11,23	0,158	0,9462
Fajra nézve	45,22	0,054	0,9868

$$F_{st}=0,044$$

$n_e=1/\sum p_i^2$  : a haplotípusok effektív száma

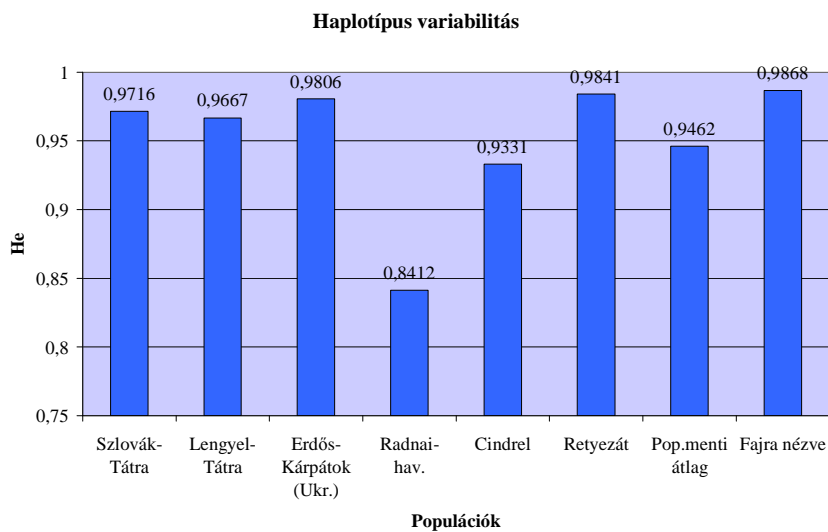
$f_{\alpha}$ : a leggyakoribb haplotípus frekvenciája

$H_e=(n/n-1)(1-\sum p_i^2)$  : haplotípus diverzitás

$F_{st}=(V_T-V_w)/V_T$  : a populációk közötti divergencia mértéke

$V_w$ : a diverzitás mértéke a populáción belül

$V_T$ : a megvizsgált állományok összdiverzitása



Populáció paraméterek és genetikai diverzitás mutatók az IAM /infinite allele model/ szerint

Állomány	Minta- szám	Allélszám (TFPGA)	Haplotípusok száma	Populáció specifikus haplotípus	H <sub>e</sub> 1.
Szlovák-T.	27	19	20	15	0,4501
Lengyel-T.	18	16	14	11	0,4915
Erdős- Kárp.	21	15	17	12	0,3486
Radnai- hav.	14	11	7	5	0,2821
Cindrel	15	16	10	6	0,3921
Retyezát	16	21	14	9	0,5208
Összesen	111	24	82	58	-
Populáció menti átlag	18,5	16,34	13,67	10	0,4047
Fajra nézve	-	-	-	-	0,4872

F<sub>st</sub>= 0,169

H<sub>e</sub> 1.:Arlequin 2000 alapján mért heterozigócia értékek (Nei, 1987)

H<sub>e</sub> 2.:TFPGA 1997 alapján mért heterozigócia értékek (Nei, 1987)

F<sub>st</sub>=(V<sub>T</sub>-V<sub>w</sub>)/V<sub>T</sub> :a populációk közötti divergencia mértéke

V<sub>w</sub>: a diverzitás mértéke a populáción belül

V<sub>T</sub>: a megvizsgált állományok összdiverzitása

A cpSSR markerek alapján végzett diverzitás vizsgálatok azt mutatják, a populációk genetikai variabilitása általánosan magas volt.

A legkisebb variabilitást minden tekintetben a Radnai állomány mutatta. Ez azért is érdekes, mert mindeközül a Keleti-Kárpátok területén előforduló két nagyobb populáció közül (Kelemen- és Radnai-havasok) a Radnait tekintették a faji génkészlet legjelentősebb bázisának. Már az 1913-as, híres Fekete-Blattny erdészeti monográfia is úgy említi, hogy a Radnai-havasok havasifenyő vegetációja az előfordulás gyakorisága és horizontális kiterjedése szempontjából is megelőzi a Kelemen-csoportot. Azonban a Radnai populációból kimutatható a genetikai mintázat elszegényedése, és így az állomány messze lemarad a Kelemen-havasokban még korábban mért variabilitás mögött (Höhn 2005).

A két tátrai állomány (szlovákiai és lengyelországi Tátra), mind a heterozigócia mind a haplotípus diverzitás szempontjából, hasonló értékekkel szerepelnek. A szintén korábban vizsgált szlovákiai populáció ugyancsak magas variabilitást mutatott.

Az ukrajnai állomány helyzete a statisztikai mutatók szempontjából kissé ellentmondásos. A haplotípus variabilitási érték alapján a legdiverzebb állományok egyike, magas effektív haplotípus számmal. Azonban a további mutatók közül a heterozigócia érték már igen alacsony. Erre a látszólagos ellentmondásra a megoldás az adatsorban keresendő. A 17 haplotípus közül ugyanis három tartalmaz 1-1 hiányzó adatot (\*-gal jelölve). Ezen haplotípusokat a program önállóként, sőt populáció specifikusként értelmezte. A teljes adatsorra nézve ennyi hiányzó adat megengedett, de mint látszik, a populáció egyedi értékelésében némi zavart kelthet. Így lehetséges, hogy a haplotípusok gyakorisága alapján számított haplotípus variabilitás érték viszonylag magas lett, és nem egyezik a valós heterozigócia értékkel.

A Szebeni-havasokból származó cindreli állomány effektív haplotípus száma viszonylag alacsony volt, akárcsak a haplotípus variabilitási és a heterozigócia értékek. Ennek oka vélhetőleg a kis populációméretben keresendő, ami már a terepmunka során is feltűnt. Az alacsony egyedszámú populáció a genetikai típusok kisebb hányadát őrizte meg.

A haplotípus frekvenciák alapján mért  $F_{st}$ -érték ( $F_{st}=0,044$ ) a populációk közötti divergenciát mutatja, ami 4,4 %. A faji szintű variabilitás magas volt, bár egyes populációk diverzitása markánsan csökkent a faji átlaghoz képest. Az eredményekből közölt mutatók és megállapítások érvényesek más szórványos areájú fenyőfélék esetében is (Hamrick - Godt, 1990, 1996), ahol a magas összdiverzitás általánosan a populáción belüli nagy variabilitásból fakad. Az eredmények azt tükrözik, hogy a cirbolyafenyő izolált, kis populációi még mindig nagy géntartalékkal rendelkeznek, bár mint azt a cindreli állomány példája is jelzi, az egyedszám drasztikus csökkenése a genetikai típusok jelentős veszteségét eredményezheti.

A fenti eredmények fajtörténeti vonatkozásban azt igazolják, hogy a Kárpátok területén előforduló, földrajzilag izolált állományok elkülönülése a közelmúltra tehető. Így a genetikai mintázatban az elkülönülés következményei, ezen markerek alapján, nem tettenérhetők. Összességében úgy tűnik, hogy még mindegyik izolált állomány jelentős géntartalékokat őrzött meg, mely e védett faj fennmaradása szempontjából pozitív üzenetet hordoz.

## Összehasonlító vizsgálatok a Kárpátok és a Központi Alpok között

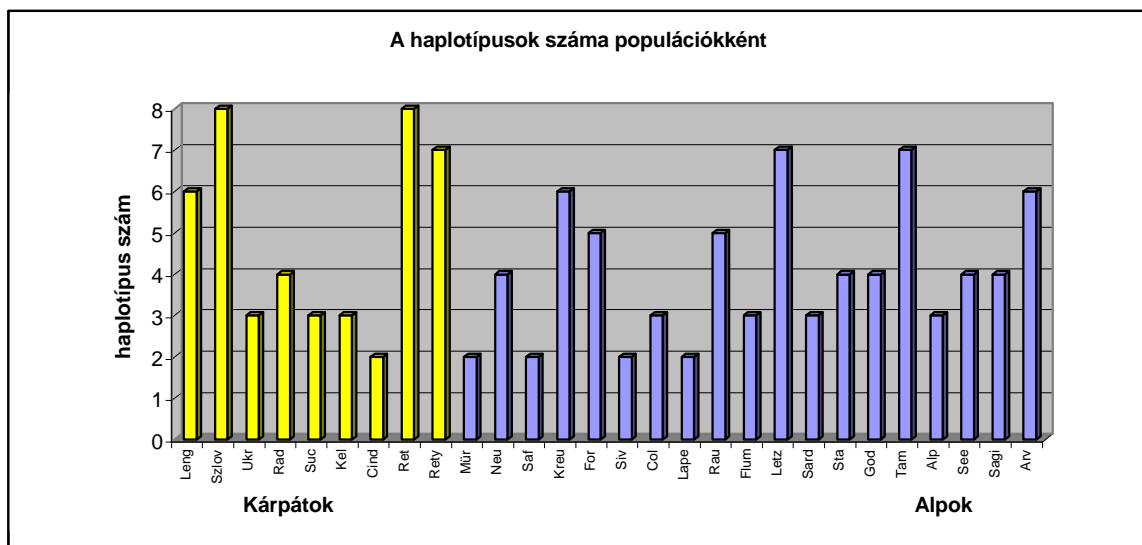
Az összehasonlító vizsgálatokat nehezítette az a tény, hogy a mintákat több alkalommal vizsgáltuk, más-más fragmens analízátorral, így csak számos ismétlés, kontroll mellett sikerült az adatokat egységesíteni, 3 primer mentén:

*Pt 26081      Pt36480      Pt63718*

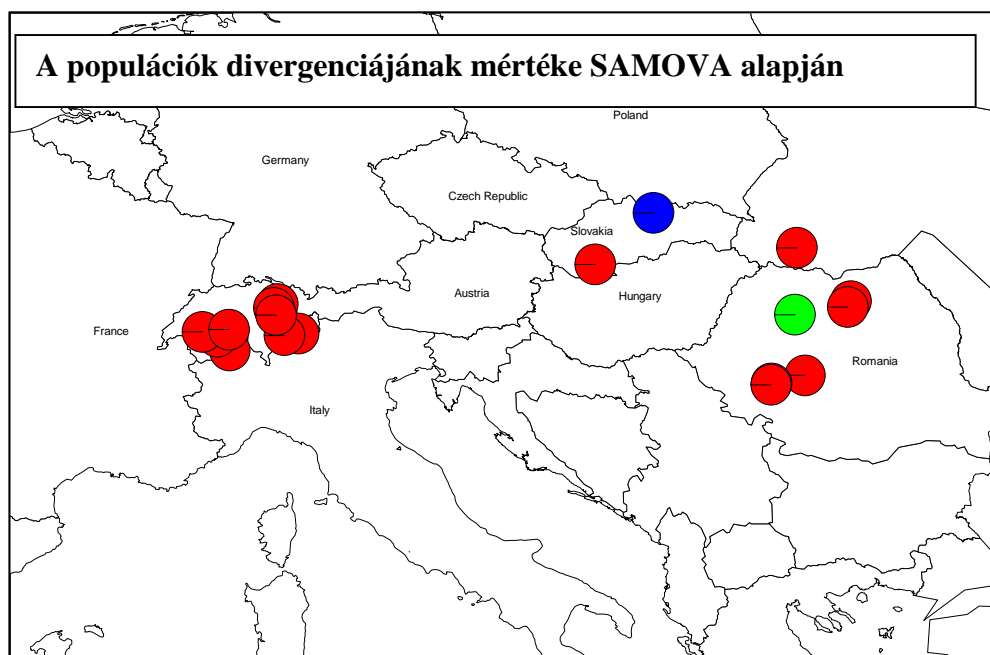
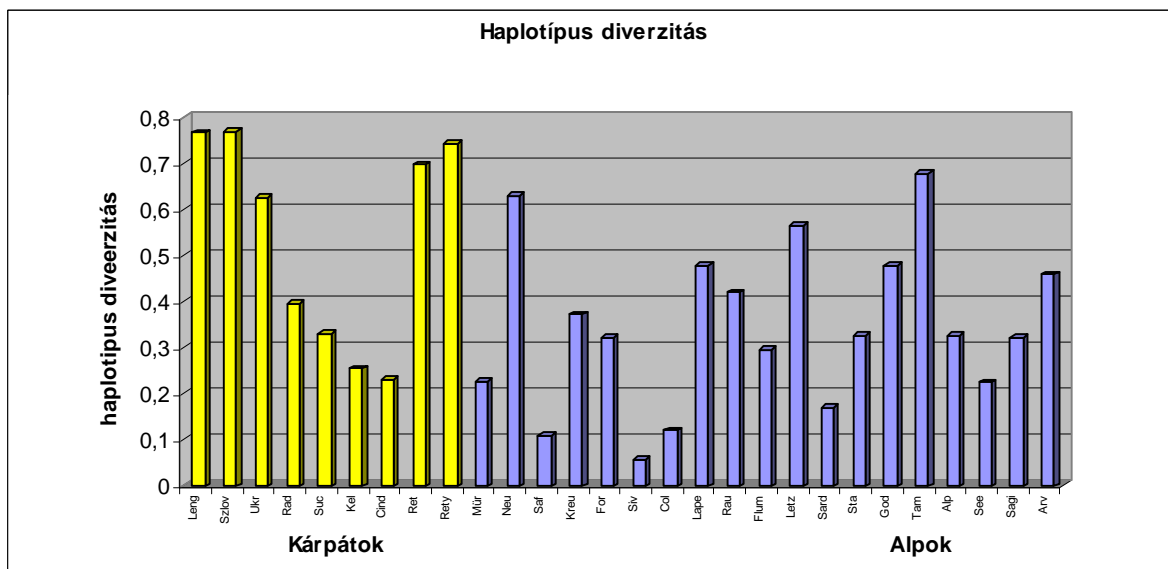
*A vizsgálat célja:*

- Összehasonlítani a periférikus elhelyezkedésű Kárpátok kispopulációit az Alpok populációival.
- Az európai génkészlet felbecsülése a számított mutatók mentén.

**Nagyobb diverzitást feltételeztünk az Alpokban mint a Kárpátokban az utóbbi állományok izoláltsága és kis egyedszáma miatt!**







***Következtetések:***

- A három kloroplasztisz SSR alapján a cirbolyafenyő genetikai variabilitása az európai area mentén általánosan magas volt.
- **Az izoláció és kis méretek ellenére a Kárpátok populációi magasabb diverzitási mutatókkal rendelkeztek mint az Alpok populációi**, több specifikus haplotípust őriztek meg mint az Alpok populációi. Ennek vélhető oka a nagymértékű idegen megporzás (a pollen igen messzire eljuthat), valamint a beltenyésztéses embriók alacsony túlélőképességében rejlik.

- A legvariábilisabb populációk három cpSSR alapján is a Retyezát hegység populációi voltak, ezt követték a Tátrában lévő populációk.

Élképzéseink - miszerint a két földrajzi régió genetikailag elkülönül-, igazolódott. Ennek mértéke az  $F_{st}$  alapján 12%, tehát viszonylagosan magas. A Kárpátok populációinak divergenciája nagyobb mértékű volt ( $F_{st}= 0,18$ ), mint az Alpok területén lévő populációké ( $F_{st}= 0,04$ ). Ez a tény egyrészt azt jelzi, hogy az izoláció jelei a Kárpátok populációinál nagyobb mértékben mutatkoznak, másrészt jelentheti azt, hogy a Kárpátok reliktum génállománya más genetikai típusokban öröklődött át, mint az Alpok. Ennek a ténynek a faj túlélése szempontjából óriási jelentősége van. Minél változatosabb egy faj areán belüli génkészlete és diverzitása, annál nagyobb a túlélési esélye!

- A SAMOVA (Spatial Analysis of Molecular Variance) alapján mért távolságok azonban, azt mutatták, hogy nincs szignifikáns korreláció a földrajzi távolság és a populációk divergencia mértéke között. Úgy tűnik, az izoláció óta eltelt idő túl rövid volt, ahhoz hogy a populációk szignifikáns genetikai elkülönülése megtörténjen. Két divergens populáció mutatkozott a Kárpátok területén. Egyik a Tátrai Morskie-Oko állománya, mely egy nagy egyedszámú, zárt gleccservölgyben található populáció; vélhetőleg magas fokú izoláltság jellemzi.

Másik a Kelemen havasok déli állománya, mely kisebb egyedszámú és úgy tűnik az északi állomány néhány anyaegyedéből származó periferikus állomány, sok sziklai egyeddel, amelyek nagyrészt a sziklarepedésekbe, a fenyőszajkó által elrejtett magok csírázásából gyarapodik (Höhn 2005).

## **Zárszó**

Az általunk kiválasztott molekuláris módszerrel jellemeztük a Kárpátok cirbolyafenyő populációinak genetikai diverzitását. A vizsgált markerek alapján bebizonyítottuk, hogy a faj jelentős génkészletekkel rendelkezik a Kárpátok és a Tátra területén, és ez a génbázis más, mind ami az Alpok területén őrződött meg. A legnagyobb egyedszámú populációk közül legvariábilisabbak a Déli-Kárpátok - Retyezát hegység populációi, ezt követik a Tátra állományai. A kis egyedszámú populációk génkészlete leszegényedett. A Radnai havasok állományáról korábban azt állították, hogy nagy génkészletet őriz, de ezek a tények a mi vizsgálataink során nem igazolódtak.

Bizonyítottuk hogy, a cirbolyafenyő története és túlélési esélye szempontjából a Kárpátok térsége óriási jelentőségű, minden egyes állomány szigorú védelme indokolt.

Az egyedekből begyűjtött és tárolt levél illetve DNS minták alkalmasak további markerekkel történő vizsgálatra is. Tervezzük olyan nukleáris markerek kidolgozását, amelyek segítségével a magok útja is követhető lesz. Így lehetőség nyílhat arra, hogy nyomon kövessük a

populációk egyedeinek terjedését, a fenyőszajkóval történő koevolúció megfigyelését. Ennek a kispopulációk túlélése esetében jelentősége lehet.