

Roth Gyula Erdészeti és Vadgazdálkodási Tudományok Doktori Iskola
Erdei ökoszisztémák ökológiája és diverzitása program

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Benke Attila

A *Leuce* szekcióba tartozó hazai nyárok dunántúli természetes eredetű
állományainak populációgenetikai vizsgálata

Témavezető: Dr. Mátyás Csaba

Sopron

2014

A LEUCE SEKCIÓBA TARTOZÓ HAZAI NYÁRAK DUNÁNTÚLI TERMÉSZETES
EREDETŰ ÁLLOMÁNYAINAK POPULÁCIÓGENETIKAI VIZSGÁLATA

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

a Nyugat-magyarországi Egyetem Roth Gyula Erdészeti és Vadgazdálkodási Tudományok
Doktori Iskolája

Erdei ökoszisztémák ökológiája és diverzitása programja

Írta:

Benke Attila

Készült a Nyugat-magyarországi Egyetem Roth Gyula Erdészeti és Vadgazdálkodási
Tudományok Doktori Iskola

Erdei ökoszisztémák ökológiája és diverzitása programja keretében

Témavezető: Dr. Mátyás Csaba

Elfogadásra javaslom (igen/nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton %-ot ért el,

Sopron/Mosonmagyaróvár

.....

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr.....) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr.....) igen/nem

(aláírás)

(Esetleg harmadik bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján %-ot ért el

Sopron,

.....

a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése

.....

Az EDT elnöke

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és témamegjelölés.....	9
2.	Szakirodalmi áttekintés	10
2.1.	Levélmorfológiai vizsgálatok.....	10
2.1.1.	Mérföldkövek a <i>Leuce</i> nyárok hazai morfológiai kutatásában.....	10
2.1.2.	Levélmorfológiával kapcsolatos kutatások nyáron.....	10
2.1.3.	Alakelemzés elliptikus Fourier leírók segítségével	14
2.2.	Molekuláris genetikai vizsgálatok	17
2.2.1.	Korai genetikai és fenológiai vizsgálatok <i>Leuce</i> nyáron, Magyarországon.....	18
2.2.2.	Markerezési technikák a nyárok molekuláris genetikai vizsgálatában	18
2.2.2.1.	<i>Izoenzim vizsgálatok</i>	18
2.2.2.2.	<i>RFLP és PCR-RFLP</i>	20
2.2.2.3.	<i>RAPD</i>	22
2.2.2.4.	<i>SSR</i>	24
2.2.2.5.	<i>AFLP</i>	27
2.2.2.6.	<i>SNP</i>	29
3.	Anyag és módszer	31
3.1.	Mintafák kijelölése, levélminta-gyűjtés.....	31
3.2.	Levélmorfológiai vizsgálatok.....	32
3.3.	Molekuláris genetikai vizsgálatok	34
3.3.1.	DNS kivonás.....	34
3.3.2.	PCR-RFLP vizsgálat	35
3.3.3.	RAPD vizsgálat	36
3.3.4.	SSR vizsgálat	37
3.4.	Statisztikai elemzés	38
4.	Eredmények és megvitatásuk.....	39
4.1.	Levélmorfológiai vizsgálatok.....	39
4.1.1.	Levélalak elemzés Shape 1.3 programmal.....	39
4.1.2.	Főkomponensek szignifikancia-vizsgálata.....	40
4.1.3.	Diszkriminancia analízis	41
4.1.4.	Kanonikus analízis.....	44
4.2.	Genetikai vizsgálatok.....	46
4.2.1.	Egyedbesorolás molekuláris genetikai és levélmorfológiai jellegek alapján	46
4.2.2.	SSR analízis.....	48

4.2.3.	RAPD analízis.....	52
4.2.4.	PCR-RFLP vizsgálat.....	54
4.2.5.	Hibrid egyedek elemzése Structure 2.1 szoftverrel.....	58
5.	Eredmények gyakorlati alkalmazhatósága, javaslatok a további kutatásokra	63
6.	Összefoglalás	65
7.	Tézisek.....	68
8.	Köszönetnyilvánítás	69
9.	Irodalomjegyzék.....	70
10.	Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	83
11.	Mellékletek jegyzéke (CD)	86

Összegzés

A *Leuce* szekcióba tartozó hazai nyárok dunántúli természetes eredetű állományainak populációgenetikai vizsgálata

Dunántúli természetes eredetű populációkból származó fehér nyár és rezgő nyár egyedek molekuláris genetikai vizsgálatát végeztem el az egyes populációk genetikai diverzitásának felmérése céljából. A vizsgálatokba bevont egyedek terepi meghatározását a mintafák levélalakját elliptikus Fourier leírók használatán alapuló alakelemző szoftver segítségével, valamint 6 SSR markerrel végzett molekuláris genetikai vizsgálattal ellenőriztem. A két módszer által együttesen besorolt egyedek populációgenetikai vizsgálatát a már említett mikroszatellit analízis mellett két primeren alapuló RAPD markerezéssel, valamint az egyedek kloroplaszt DNS-énk változatosságát feltáró PCR-RFLP módszerrel is elvégeztem. Utóbbi vizsgálat lehetőséget biztosított a fajok filogenetikai vizsgálatára is. Az SSR analízis során a legmagasabb genetikai változatosságot a belső-somogyi, a zselici és a szigetközi fehér nyár, valamint a bakonyi, a zselici és a belső-somogyi rezgő nyár populációk mutatták, míg a RAPD analízis során a fehér nyár esetében a belső-somogyi, a drávamenti és zselici, a rezgő nyár tekintetében pedig a belső-somogyi, a villányi-hegységi, a zselici és a mecseki populációk bizonyultak a legdiverzebbnek. A Nei-féle genetikai távolság alapján szerkesztett dendrogrammal nem sikerült kapcsolatot kimutatnom az egyes populációk földrajzi és genetikai távolsága között. A PCR-RFLP vizsgálat során kimutatott haplotípus adatok és diverzitás értékek alapján a fehér nyárok között a szigetközi, a zselici, a keszthelyi-hegységi és a drávamenti, a rezgő nyárok között a bakonyi és a villányi-hegységi populációk mutatták a legnagyobb genetikai diverzitást. Az egyes haplotípusok leszármazási viszonyait kifejező Median-joining hálózat, valamint a vizsgált populációk haplotípus diverzitás értékei a két faj esetében a Dunántúlt érintő posztglaciális rekolonizációjuk kapcsán eltérő filogenetikai utat valószínűsítenek. A morfológiai és genetikai vizsgálatok során azonosított hibrid szürke nyár egyedek introgresszió vizsgálata során nagyobb arányban azonosítottam fehér nyár szülővel visszakereszteződött egyedeket, ami alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, mely szerint az ezirányú visszakereszteződés lehetősége nagyobb a rezgő nyár irányából való introgressziónál.

Summary

Genetic investigation on natural populations of native *Leuce* poplar species in the Transdanubian region

Molecular genetic investigation of white poplar and aspen trees was carried out in order to survey the genetic variation of their transdanubian populations. Species identification was controlled on the one hand by leaf shape analysis using a shape analysing software based on elliptic Fourier descriptors and on the other hand by microsatellite analysis using 6 polymorphic markers. The genetic analysis was carried out applying SSR, RAPD and PCR-RFLP techniques in the case of the individuals that showed the same taxonomic origin based on the two identification methods. The latter molecular method offered an appropriate way for phylogenetic investigation of the populations of both species. The following populations showed the highest genetic variation according to the SSR analysis: Belső-Somogy, Zselic, Szigetköz in the case of white poplar, and Bakony, Zselic, Belső-Somogy in the case of aspen. High genetic diversity were found using polymorphic RAPD markers in the white poplar populations of Belső-Somogy, Villányi-hegység and Zselic, while in the Belső-Somogy, Villányi-hegység, Zselic and Mecsek populations in the case of aspen. The dendrogram constructed by the Nei's genetic distance did not show clear connection between the geographic and genetic distances of the populations. High level of genetic diversity were revealed based on haplotype distribution and diversity indices derived from PCR-RFLP analysis in the white poplar populations of Szigetköz, Zselic, Keszthelyi-hegység and Drávamenti-síkság, as well as in the aspen populations of Bakony and Villányi-hegység. The structure of the Median-joining network expressing the genealogical relationship of the haplotypes jointly with the haplotype diversity values of the populations refer to different probable phylogenetic ways in the case of the two poplar species during their postglacial recolonization in Transdanubia. Among the grey poplar trees identified by the morphologic and genetic investigations individuals backcrossed by a white poplar parent tree were found in higher proportion. This result supports the former observation, that the probability of backcrossing between hybrids and white poplar is higher, than between hybrids and aspen.

1. Bevezetés és témamegjelölés

A *Leuce* szekcióba tartozó hazai nyáraink, fő- vagy elegyfajként, rendkívül értékes tagjai számos hazai természetes erdőtársulásnak. Ezen társulások, ezáltal a fajok védelme ugyanakkor nemcsak természetvédelmi szempontból fontos, hiszen a fajok, különösen a fehér nyár és a hibrid szürke nyár, az erdészeti nemesítés számára is kiemelt jelentőséggel bírnak. A nemesítési tevékenység és a nemesítés tárgyát képező faj morfológiai, fenológiai tulajdonságainak, genetikai hátterének megismerése egymástól nem elválasztható tevékenységek, mint ahogyan azt nagy erdészeti nemesítő elődjünk is megfogalmazták: *„Minden növény, így természetesen az erdei fák nemesítésének is elengedhetetlen előfeltétele, kiindulási alapja a nemesítendő növény, illetve faj részletes és pontos ismerete. Fokozottan vonatkozik ez a nyárokra, amelyek kétlakiságuk miatt természetes úton is annyira kereszteződnek egymással, hogy a fajtisztaság felismerése még szakavatott szem számára is igen nehéz feladat.”* (Koltay et Kopecky, 1954).

Ezért választottam disszertációm témájaként a *Leuce* szekcióba tartozó hazai őshonos nyáraink (fehér nyár és rezgő nyár) dunántúli természetes eredetű populációinak genetikai célú kutatását. A kutatásom célkitűzése elsősorban az egyes fajok populáción belüli és populációk közötti genetikai diverzitásának felmérése, valamint a hibrid szürke nyár egyedek vizsgálata által a két faj közötti genetikai introgresszió felmérése volt. A vizsgálatokkal a következő kérdéseket terveztem megválaszolni:

- Az elliptikus Fourier leírókon alapuló levélalak elemzés alkalmas-e a fehér nyár és a rezgő nyár egyedek elkülönítésére, valamint a hibrid alakok azonosítására?
- Mely populációk rendelkeznek a két faj esetében a legmagasabb genetikai diverzitással?
- Milyen mértékű a két faj dunántúli állományainak populáción belüli és populációk közötti genetikai differenciáltsága?
- Milyen filogenetikai kapcsolat áll fenn az egyes fajok dunántúli populációi között?
- Milyen mértékű szülő fajok felőli introgresszió figyelhető meg a természetben előforduló szürke nyár egyedek körében?

A vizsgálatokat, kutatási tervem alapján, a következő metodika szerint terveztem elvégezni:

- A természetes eredetű állományokban gyűjtött egyedek levélalak elemzése fajmeghatározás céljából, elliptikus Fourier leírók használatán alapuló levélalak elemző szoftver segítségével,
- Kloroplaszt DNS vizsgálata egy PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) eljárással, az anyai úton öröklődő haploid genom által nyomon követhető genetikai variabilitás megismerése céljából,
- RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) módszert a sejtmagi DNS vizsgálatára, olyan markerek keresése érdekében, melyek laboratóriumi körülmények között egzakt módon lehetővé teszik az egyes fajok, hibridek elkülönítését.
- SSCP (*Single-strand Conformation Polymorphism*) módszer, szintén a genetikai variabilitás, illetve a hibridek genetikai jellemzőinek megismerése céljából (ez utóbbi módszert a későbbiekben mikroszatellit elemzéssel váltottam ki, melyet a genetikai diverzitás vizsgálatok mellett az egyedsoroláshoz is alkalmaztam).

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Levélmorfológiai vizsgálatok

2.1.1. Mérföldkövek a *Leuce* nyárok hazai morfológiai kutatásában

Ahogy az a bevezetés és témamegjelölés című fejezetben ismertetésre került, kutatási célkitűzésem szerint a mintázásra kerülő egyedek faji besorolását elliptikus Fourier módszeren alapuló levél-morfometriai eljárással terveztem elvégezni. Bár kutatásomat később egy, a fajazonosítást lehetővé tevő molekuláris genetikai módszerrel (SSR) is kiegészítettem, a levél-morfometriai vizsgálatok elvégzését továbbra is fontosnak tartottam.

Bár a nyárok levélmorfológiai vizsgálatainak szakirodalmi áttekintésében – tekintettel az általam választott vizsgálati módszerre – a hangsúlyt a morfometriai vizsgálatok bemutatására helyezem, a magyarországi, elsősorban taxonómiai célú *Leuce* nyár kutatásokban elért eredmények kapcsán fontosnak tartom kiemelni dr. Gombocz Endre és dr. Bartha Dénes munkásságát.

Gombocz, bár munkásságának korai szakaszán azon véleményt osztotta, mely szerint a fehér nyár (*Populus alba* L.) és a rezgő nyár (*Populus tremula* L.) egymással nem hibridizálódik, és a köztes morfológiai bélyegeket mutató egyedek a fehér nyár alakkörébe tartoznak, keresztezési kísérletekkel igazolta a hibridizáció lehetőségét (bár kísérleti eredményei alapján csak a *Populus alba* L. × *P. tremula* L. kereszteződési irányt tartotta lehetségesnek, valamint a hibrid egyedek sterilizációját is valószínűnek tartotta; Gombocz 1926). Terepi megfigyelései alapján részletes levélmorfológiai és levélanatómiai leírást is közölt az F₁-es hibrid szürke nyárokra (*P. × canescens* Sm.) illetően (Gombocz 1928).

Taxonómiai kutatásaiban Bartha Dénes behatóan vizsgálta a fehér és a rezgő nyár, valamint az F₁-es szürke nyár utódnemzedék és a szülőfajok közötti introgressziót. 4 természetes eredetű fehér nyár populáció introgresszálságát értékelte, populációnként 40-40 egyed alapján, melyeket 8 morfológiai bélyeg (köztük 4 levélmorfológiai jelleg) alapján felállított, 0-tól 24-ig terjedő hibridindex skála szerint osztályozott (Bartha, 2005). Vizsgálatai során megállapította, hogy a száraz homoki termőhelyeken nagyobb számban fordultak elő hibrid egyedek, míg az ártéri termőhelyeken álló populációkat gyenge introgresszálság, azaz igen kisszámú hibrid egyed jelenléte jellemezte. Az alkalmazott hibridindex értékek alkalmasak bizonyultak az F₁-es szürke nyár egyedek visszakereszteződésének értékelésére is. A kapott értékek szerint a szürke nyár jellemzően a fehér nyárral kereszteződik vissza. Ugyancsak 21 természetes eredetű fehér nyár populációt 8 morfológiai bélyeg értékelésén alapuló, 0-tól 16-ig terjedő hibridindex skálával jellemezve Bartha többek között megállapította, hogy introgresszált populációk elsősorban az emberi behatással érintett termőhelyeken fordulnak elő (ezek általában a homoki termőhelyek), valamint, hogy a hibridizációs zónákban a visszakereszteződések a fehér nyár jellegű szürke nyárok létrejöttének kedveznek, melynek az oka a fehér nyár rezgő nyárhoz viszonyított későbbi virágzásában keresendő (Bartha, 1991b).

2.1.2. Levélmorfológiával kapcsolatos kutatások nyáron

A nyárok levélmorfológiai elemzésével számos nemzetközi publikáció foglalkozik. Ezen kutatások célja ugyanakkor csak részben taxonómiai indíttatású, számos közülük egyéb, elsősorban genetikai vizsgálatok eredményeinek értékeléséhez végzett referenciamérésekre és azok értelmezésére szorítkozik.

Bár vizsgálataikat más típusú levélmorfológiai paraméterekre alapozták, Rood és munkatársai által végzett kutatás, elsősorban célja és választott kiértékelési módszere alapján, nagy hasonlóságot mutat az általam végzettel. Kanada Alberta és Brit-Kolumbia államaiban összesen 10 folyó mentén gyűjtöttek 3 fajhoz (*Populus deltoides* MARSH., *P. angustifolia* JAMES, *P. balsamifera* L.) és azok hibridjeihez tartozó összesen 56 természetes eredetű nyáregyedről szárdugványokat. A levélmorfológiai vizsgálatokba a szárdugványokból nevelt két éves gyökeres dugványok hosszúhajtásainak kora őszi kifejlett leveleit vonták be. A leveleken a következő 8 paramétert mérték: levéllemez hossza, maximális szélessége, a levéllemez maximális szélességének síkja és a levélnyél közötti távolság, levélnyél hossza, a levél főerének a levél szélével bezárt szöge a levélcúcson, levélfogak száma egy 3 cm-es levélszél-szakaszon, maximális levélfog magasság, levélfelület. A mérési eredményeket a klónok közötti variabilitás feltárása végett varianciaanalízisnek vetették alá, továbbá a mért változók átlagait klónonként főkomponens analízissel elemezték. A varianciaanalízis eredményei magas szignifikancia szintű klónok közötti varianciát mutattak minden egyes paraméter tekintetében. A főkomponens analízis eredményei alapján a klónok közötti változatosság kialakításában a levélnyél hossza, a levéllemez szélessége, valamint a levélfelület játsza a legnagyobb szerepet [ezen paraméterek határozták meg leginkább a első főkomponens értékét (PC1), amely 52,1%-ban járult hozzá a teljes varianciához]. A vizsgálatba vont egyedek első és második főkomponens értékét koordinátarendszerben ábrázolva úgy ítélték meg, hogy a vizsgált három faj és azok hibridjei morfológiailag összefüggő populációt alkotnak Dél-Albertában (Rood et al., 1985).

Spies és Barnes az Észak-Amerikába a 18. században betelepített európai fehér nyár és a kontinensen őshonos, a *Populus* nemzetség *Trepidae* (rezgő nyárok) alszekciójába tartozó fogaslevelű nyár (*Populus grandidentata* MICHX.), illetve azok természetes hibridjeinek morfológiai elemzését végezték el, a fajok és hibridek elkülönítését lehetővé tevő morfológiai bélyegek meghatározása, illetve az esetleges visszakereszteződés és génáramlás kimutatása céljából, Délkelet-Michigan-ben (Spies et Barnes, 1981). 41 hibrid, 5 fehér nyár és 22 fogaslevelű nyár egyeden végezték el a vizsgálatokat, amelyekbe a következő morfológiai paramétereket vonták be: levéllemez hossza, levéllemez szélessége, levélnyél hossza, levélfogak oldalankénti száma, a levélalap és a levéllemez maximális szélességének síkja közötti távolság, a vizsgált levelet hordozó rövidhajtás hossza, továbbá 0-tól 6-ig terjedő skálán osztályozták a hajtás, a rügy és a levél fonákának molyhosságát. Az elemzésbe bevonták a levéllemez szélességének és hosszának, valamint a levéllemez szélességének és a levélalap és a levéllemez maximális szélességének síkja közötti távolság hányadosát. A megfigyelt morfológiai bélyegek alapján meghatározták az egyedek hibridindex értékét, a morfológiai bélyegek átlagértékeit pedig kanonikus korrelációanalízisnek vetették alá. Bár mind a hibridindex elemzések, mind a kanonikus analízis alapján meghatározott kanonikus változók alapján a hibrid egyedek a fogaslevelű nyárhoz álltak közelebb, a kutatók a visszakereszteződés és a génáramlás lehetőségét elvetették. Az elvégzett diszkriminancia analízis alapján a rügy és a levélfonák molyhossága, a levéllemez szélessége és a levélszél fogazottsága azok a bélyegek, melyek leginkább lehetővé teszik a taxonok elkülönítését.

Természetes állományokból származó fehér nyár, rezgő nyár és szürke nyár egyedek, valamint géngyűjteményben fenntartott mesterséges F₁-es és visszakeresztezésből származó (*alba* × *tremula*) × *alba* és (*alba* × *tremula*) × *tremula* szürke nyár hibridek bevonásával végeztek levélmorfológiai és izoenzim vizsgálatokat Belgiumban Culot és munkatársai (Culot et al., 1995). Növényházban nevelt egy éves csemetékről gyűjtött hosszúhajtás leveleken mért összesen 20 levélmorfológiai jellemző bevonásával végzett diszkriminancia analízis

alapján, vizsgálataik szerint, az egyedek közötti változatosságra legnagyobb hatással az egyes levélszélesség és levélhossz paramétereknek van. A diszkriminancia analízis alapján szerkesztett diagramon a két faj egyedeinek pontfelhőjében részben átfedték egymást, a szürke nyár egyedek köztes elhelyezkedést mutattak (az F_1 -es és a visszakeresztezett hibrid egyedek jelentős eltérést nem mutattak a diagramon). A négy, illetve hét izoenzimmel végzett vizsgálatok alkalmasnak bizonyultak a fajok és a hibridek elkülönítésére. Külön érdekessége a kutatásról megjelent publikációnak, hogy a szerzők a szürke nyár hibrid voltát, mint feltevést említik, melyet vizsgálataikkal megerősítettnek tartottak (mint azt már korábban említettem, Gombocz erre a felismerésre már 1926-ban eljutott).

A nyárak nemzetsége mind morfológiailag, mint ökológiailag erősen differenciált, az egyes fajok azonosítását sokszor erősen megnehezítik a hibridizáció folytán létrejövő hibrid alakok (Bartha, 2004). Erre hívja fel a figyelmet Farmer és Barnes is, akik amerikai rezgő nyár (*Populus tremuloides* MICHX.) törzsfák mesterséges keresztezéséből származó, valamint a nőivarú egyedekről gyűjtött szabad beporzású utódok morfológiai elemzését végezték el (Farmer et Barnes, 1978). A kutatás célja elsősorban a mesterséges keresztezésből származó (7 család, 127 egyeddel), valamint a szabad beporzású utódokat magában foglaló családok (2 család, 21 egyeddel) családokon belüli és azok közötti morfológia változatosságának felmérése volt, 4 hajtás- és 7 levélmorfológiai bélyeg alapján (a család keresztezési kombinációt, illetve a szabadbeporzású utódok esetében pedig anyafát jelöl). Az elvégzett varianciaanalízis és kanonikus korrelációanalízis alapján a családok közötti változatosság jóval nagyobb volt, mint a családokon belüli (a családok közötti morfológiai változatosság legnagyobb részt a levélszél fogazottságára és a csúcsrügy molyhosságának mértékére volt visszavezethető). Az egyes egyedekre számított kanonikus változókat ábrázolva az egyes családok egymástól jól elkülöníthető csoportokat alkottak. Tekintettel arra, hogy a kutatás csupán 6 törzsfaj utódaira korlátozódott, a faj valós morfológiai változatosságát jóval nagyobbra becsülik a kutatók, valamint felvetik a morfológiai bélyegek használhatóságának korlátját a más fajokkal alkotott hibrid és visszakeresztződött egyedek azonosításában.

Az egyes nyárfajok, levélváltozatosságuk, esetenként levélplaszticitásuk révén a taxonómiai célú kutatások mellett számos egyéb kutatási területen (pl.: molekuláris genetika, növényélettan) modellnövénné váltak. Rettig és munkatársai az ültetési hálózat és a gyomosodás, mint ökológiai faktorok hatását vizsgálták a változó levélaszimmetriára, egy korai nemesítésű nemesnyár klón [*Populus × euramericana* (DODE) GUINIER cv. Eugenei] felhasználásával (Rettig et al., 1997). Egy 18 plotből álló, három ismétléses, két kezeléssel (hálózat, gyomosodás), egy tényezőző kísérletből származó levelek aszimmetria vizsgálatával megállapították, hogy az egyes kezelések szignifikáns hatással vannak a levélaszimmetria mértékére (a két fél levéllemez szélességének abszolút értékben mért különbségére). Azaz minél sűrűbb az ültetési hálózat (intraspecifikus stressz), illetve a gyomosodás mértéke (interspecifikus stressz), annál nagyobb az előforduló levélaszimmetria nagysága.

Wu és munkatársai *Populus trichocarpa* TORREY & A. GRAY és *P. deltoides* MARSCH. törzsfák keresztezéséből előállított hibrid (F_1 , F_2) és backcross (BC_1) vonalak felhasználásával vizsgálták többek között egyes levélmorfológiai bélyegek vonalak közötti varianciáját, illetve térképezték az egyes tulajdonságok kifejeződéséért felelős QTL (*Quantitative Trait Loci*) régiókat. Megállapították többek között azt, hogy a vizsgált morfológiai bélyegek (mint például a levélfelület, vagy a levéllemez szélességének és hosszának aránya) multigén szabályozás alatt állnak, valamint, hogy a koronában elfoglalt helyzettől függetlenül a levélméretre erős genetikai kontrol hat (Wu et al., 1994, 1997).

Négy *Populus nigra* L. és három *P. deltoides* MARSCH. klón portok kultúrából nevelt, különböző ploidisztű, 1-3éves egyedeinek morfológiai elemzését végezték el Kiss és munkatársai (Kiss et al., 2001). A vizsgált hat morfológiai bélyeg közül három (levéllemez hossza, levélváll alakja, a növény magassági növekedése) mutatott korrelációt a növények ploiditásával. Ugyancsak mikroszporitási eljárással kapcsolatos levélmorfológiai elemzéseket végeztek Saieed és munkatársai (Saieed et al., 1994a). *Populus trichocarpa* TORR. et GRAY $\times$ *P. balsamifera* L. klón 16 hónapon keresztül fenntartott kalluszkultúrájából felnevelt, a fenntartás utolsó hónapjában és a regenerálás során eltérő 2,4-diklorofenoxiacetilsav és benzilaminopurin kezelést kapott 15 vonal szomaklonális variabilitását értékelték a felnevelt növények növekedési, levélmorfológiai és gázcsere paramétereivel. A vizsgált levélparaméterek közül a levéllemez hosszának és szélességének aránya mutatott szignifikáns változatosságot az egyes vonalak között, amelyet egyértelműen a kezelések hatásának tulajdonítottak a szerzők, illetve ezt az arányt alkalmasnak vélték a kutatók a szomaklonális vonalak korai növekedési erélyének becslésére. A mérési adatok jellemző levél morfortípusok (szív, tojásdad, ovális, vese alakú) szerinti újracsoportosítása és újraértékelése során erőteljesebb szignifikanciát mértek a levéllemez hosszának és szélességének aránya tekintetében az egyes vonalak között, továbbá így egyes, korábban nem szignifikáns morfológiai bélyegek, mint például a hajtás magassága, vagy a nóduszok száma is szignifikánsnak bizonyultak (Saieed et al., 1994b).

10 morfológiai és fiziológiai jelleg, köztük 4 morfometriai bélyeg örökölhetőségét és változatosságát vizsgálták Kanaga és munkatársai Utah államban szelektált *Populus tremuloides* MICHX. törzsfák vegetatív utódain (Kanaga et al., 2008). 13 törzsfát vontak be a vizsgálatba, melyek közül 8 származott humid, 5 pedig száraz termőhelyről (északi, illetve déli kitettségű lejtőről). Valamennyi vizsgált jelleg esetében szignifikáns differenciát találtak az egyes vonalak között, illetve 4 jelleg mutatott szignifikáns differenciát a származási hely (kitettség) tekintetében. A legmagasabb örökölhetőséget a levélfelület esetén ($H^2=0,56$), a legalacsonyabbat a levélepidermisz UV-A sugárzás áteresztőképességének tekintetében ($H^2=0,17$) számították. A levélalak jellemzésére alkalmas levéllemez szélesség és hossz arány esetében $H^2=0,47$ -es örökölhetőséget mutattak ki. A szerzők maguk is belátják, hogy a vizsgálati mintaszám nem elegendő a *P. tremuloides* MICHX. nyugati elterjedésű populációinak genetikai és fenotípusos varianciájának jellemzésére, ugyanakkor néhány vizsgált jelleget összevetve más kutatások eredményeivel (*Populus deltoides* MARSCH., valamint *P. trichocarpa* TORR. et GRAY $\times$ *P. nigra* L. és *P. trichocarpa* TORR. et GRAY $\times$ *P. deltoides* MARSCH. F_1 -es hibridek esetében mértekkel) úgy vélik, az amerikai rezgő nyár kvantitatív genetikai változatossága jelentős.

A levéllemez szélességének és hosszának arányában hasonló mértékű örökölhetőséget mutattak ki Rae és munkatársai *Populus trichocarpa* TORR. et GRAY és *P. deltoides* MARSCH. törzsfák F_2 -es hibrid utódainak vizsgálata során (Rae et al., 2006). 285 F_2 -es utód, az F_1 -es szülők és a két törzsfák vegetatív utódainak összesen 19 morfológiai és fenológiai jellegét vizsgálták normál és megnövelt szén-dioxid tartalmú légtérben. A megnövelt szén-dioxid mennyiség nem okozott szignifikáns változást a levél szélesség és hosszúság esetében az F_2 -es növényeknél (enyhe szélesség növekedés és hossz csökkenés volt kimutatható), a levélnövekedés ugyanakkor felgyorsult. A már említett örökölhetőség a levéllemez hosszának és szélességének tekintetében $H^2=0,55$ értéket mutatott, ugyanakkor a levélfelület esetében, ellentétben az előzőekben ismertetett kutatással, alacsony, $H^2=0,15$ -ös értéket adott.

2.1.3. Alakelemzés elliptikus Fourier leírók segítségével

Az elliptikus Fourier leírók segítségével bármely biológiai alak leképezhető egy kétdimenziós zárt körvonallá (Iwata, 2006). A módszert (lánckóddal leírt kétdimenziós alakok elliptikus Fourier leíróinak meghatározását), melynek előnye, hogy a leírók függetlenek az alak helyzetétől, nagyságától és a leírás kezdőpontjától, először Kuhl és Giardina ismertette (Kuhl et al., 1982). Az eljárást azóta sikerrel alkalmazták állati (elsősorban rovar) és növényi, sőt emberi szervek alakjainak elemzésére.

Az elliptikus Fourier leírók rovar-tani kutatásokban történt alkalmazásai között találunk példát egyes rovarfajok lárváinak rágó-elemzésére [Albutra és munkatársai különböző földrajzi származású és különböző rezisztenciaszintű rizsfajtákon előforduló *Scirpophaga innotata* WALKER lárvák alsó rágóinak alakját vizsgálták (Albutra et al., 2012), míg Tabugo és munkatársai eltérő mértékben károsított kókuszdió egyedekről gyűjtött *Brontispa longissima* GESTRO lárvák rágóalakját vetették össze (Tabugo et al., 2012)], nemzők lábanatómiai [Ge és munkatársai a *Chrysomelidae* családba tartozó rovarok hátsó láb combjának evolúciós vizsgálatához használták az elliptikus Fourier leírókat (Ge et al., 2011)], vagy szárnyalak vizsgálatára [Zhan és Wang három *Myrmeleon* és két *Euoleon* fajhoz tartozó egyedek első és hátsó szárnyának alakját vizsgálták a fajok közötti variancia mértékének meghatározása céljából (Zhan et al., 2011)], illetve hím nemi szerv anatómiai elemzésére is [Liu és munkatársai, illetve Laurie és munkatársai két *Drosophila* faj hímnemű egyedeinek nemi szervében található, a fajok elkülönítésére alkalmas hátsó lebeny anatómiai alakját vizsgálták, annak változatosságának kialakításában részt vevő QTL régiók jellemzése céljából (Liu et al., 1996, Laurie et al., 1997)].

A módszer alkalmazására tengeri élőlényekkel kapcsolatos vizsgálatokban is akad példa. Márquez és munkatársai a hüvelykagylók (*Solenidae*) családjába tartozó *Ensis macha* MOLINA egyedeinek morfológiai változatosságát vizsgálta Dél-Amerika atlanti partvidékéről származó 12 populációban (Márquez et al., 2011), míg Carlo és munkatársai *Alcyonaria* rendbe tartozó 8 korallpolip faj meszes vázának alakját vizsgálták a módszer fajazonosításra való alkalmasságának megállapításához (Carlo et al., 2011).

Az elliptikus Fourier leírók alkalmazására a humán egészségügyben is található példa. Ishii és munkatársai 105 különböző korú (1 hónap és 19 éves kor közötti) páciens szemgolyó alak változását vizsgálta MRI felvételek alapján, az egészséges látásban szerepet játszó és a rövidlátás kialakulásáért felelős alaki tényezők megállapítása céljából (Ishii et al., 2011).

A különböző növényi szervek alakelemzése számos fontos információt szolgáltat a nemesítő számára. Yoshioka és munkatársai *Primula sieboldii* E. MORREN fajták virágszirom alakelemzését végezték el elliptikus Fourier leírók segítségével, a szirm alakjának kialakulásában szerepet játszó genetikai és a környezeti tényezők mértékének megállapítása céljából (Yoshioka et al., 2004), illetve *Primula sieboldii* E. MORREN fajták és vad populációk egyedeiről gyűjtött virágszirmok alakelemzése során értékelték a több száz éves múltra visszatekintő nemesítés okozta morfológiai változásokat (Yoshioka et al., 2005). Ugyancsak Yoshioka és munkatársai értékelték négy beltenyésztett vonal diallél keresztezéséből származó F_1 -es hibrid *Viola* × *wittrockiana* GAMS egyedek virágszirom alakját, az egyes vonalak általános és specifikus kombinációs képességének megállapítása céljából (Yoshioka et al., 2006). Valamint ugyancsak Yoshioka és munkatársai értékelték elliptikus Fourier leírók segítségével és azok főkomponens analízisével *Eustoma grandiflorum* (RAF.) SHINN. fajták virágszirom-alak változatosságát (Yoshioka et al., 2006).

Az elliptikus Fourier leírók alapján történő alakelemzés növénynemesítésben való alkalmazásának sikerességét számos további, zöldség-, gabona- és gyümölcsfajták vizsgálatával kapcsolatos tanulmány bizonyítja. Számos tanulmány foglalkozott a japán retek (*Raphanus sativus* L.) morfometriai vizsgálatával. Iwata és munkatársai különböző talajtípusoknak és a betakarítás időpontjának hatását vizsgálták F₁-es retek nemzedék gyökéralakjának változatosságára, elliptikus Fourier leírók főkomponens analízisének segítségével (Iwata et al., 1998), továbbá egyes, a gyökér alakjával kapcsolatos fenotípusos jellegek örökölhetőségének, illetve a szelekció optimális időpontjának meghatározásához végezték el 6 beltenyészített retek vonal diallél keresztezését, illetve a szülő vonalak és az utódok morfometriai vizsgálatát (Iwata et al., 2004a). Ugyancsak ezen diallél keresztezési kísérletből származó gyökerek morfometriai vizsgálatát végezték el Iwata és munkatársai a genetikai és környezeti (talajtípus) tényezők gyökerek alakjára gyakorolt hatásának megállapítása céljából (Iwata et al., 2004b).

Ninomiya és munkatársai közönséges hajdina (*Fagopyrum esculentum* MOENCH) és tatár hajdina [*Fagopyrum tataricum* (L.) GAERTN.] magok elliptikus Fourier leírókra és azok főkomponens analízisére alapozott morfometriai vizsgálatát végezték el az egyes fajok magjának változatosságáért felelős alaki tényezők feltárása céljából (Ninomiya et al., 1995). Oshawa és munkatársai 24 közönséges hajdina fajta magjainak elliptikus Fourier elemzését, illetve a leírók főkomponens analízisét végezték el a magvak változatosságát leíró főkomponensek értékelése és néhány agronómiai tulajdonsággal (virágzási időtartam, hozam, ezermagtömeg) való kapcsolatának feltárása céljából (Oshawa et al., 1998). Mebatsion és munkatársai különböző származási helyről (humid, szemi-arid, szub-humid és szub-boreális) gyűjtött búza, rozs, árpa és zab szemtermések morfometriai elemzését végezték el elliptikus Fourier leírókkal (különböző Fourier koefficiensek felhasználásával) és főkomponens analízissel, a magok alakját meghatározó főkomponensek meghatározása, és azok származási hellyel való regressziójának vizsgálata céljából (Mebatsion et al., 2012).

Hiraoka és Kuramoto 5 *Rhus succedanea* L. fajta három származási helyről gyűjtött gyümölcsseinek elliptikus Fourier elemzését és a leírók főkomponens analízisét végezték el, a fajták elkülönítésére alkalmas gyümölcs alaki jellemzők elemzése, végsős soron a fajtajellegek azonosítása céljából (Hiraoka et Kuramoto, 2004).

Chitwood és társai három vad paradicsom faj egyedeinek összesen több mint 11 000 levelén végeztek levélmorfometriai vizsgálatokat a levélalak változatosságára ható különböző fenológiai (fejlődési stádium, levélké elhelyezkedése az összetett levélen, heteroblasztikus sorozat jellege) és környezeti tényezők (fény/árnyék helyzet), valamint a származás hatásainak, illetve a levélalak változatosság mértékének felmérése céljából (Chitwood et al., 2012a). Ugyancsak Chitwood és munkatársai alkalmazták az elliptikus Fourier leírókat a paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.) és lúdfű [*Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.] levelek aszimmetriájának értékeléséhez, melyek a levélprimordiumokban végbemenő aszimmetrikus auxin-válasszal voltak kapcsolatba hozhatók (Chitwood et al., 2012b). *Solanum pennellii* CORREL második generációs introgressziós vonalain végeztek komplex genetikai értékelést Chitwood és munkatársai, vizsgálva többek között az összetett levélzet csúcsi és két oldalsó levelkéinek levélmorfológiai jellemzőit, azok alakjának örökölhetőségét, valamint QTL régiókkal való kapcsoltságát (Chitwood et al., 2013).

Furuta és munkatársai 39 szója (*Glycine max* L. MERR.) fajta összetett levelének összesen 375 végálló levélkéjének morfometriai elemzését végezték el elliptikus Fourier módszer segítségével, a fajták közötti levélváltozatosság vizsgálata és levélváltozatosság kialakításában részt vevő alaki jellemzők feltárása céljából (Furuta et al., 1995).

5, fajon belüli és fajok közötti hibrideket is magában *Citrus* kultivár diallél keresztezéséből és önbeporzásból származó utódain végeztek levél morfometriai vizsgálatokat Iwata és munkatársai (Iwata et al., 2002a), az egyes, elliptikus Fourier leírók főkomponens analízise során meghatározott főkomponensek, ezáltal az azokat meghatározó morfológiai jellegek örökölhetőségének meghatározása céljából.

Az elliptikus Fourier leírók levélalak elemzésben történő felhasználására a zöldség és gyümölcs fajok, illetve fajták mellett erdészeti fajokkal kapcsolatos kutatásokban is találunk példát. A magyarországi mezei szilék levélmorfológiai változatosságát mérte fel Börcsök (Börcsök, 2009), 501 egyed 5252 rövidhajtás levelét felhasználva, amelynek során metrikus mérések mellett elliptikus Fourier leírókra alapozott levélalak elemzést is végzett. Munkájában részletesen ismerteti a leírók főkomponens analízise során számított főkomponensek egyes levélalaki jellemzőkkel megfigyelt kapcsolatát, ugyanakkor megállapítja, hogy bár a főkomponensek a mezei szil (*Ulmus minor* MILL.) levélváltozatosságát jól leírják, fajon belüli taxonok elkülönítésére nem alkalmasak.

Egy elegyes tölgy állományból származó, négy fajhoz [kocsányos tölgy (*Quercus robur* L.), molyhos tölgy (*Quercus pubescens* WILLD.), pireneusi tölgy (*Quercus pyrenaica* WILLD.), kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea* (MATT.) LIEBL.), illetve azok hibrid csoportjaihoz tartozó 336 egyed részletes levélmorfometriai elemzését végezték el Viscosi és munkatársai (Viscosi et al., 2009). Az egyedek megfelelő klaszterbe történő besorolását 10 mikroszatellit markerrel végzett genetikai analízis alapján végezték el (a főfajok mellett 6 hibrid csoportot különítettek el). A levélmorfológiai vizsgálatok alkalmával három módszert vetettek össze: egy 19 levélbélyeg mérésén, illetve értékelésén alapuló morfometriai eljárást; a digitalizált levéllemez jobb oldalára helyezett azonosítópontok mérésén alapuló eljárást, valamint az elliptikus Fourier leírókat felhasználó levélalak elemzést. A három eljárás eredményeit kanonikus diszkriminancia analízisnek vetették alá. A diszkriminancia analízis alapján általánosságban elmondható, hogy mindhárom eljárás alkalmasnak bizonyult az egyes fajok egyedeinek elkülönítésére, melyet a kanonikus változó alapján szerkesztett ábrák is alátámasztottak (a fajok egyedei zömében határozott, elkülönült pontfelhőkbe tömörültek). A legnagyobb távolságot a többi fajtól a kocsányos tölgy mutatta, míg a kocsánytalan tölgy a három másik faj pontfelhőjé között helyezkedtek el. Ugyanakkor az kiemelő, hogy a kocsánytalan tölgyet a vizsgálatokban csak 6 egyed képviselte, és hogy ezen egyedek kanonikus diszkriminancia analízis során számított besorolása két morfometriai eljárás szerint is téves volt (mind a hat egyed másik faj csoportjába került), illetve az elliptikus Fourier analízis alapján végzett levélalak elemzés szerint is csak egy egyed volt a kocsánytalan tölgy csoportba sorolható. Kiegészítésként megjegyzendő, hogy az elliptikus Fourier leírókkal végzett levélalak elemzés során számított diszkriminancia analízis csupán a kocsánytalan tölgy és a molyhos tölgy csoport között nem mutatott szignifikáns differenciát.

Disszertációm témájával sok tekintetben hasonló kutatásról számoltak be Lexer és munkatársai (Lexer et al. 2009). A Duna ausztriai folyása mentén kijelölt 84 *Leuce* nyár törzsfa elliptikus Fourier leírókra alapozott levélalak elemzését végezték 527 levél értékelése által. A törzsfák taxonómiai besorolását (*Populus alba* L., *P. tremula* L., *P. × canescens* SM.) 30 (!) kodomináns mikroszatellit markerre alapozott molekuláris genetikai vizsgálattal végezték el. A digitalizált leveleken tpsDIG program segítségével pontokkal (koordinátákkal) jelölték meg levélalap és a levélcsúcs helyét, majd az így előkészített leveleken határozták meg levélalakot meghatározó elliptikus Fourier leírókat, NT-SYSpC programmal. A

vizsgálatokba mind a szimmetrikus (a és d), mind az aszimmetrikus (b és c) Fourier koefficienseket bevonták. Az elliptikus Fourier leírók főkomponens analízise során meghatározott 16 főkomponensen végeztek varianciaanalízist. A vizsgálat eredményeképpen szignifikáns egyedek közötti differenciát mutattak ki a 16 szimmetrikus főkomponens mindegyikének esetében, míg, egy kivétellel, az aszimmetrikus főkomponensek esetében nem volt ilyen kapcsolat kimutatható. Mindez az egyedek levélmorfológiai változatosságában részt vevő aszimmetrikus elemek nem öröklődő jellegét mutatja. A 16 szimmetrikus főkomponens lineáris diszkriminancia analízise során a főkomponensekhez meghatározott diszkriminancia tengely-értékeket koordináta rendszerben ábrázolva a két faj egyedei egymástól jól elkülönülő halmazokat alkottak, míg a szürke nyár egyedek a fehér nyár egyedek halmazával átfedésben jelentek meg.

2.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

Bár a nyárak fajszauma alacsony, a nemzetség ökológiai és morfológiai szempontból is erősen differenciált (Bartha, 2004). Köszönhetően többek között ezen jelentős (genetikai és morfológiai) változatosságuknak, a genom viszonylagos kis méretének, a valamennyi fajra jellemző azonos alap kromoszómaszámnak ($2n=38$), a több faj esetében megfigyelhető és mesterségesen is könnyen kivitelezhető vegetatív úton történő reprodukciónak, és a számos fajt érintő hibridizációnak, a nyárak a fás növényekkel kapcsolatos biológiai kutatások modellnövényeivé váltak (Cervera et al. in Klopfenstein et al., 1997). A biológiai kutatások természetesen kiterjedtek a genetikai diverzitást feltáró molekuláris genetikai vizsgálatokra is, melyek valamennyi jelentősebb markertechnika (izoenzim, RFLP, RAPD, SSR, AFLP, SNP) felhasználását érintették. Amint az a nagy elterjedési területtel és intenzív génáramlást biztosító szaporodási rendszerrel rendelkező fajoktól várható volt, az elvégzett genetikai vizsgálatok nagyfokú populáción belüli és alacsony populációk közötti változatosságot fedtek (DiFazio et al. in Joshi et al., 2011), és mindemellett a hosszú életű fajokhoz nagyon közelálló polimorfizmus és heterozigótia értékeket adtak (Hamrick et al., 1992 cit. DiFazio et al., 2011). De a nyárak genetikai vizsgálata nemcsak alapkutatói szempontból fontos. Számos fajuk és hibrid csoportjuk bír erdészeti és/vagy ökológiai jelentőséggel, ami szükségesé teszi a populációk akár tájegység szintű genetikai diverzitásának, illetve az egyes fajok genetikai identitásának ismeretét, mind a nemesítés, mind a természetvédelem számára.

Kutatásom elsődleges célkitűzése a fehér nyár és rezgő nyár dunántúli populációinak genetikai változatosságának felmérése volt. A genetikai változatosságot mind a nyárak esetében anyai úton öröklődő kloroplaszt genom, mind a sejtmagi DNS szintjén vizsgálni kívántam. A sejtmagi DNS vizsgálatához egy olcsó, könnyen kivitelezhető markerezési technikát (RAPD), valamint egy nagy felbontóképességű, kodomináns markerekre alapozott technikát (SSR) választottam, elsősorban az Erdészeti Tudományos Intézet Sárvári Genetikai Laboratóriumánk felszereltségéhez igazodva. A kiválasztást indokolta továbbá, hogy a laboratórium munkatársai mindkét eljárás alkalmazásában többéves gyakorlattal rendelkeztek. A kloroplaszt DNS vizsgálatára kiválasztott PCR-RFLP technika alkalmazását indokolta, hogy azt sikeresen alkalmazták *Leuce* nyárak filogenetikai vizsgálatában. Ezen markerezési technika elsajátításában Dr. Berthold Heinze (Bundesforschungszentrum für Wald, Institut für Waldgenetik, Bécs) nyújtott segítséget.

A továbbiakban a nyárakon végzett molekuláris genetikai vizsgálatok bemutatását a nemzetségbe tartozó fajokon sikeresen alkalmazott fontosabb markerezési technikák alapján ismertetem, nagyobb hangsúlyt fektetve az általam is alkalmazott módszerekre.

2.2.1. Korai genetikai és fenológiai vizsgálatok *Leuce* nyárákon, Magyarországon

A *Leuce* szekcióba tartozó hazai nyárok (fehér nyár, rezgő nyár, szürke nyár) taxonómiai és részben populációgenetikai vizsgálatával kapcsolatban Magyarországon Bartha Dénes végzett jelentős kutatásokat. 21 természetes eredetű fehér nyár populáció generatív utódaiból létesített származásvizsgálatból 5 populáció utódait vonta be izoenzimvizsgálatba (Bartha et Bordács, 1990). A populációnként 10-10 egyeden elvégzett észteráz és peroxidáz enzim vizsgálatok során enzimenként 7-7 genotípusmintázatot mutatott ki, melyek 3 lókuszt alléljaihoz voltak köthetőek. Az egyes enzimek vizsgálatával kimutatott átlagos heterozigótia (0,3135 a peroxidáz enzim, 0,4043 az észteráz enzim esetében) más fajokkal történő összevetésben is magasnak számít (Bartha 1991a). Az allélgyakoriságok alapján számított genetikai távolság és az anyapopulációk földrajzi távolsága között szoros korreláció nem volt kimutatható. Bartha behatóan vizsgálta a két alapfaj hibridizációját és az introgresszió irányát megszabó ökológiai feltételeket. Homoki és ártéri termőhelyeken álló populációk virágzásviszonyainak vizsgálata során megállapította, hogy a gyorsabban felmelegedő homoki termőhelyeken álló állományokban a virágzás mindkét faj esetében 4-10 nappal korábban kezdődik, általában rövidebb időtartamú, valamint, hogy a két faj virágzási idejének átfedése jóval nagyobb a hűvösebb ártéri termőhelyekhez képest (Bartha, 1999). Megállapítása szerint a hibridizáció során az *Populus alba* L. × *P. tremula* L. keresztezési kombináció létrejöttének esélye magasabb, mint a reciprok kombinációé. A természetben az F₁-es hibridnemzedékre jellemző morfológiai bélyegeket hordozó szürke nyár egyedek csak ritkán fordulnak elő, a szülőfajokkal történő visszakereszteződések folytán elsősorban a fehér nyár felé intergradálódó egyedek jelenléte jellemzőbb, melyek nem alkotnak különálló populációkat. A fehér nyártól a rezgő nyárig terjedő szürke nyár alakkörben a dendrológiai gyakorlat két típust különít el: a zöldessárga bibéjű fehér nyár jellegű, és a piros bibéjű rezgő nyár jellegű szürke nyárat (Bartha, 2004).

2.2.2. Markerezési technikák a nyárok molekuláris genetikai vizsgálatában

2.2.2.1. Izoenzim vizsgálatok

Az 1970-es években megjelenő izoenzim alapú markerezési technikák áttörést jelentettek a fajok populációgenetikai kutatásában (Glaubitz et Moran in Young et al., 2000). Az izoenzimek egy azon enzim különböző molekuláris formáit jelentik, azaz egy azon enzim reakció katalizálásáért felelős, de különböző összetételű, különböző struktúrájú által kódolt enzimeket (H. Nagy in Hajós-Novák, 1999). A markerezési technika lényege, hogy a meghatározott növényi szövetekből származó extraktumot papír szűrőre abszorbeálják, majd a vizsgálatnak megfelelő számúra szeletelt papírt (általában) keményítő alapú gélre helyezik. A gél után elektroforézisnek vetik alá, mely során az egyes enzim alegységek méretük vagy alakjuk és töltésük alapján elválasztódnak egymástól. A gél ezt követően biokémiai úton festik, melynek eredményeképpen az elektroforetikus elválasztott enzim alegységek láthatóvá válnak. A keletkezett sávmintázat genetikailag értelmezhető, az egyes sávok lokuszokhoz köthetőek (Glaubitz et Moran in Young et al., 2000). A módszer előnye az olcsó és egyszerű kivitelezhetőség, valamint, hogy – tekintettel a kodomináns öröklődésre – segítségével a homozigóta és heterozigóta lokuszok, valamint a többszörös allélek is felfedezhetőek (Cervera et al. in Klopfenstein et al., 1997).

Rajora és Dancik összesen 56 fehér, rezgő és szürke nyár genotípus genetikai azonosítását végezték el izoenzim markerekkel (Rajora et Dancik, 1992). A vizsgálatokhoz 15 enzimet használtak fel, amelyek összesen 30 lokuszon kódoltak; az elektroforetikus mintázatok

összesen 71 allélt mutattak ki a felhasznált enzimek esetében. A vizsgált 23 fehér nyárból 21, míg valamennyi rezgő nyár (18 db) és valamennyi szürke nyár (15 db) egyedi genotípus mintázatot mutatott, ami jól mutatja a módszer felbontóképességét. A meghatározott 18 polimorf lokusz genotípus kódjai alapján végzett kanonikus diszkriminancia analízis határozott elkülönülést mutatott mindhárom csoport esetében. A kutatók kisebb genetikai távolságot mutattak ki a szürke nyár és a fehér nyár között (Nei-féle genetikai távolság = 0,006), mint a szürke nyár és rezgő nyár viszonylatban ($D = 0,068$). A meghatározott izoenzim genotípusok, az allélfrekvencia értékek és a genetikai távolság adatok alapján a szerzők úgy vélik, hogy a vizsgálatokba bevont szürke nyár egyedek F_1 -es hibridek, vagy a fehér nyárral visszakereszteződött egyedek voltak. A szürke nyárak hibrid voltát, mint feltevést említik, melyet a vizsgálataikkal megerősítettnek tartottak.

Egyes nyárfajok közötti introgresszió vizsgálata nemcsak taxonómiai, hanem természetvédelmi szempontból is nagy jelentőséggel bír. Az európai fekete nyárat (*Populus nigra* L.) a hibrid, elsősorban euramerikai nyárak [*P. × euramericana* (DODE) GUINIER] oldaláról veszélyeztető génintrogresszió sok esetben olyan mértékű, hogy a hibrid nyárak környezetében álló fekete nyárak szabad beporzású utódai között az introgresszált egyedek aránya magasabb (Borovics et al., 1999). Ezt a megfigyelést támasztotta alá Vanden Broeck és munkatársainak izoenzim, STS és SSR markerekre alapozott vizsgálata is (Vander Broeck et al., 2004). Három izoenzim (foszfoglükóz izomeráz – PGI, foszfoglükomutáz – PGM, leucin amilopeptidáz – LAP), egy STS (*Sequence Tagged Site*, win3) és egy mikroszatellit (WPMS09) marker felhasználásával végzett elemzések során egy, euramerikai nyárak közvetlen közelében álló idős fekete nyár egyedről gyűjtött 34 szabadbeporzású utód közül 32-ben mutattak ki *P. deltoides* MARSCH. specifikus allélt (a legközelebbi fekete nyár hímivarú egyed 25 km-re helyezkedett el az anyafától). A nőivarú egyedtől 50 m-es távolságban álló három ivarérett hímivarú jegenyenyár (*Populus nigra* L. cv. *Italica*) egyben nem bizonyult pollenadó szülőnek (a Meuse-folyó mentén gyűjtött természetes eredetű fiatal egyedekkel együtt vizsgált összesen 63 genotípus közül 62 nem tartalmazott 'Italica' allélt, 5 SSR marker felhasználásával végzett vizsgálatok alapján). Ugyanakkor korábbi kutatásokkal egybehangzóan a szerzők úgy vélik, hogy a hibrid nyárak csak abban az esetben bizonyulnak sikeres pollenadónak, ha a beporzás idejében *P. nigra* pollen csak igen kis mennyiségben található a levegőben.

Két dunamenti *Populus nigra* L. populáció, valamint egy *P. nigra* L. géngyűjtemény genetikai diverzitását, illetve introgresszálságát vizsgálták Bordács és munkatársai izoenzim és PCR-RFLP markerekkel (Bordács et al., 2002). Fadd és Kölked községhatárban idős fekete nyárakról, valamint önvetényülésből származó csemetékről gyűjtöttek mintákat. A 10 izoenzim markerrel végzett elemzés során alacsony populációk közötti differenciáltságot állapítottak meg ($F_{ST}=0,0265$) a vizsgált állományok, illetve a géngyűjtemény viszonylatában. A faddi utódpopulációban hibrid, azaz *P. deltoides* MARSCH. specifikus alléleket hordozó egyedeket nem azonosítottak, de a 27 egyed közül 2 tartalmazott olyan izoenzim allélt, amely az idős állomány egyedeiben nem volt jelen (a legközelebbi ivarérett fekete nyár egyed, illetve nemesnyár állomány mintegy 1 km-es távolságra volt a csoporttól). A nemesnyár állományok közelében elhelyezkedő kölkedi utódpopulációban 23 egyed közül 5 bizonyult F_1 -es és egy F_2 -es hibridnek, míg a 44 egyedet számláló fekete nyár géngyűjteményben 2 egyed mutatott introgresszálságot.

2.2.2.2. RFLP és PCR-RFLP

Az RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) a legkorábbi markerezési technikák egyike. Lényege, hogy a friss osztódó szövetből izolált DNS-t restrikciós endonukleáz enzimekkel hasítják, melyek a DNS meghatározott nukleotid mintázatára specifikusak (csak azok mentén hasítanak). Az emésztésen átesett DNS szekvenciákat gélelektroforézissel választják el egymástól, majd denaturálás és depurinálást követően egy speciális membránra viszik át (blottolják), végül egyfonalas DNS próbával történő hibridizációt követően általában autoradiográffal teszik láthatóvá (Hajósne Novák, 1999). A módszer előnye, hogy az RFLP-k kodomináns öröklődésűek, a genomban nagy számban és egyenletes eloszlásban találhatók meg, valamint, hogy függetlenek a génexpressziótól (a genom nem kódoló régiókban is fellelhetők). Ugyanakkor hátránya, hogy a teljes műveletsor jelentős idő-, munka- és költségigényel bír.

Utah államban vizsgáltak Keim és munkatársai *Populus fremontii* S. WATSON és *P. angustifolia* JAMES egyedeket a Weber-folyó menti ártéri társulásokban, a két faj elterjedési területének átfedési zónájában talált hibrid egyedek bevonásával, RFLP technikával (Keim et al., 1989). A két rekombináns DNS klónból származó radioaktív úton jelölt próbák és összesen öt restrikciós endonukleáz felhasználásával végzett RFLP analízis során a megfigyelt fajokon belüli változatossághoz képest nagyfokú fajok közötti változatosságot fedtek fel. A kutatás érdekessége, hogy a vizsgált hibrid egyedek között sem F₂-es, sem a *Populus fremontii* S. WATSON fajjal visszakereszteződött egyedeket nem találtak, ami a két faj közötti egyirányú introgresszióra utal.

Ugyancsak az említett folyó menti *Populus fremontii* S. WATSON és *P. angustifolia* JAMES, valamint hibrid egyedek bevonásával vizsgálták a fajok közötti introgresszió mértékét Martinsen és munkatársai (Martinsen et al., 2001). Az 550 egyed 33 sejtmagi és két organellum (1-1 kloroplaszt és mitokondrium) RFLP-jének vizsgálata során 26 olyan sejtmagi RFLP-t találtak, melyek csak a hibrid zónában voltak kimutathatók, a *P. angustifolia* JAMES populációkban nem, és csupán két nukleáris markert, melyek valamennyi vizsgált populációban jelen voltak. Az organellum eredetű RFLP-k magasabb szintű introgressziót mutattak a *P. angustifolia* JAMES irányában mint a sejtmagiak. A kutatók az egyes *fremontii* eredetű RFLP-k introgressziójának eltérő mértékét azok fitnessre gyakorolt hatásbeli különbségével magyarázzák. Külön érdekessége a kutatásnak, hogy a vizsgálatok során bebizonyították, hogy a korábban külön fajként leírt *P. × acuminata* RYDB. valójában a *P. fremontii* S. WATSON és *P. angustifolia* JAMES F₁-es hibrid alakja. Utóbbi megállapításuk ugyanakkor tévesnek bizonyult, ugyanis az *acuminata*-át a botanikusok napjainkban már a *P. angustifolia* JAMES és a *P. deltoides* MARSCH. hibridjeként tartják számon [Slavov et Zhelev, 2010 in Jansson et al. (ed.), 2010].

16 restrikciós endonukleáz és két, mitokondriális DNS specifikus próbával (Atp6, CoxI) végzett RFLP vizsgálat meglepő eredményeiről számoltak be Barrett és munkatársai (Barrett et al., 1993). Az összesen 55 *Populus deltoides* MARSCH., *P. nigra* L., *P. × euramericana* (DODE) GUINIER, *P. maximowiczii* HENRY és *P. tremuloides* MICHX. egyedek bevonásával végzett vizsgálat során az Atp6 próba nem mutatott fajokon belüli varianciát, míg a CoxI próba is csak a *P. deltoides* MARSCH. esetében bizonyult informatívnak. Utóbbi esetben sikerült különbséget kimutatni a kutatóknak a *P. deltoides* MARSCH. var. *deltoides* és var. *occidentalis* egyedek között. A fajok közötti változatosság kimutatására is csak a CoxI próbával végzett hibridizáció bizonyult alkalmasnak, összesen 6 endonukleáz esetében. A keletkezett 48 fragment közül 19 mutatott polimorfizmust a fajok között, és csupán hét bizonyult kellően informatívnak a filogenetikai vizsgálatokhoz. Az mtDNS elemzése során számított Nei és Li-

féle nukleotid csere (Nei et Li, 1979) értékek és azok alapján szerkesztett dendrogram szerint a *P. deltoides* MARSCH. és a *P. maximowiczii* HENRY, valamint a *P. nigra* L. és *P. tremuloides* MICHX. genetikai távolsága kisebb, mint a *P. deltoides* MARSCH. és a *P. nigra* L. között számított genetikai távolság. Továbbá a *P. deltoides* MARSCH. és a hibrid *P. × euramericana* (DODE) GUINIER egyedek között nem volt restriktív polimorfizmus kimutatható, amely az organellum anyai öröklődésével magyarázható. A szerzők szerint a *P. deltoides* MARSCH. közelebb áll a balzsamos nyárak szekciójába tartozó *P. maximowiczii* HENRY-hez, mint a saját szekciójába tartozó európai fekete nyárhoz, ami véleményem szerint nem tekinthető megalapozottnak, hiszen a kijelentés kisszámú egyed csekély polimorfizmust mutató markerekkel végzett vizsgálatán alapul.

Az RFLP technika ötvözhető PCR (*Polimerase Chain Reaction*) alapú DNS amplifikációval, mely során a PCR amplifikátumokat emésztik restriktív endonukleázokkal (Noh et Lee, 1997). A genomból a PCR primerek segítségével szelektált és felszaporított, majd hasított DNS szakaszok agaróz gélelektroforézissel választhatók el egymástól. Amennyiben adott szekvenciára tervezett primereket használunk a PCR reakció során, a vizsgálat reprodukálhatósága jelentősen megnő a random primerekkel végzett vizsgálatokhoz képest. A PCR-RFLP módszert sikerrel alkalmazták számos faj, többek között nyárak kloroplaszt DNS-ének vizsgálatában. Az átlagosan 120-180 kb hosszúságú és 100-120 gént tartalmazó cpDNS, bár biparentális öröklődésére is akad példa, a legtöbb faj esetében egyszülős öröklődésű (a zárvatermőknél általában anyai, a nyitvatermőknél apai úton öröklődik) (Murray et al., 2000).

Noh és Lee három kloroplaszt-DNS régió különböző nyár fajok (*Populus davidiana* DODE, *P. glandulosa* (UYEKI) UYEKI, *P. nigra* L., *P. alba* L., *P. maximowiczii* HENRY) és hibridek [*P. alba* × *P. glandulosa*, *P. nigra* × *P. maximowiczii*, *P. koreana* × *P. nigra*] közötti változatosságát vizsgálták PCR-RFLP módszerrel (Noh et Lee in Klopfenstein et al., 1997). Két cpDNS régió (16S-23S rDNS spacer és a *rpoC1C1* régió) esetében a PCR reakciót követő, több enzim felhasználásával végzett emésztés nem adott fragmenthossz polimorfizmust az egyes fajok és hibridek között. Az *rpl2* és *psbA* gének közötti spacer régió esetében a *Hinfl* enzimmel történt emésztést követően két faj [*Populus davidiana* DODE, *P. glandulosa* (UYEKI) UYEKI] mutatott a többtől eltérő szekvencia mintázatot, ami lehetővé tette ezen fajok elkülönítését.

Európai géngyűjteményekből származó összesen 637 *Populus nigra* L. egyed 5 primerpárra alapozott PCR-RFLP vizsgálatát végezték el Cottrell és munkatársai a fekete nyár európai glaciális refúgiumainak és a lehetséges posztglaciális migrációs útjainak feltérképezése céljából (Cottrell et al., 2005). A 9 országból származó növényminták elemzése során összesen 83 fekete nyár haplotípust mutattak ki a kutatók, melyek közül 50 bizonyult egyedinek, azaz csak egy-egy egyedben volt kimutatható, illetve csak 11 olyan haplotípust mutattak ki, amelyek egynél több ország mintáiban voltak jelen. Az egyedi haplotípusok számát tekintve a spanyolországi régió volt a leggazdagabb, ahol a kimutatott 45 haplotípus közül összesen 38 volt csak erre a régióra jellemző. A kutatók három korábbi refúgium létezését tartják valószínűnek, a Pireneusi-félsziget, az Appennini-félsziget, valamint a Balkán-félsziget területén. Az első kettő esetében a posztglaciális migrációt a Pireneusok és az Alpok nehezítették (ezt mutatja például, hogy a spanyol mintákban kimutatott 45 haplotípus közül csak 7 jelent meg hegységtől északra gyűjtött mintákban), a balkáni refúgiumból viszont az Alpokat északról kerülve könnyen rekolonizálta a nyugat-európai síkvidéki területeket a fekete nyár. Ezt támasztja alá a nyugati és keleti eredetű

haplotípusok együttes előfordulása a Benelux államok, illetve Nagy-Britannia területén. A géngyűjteményekben megőrzött egyedek felhasználása praktikusnak tűnik, ugyanakkor a területi lefedettség növelése érdekében vizsgálatba bevonhattak volna újabb terepi gyűjtésből származó egyedeket is a kutatók, ugyanis számos terület, mint például Észak-Franciaország vagy Németország kevésbé volt reprezentált a kutatásban. Ugyancsak érdemes lett volna néhány közép-európai ország (délszláv államok, Románia) mintáival kiegészíteni a kutatást, hiszen nélkülük a feltételezett balkáni refúgium vizsgálata kimaradt a munkából.

Észak-, közép- és dél-olaszországi rezgő nyár populációk genetikai változatosságát vizsgálták Salvini és munkatársai, a kloroplaszt DNS PCR-RFLP és SSR mintázata alapján (Salvini et al., 2001). Az öt primerpárral felszaporított, öt nem kódoló plasztisz régiót érintő DNS szakaszok 3-5 endonukleázzal végzett emésztését követő fragmentanalízis három lókuszt esetében mutatott polimorfizmust (PCR-RFLP). Az öt primerpár segítségével felszaporított öt SSR régió közül pedig kettő bizonyult polimorfnak. Mindkét markertechnika esetében hat haplotípust határoztak meg a kutatók, és mindkét vizsgálat alapján alacsony populációk közötti diverzitást számoltak [$G_{ST}=0,22$ (PCR-RFLP) és $G_{ST}=0,07$ (SSR)], melyet a rezgő nyár szaporodás technikájával (magterjesztés) magyaráztak. Munkájukkal nem látták megalapozottnak a vizsgált populációk lehetséges refugiális voltát.

Fussi és munkatársai 26, elsősorban közép- és dél-európai fehér és rezgő nyár populáció összesen 414 egyedét vizsgálták cpDNS specifikus primerekkel alapuló PCR-RFLP markerezéssel, a két faj posztglaciális rekolonizációjának feltárása céljából (Fussi et al., 2010). A hat primerpár és összesen öt restriktív endonukleáz bevonásával végzett PCR-RFLP vizsgálat során összesen 57 haplotípust határoztak meg. A meghatározott haplotípusok frekvenciája, kapcsolata, földrajzi elhelyezkedése, valamint a haploid géndiverzitás alapján úgy vélik, hogy a vizsgált régióban a fehér nyár az utolsó glaciális maximumot (LGM) követően két (olaszországi és délkelet-európai központú) refúgiumból kiindulva rekolonizálta a térséget, a nagyobb folyók, elsősorban a Duna mentén. A rezgő nyár esetében azt valószínűsítik, hogy nem léteztek határozott refugiális központok, a faj a jéghatár menti több kisebb, egymással kapcsolatban álló refugiális területekről kiindulva terjedt el a Közép-Európában.

2.2.2.3. RAPD

A RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) olyan PCR alapú markerezési technika, amely a DNS szekvenciák felszaporításához ismert szekvenciájú, de véletlen nukleotidokból álló (tehát nem egy adott DNS szekvenciára tervezett) 10 nukleotid hosszúságú primert vagy primerpárt használ (Hajósné Novák, 1999). A PCR reakciót követően az amplifikátumok agaróz gélelektroforézissel választhatók el egymástól, és különböző festési eljárásokkal (etídium-bromid, GelRed) tehetők láthatóvá. A keletkezett sávmintázat közvetlenül alkalmas elemzésre. A módszer előnye a gyors és olcsó kivitelezhetőség, hátránya, hogy a módszer érzékeny a templát DNS minőségére, valamint a reakciókörülményekre, illetve, hogy domináns öröklődésük révén a RAPD-ok általában nem alkalmasak a heterozigóta genotípusok kimutatására. A RAPD technikát ettől függetlenül széles körben alkalmazták nyárak populációgenetikai és genotípusos azonosítási vizsgálataiban.

A himalájai elterjedésű *Populus ciliata* ROYLE genetikai változatosságát vizsgálták RAPD analízissel Rajagopal és munkatársai Indiában (Rajagopal et al., 2000). A vizsgálatokat 25 egyeden 18 primer bevonásával végezték. A kiválasztott primerek közül 17, az amplifikált 156 DNS szekvencia közül 111 mutatott polimorfizmust. Konkrét értékek ismertetése nélkül

magasfokú diverzitásról számoltak be a kutatók, megállapítva, hogy a Jaccard koefficiens alapján szerkesztett dendrogram és a Jaccard-féle hasonlósági mártix alapján számított főkoordináták a földrajzilag egymáshoz közelálló, illetve a hasonló ökológiai feltételek között tenyésztett egyedek kisebb genetikai távolságát jelezték.

RAPD és SSR markerek fajtaazonosításra való alkalmasságát bizonyította Rajora és Rahman 17 euramerikai nyár kultivár bevonásával végzett vizsgálatukon (Rajora et Rahman, 2003). A 248 lokuszt reprezentáló 29 RAPD primer közül az OPA07 és OPB15 primerek bizonyultak a leginformatívabbnak, mindkettő esetében 15 fajtaspecifikus allélt mutattak ki a kutatók. Az 'Ostia' és 'Canada Blanc' fajták kivételével ezen két primer felhasználásával végzett RAPD analízis olyan egyedi allélikus mintázatokat eredményezett, melyek alkalmasak voltak a fajták azonosítására. A vizsgált 17 euramerikai nyár hibrid megfigyelt genetikai változatossága alapján a szerzők azt az erdészeti szempontokat nélkülöző következtetést vonták le, mely szerint ezen fajták klónkeverékéből létesülő ültetvényekben nem kell tartani a genetikai diverzitás csökkenéstől. Általánosan elfogadott álláspont ugyanis, hogy nemesnyár fajtákat, elsősorban az egyes fajták között fennálló növekedésbeli különbségük folytán monoklón jelleggel célszerű telepíteni.

Ugyancsak fajták elkülönítéséhez teszteltek RAPD primereket Lin és munkatársai (Lin et al., 1997). Az 55, többek között euramerikai és interamerikai (*Populus × interamericana* BROCKH.) klónokat is tartalmazó nyár genotípus 17 RAPD markerrel végzett vizsgálata során 4 marker (Chl-1, Deca-2, Deca-7, Deca-10) elegendőnek bizonyult egyedi allélmintázat kimutatására, ezáltal a klónok elkülönítésére.

Sanchez és munkatársai különböző nyár fajok azonosításához teszteltek RAPD primereket (Sanchez et al., 1998). 4 faj (*Populus nigra* L., *P. deltoides* MARSCH., *P. alba* L., *P. trichocarpa* TORR. et GRAY), valamint a szürke nyár összesen 24 egyedét, illetve egy *Leuce* nyár hibridet (*Populus tremula* L. × *P. alba* L. 'Bolleana' cv. Platero) magában foglaló mintasoron 25 RAPD primer (OPN és OPA sorozatok) vizsgálatát végezték el, melyek közül 8-at választottak ki a további elemzésekhez. A kiválasztott 8 primer közül a gélelektroforézist követően egy mutatott polimorf sávozottságot, és bizonyult alkalmasnak az egyes fajok elkülönítésére. A többi nyár fajoktól eltérően, a *Leuce* nyárak esetében a hibrid egyedek (szürke nyár, 'Platero' hibrid) sávmintázata megegyezett valamelyik szülő mintázatával, azaz a kiválasztott primerrel (OPN06) a hibrid egyedek nem voltak elkülöníthetőek a szülő fajoktól. Ezt a vizsgálati eredményt a kutatók több lehetséges indokkal magyarázták, úgy mint a RAPD markerek domináns jellegével, azzal, hogy a vizsgálatba bevont hibrid egyedek esetleg nem F₁-es hibridek voltak, hanem már valamelyik szülőfajjal visszakereszteződtek, illetve hogy a fajmeghatározás során egyes egyedeket tévesen ítélték hibridnek. A rezgő nyár esetében a kutatók nem azonosítottak olyan egyedi alléleket, melyek kizárólag e fajra lettek volna jellemzőek; azok az allélek ugyanis, melyek valamennyi rezgő nyár egyedben megfigyelhetők voltak, néhány fehér nyár klónban is megjelentek. Az OPN06 primer, valamint ez által egyéb primerek megbízhatóságát a kutatók az alapján ítélték bizonyítottanak, hogy az egyes fajok különböző földrajzi származású egyedeinek RAPD mintázata rendelkezett közös motívumokkal. A kutatás pozitív eredménye, hogy sikerült informatív primert kimutatni a vizsgált 25 közül, ugyanakkor én elhamarkodottnak látom az egy primerrel végzett vizsgálatok alapján a hibrid egyedek esetében tett megállapításokat; a *Leuce* hibridek azonosítását, jellemzését mindenképpen több genetikai markerre kell alapozni.

Ugyancsak Sanchez és munkatársai vizsgálták közép- és észak-spanyolországi származású rezgő nyár állományok genetikai változatosságát RAPD markerekkel (Sanchez et

al., 2000). Három nagyobb régió nyolc tartományában összesen 89 idős rezgő nyár egyed gyökérsarjairól gyűjtöttek leveleket a genetikai vizsgálatokhoz. A PCR reakciók során összesen 26 RAPD primert (Operon sorozat) teszteltek, melyek közül négy mutatott megfelelő polimorfizmust (OPA01, OPA02, OPA10, OPP03). A négy primerrel végzett RAPD vizsgálatok alkalmával nagy számú egyed esetében figyeltek meg azonosságot azok genetikai mintázatában; vizsgálataik szerint a mintázott egyedek 36 %-a volt sarjeredetű, és csupán 64 %-uk rendelkezett egyedi allélmintázattal. A vizsgált régiók közül a Pireneusokhoz közel fekvő, észak-kelet-spanyolországi Huesca tartomány rezgő nyár populációja mutatta a legnagyobb változatosságot (a megfigyelt különböző allélmintázatok közül ebben a tartományban volt a legtöbb megtalálható).

Az Appennini-félsziget öt nagyobb folyója mentén kijelölt fehér nyár törzsfák szabad beporzású utódainak genetikai diverzitását vizsgálták Sabatti és munkatársai RAPD markerekkel, az egyes származások földrajzi változatosságának felmérése céljából (Sabatti et al., 2001). A vizsgálatokba 10 törzsfá 51 utódát, valamint két referencia klónt (köztük a *Populus alba* L. cv. Villafranca fajtát) vonták be; elektroforetikus mintázatuk alapján 15 RAPD primert választottak ki az elemzéshez. A vizsgát 71 RAPD szekvencia közül 57 mutatott polimorfizmust az egyedek között. A kimutatható polimorf fragmentek számát tekintve a Sinni folyó (47) mellől származó családok bizonyultak a legdiverzebbnek, míg az Arno folyó melletti (30 fragment) a legkevésbé változatosnak. Az egyes származások genetikai kapcsolatának elemzéséhez a Jaccard-féle hasonlósági indexet használták. Az index értékek alapján szerkesztett dendrogramon jól elkülönültek a különböző földrajzi térségekből (Észak-Olaszország, Appenninek, Dél-Olaszország) származó egyedek.

2.2.2.4. SSR

A mikroszatellit vagy SSR (*Single Sequence Repeat*) DNS az eukarióta genom nem kódoló régióiban nagy kópiaszámban jelenlévő, egyenletes eloszlást és nagy polimorfizmust mutató, 2-5 bázispárból álló, átlagosan 20-40 bp hosszúságú ismétlődés (Hajósne Novák, 1999). A mikroszatellit határszekvenciákra tervezett primerekkel a DNS szakaszok könnyen amplifikálhatók, elválasztásuk történhet agaróz és poliakrilamid gélen, illetve tekintettel a vizsgálati módszer automatizálhatóságára, hagyományos elektroforetikus készülékek mellett szekvenálóban is (Bisztray in Velich, 2001). Annak köszönhetően, hogy a mikroszatellit szekvenciák jellemzően a DNS legnagyobb diverzitást mutató régiói, az SSR alapú markerezési technikák jól alkalmazhatóak egyedazonosítás mellett rokonsági/leszármazási vizsgálatokban is (Bordács in Mátyás, 2002). A nyárok esetében meghatározott több mint 4100 SSR régiót sikerrel alkalmazták QTL (*Quantitative Trait Loci*) régiók térképezésében és vizsgálatában, populációgenetikai kutatásokban, továbbá egyes fajok térbeli genetikai mintázatának, genetikai diverzitásának és introgresszójának vizsgálatában (Drost et al. in Joshi et al., 2011).

Van der Schoot és munkatársai *Populus nigra* L. mikroszatellit lokuszokat klónoztak és szekvenáltak, majd az azonosított dinukleotid ismétlődésekre primereket terveztek STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*) vizsgálatához (van der Schoot et al., 2000). 9 primert 23 fekete nyár klón felhasználásával teszteltek, mely során az amplifikált szekvenciák magasfokú polimorfizmust mutattak a klónok között.

Magasfokú diverzitást mutatott ki a Drôme-folyó mentén mintázott *Populus nigra* L. populációk között Imbert és Lefèvre 6 SSR marker felhasználásával (Imbert et Lefèvre, 2003). Vizsgálataik a folyó alpesi szakaszán magasabb génáramlást feltételeznek, ami a folyódinamika folytán rendelkezésre álló nagyobb kiterjedésű élőhelyeknek köszönhető.

Kutatásuk egyik érdekessége, hogy a vizsgált 652 magonc között nem találtak nemesnyárak által introgresszált egyedet, ami egybecseng Vanden Broeck és munkatársai által tett megállapítással, mely szerint az introgresszióhoz magas hibrid eredetű és igen alacsony nigma eredetű pollenszintre van szükség (Vanden Broeck et al., 2004).

Három szekcióba (*Aigeiros*, *Leuce*, *Tacamahaca*) tartozó 6 faj (*Populus deltoides* MARSCH., *P. nigra* L., *P. grandidentata* MICHX., *P. balsamifera* L., *P. maximowiczii* HENRY, *P. trichocarpa* TORR. et GRAY) összesen 96 klónjának allélmintázatát vizsgálta Rahman és Rajora 10 SSR primer alkalmazásával (Rahman et Rajora, 2002). Valamennyi kiválasztott primer polimorf allélmintázatot adott legalább egy faj esetében. A Jaccard-index alapján szerkesztett dendrogram, bár a fajoknak megfelelő klasztereket képzett, kisebb genetikai távolságot mutatott a *P. grandidentata* MICHX. és a *P. balsamifera* L. csoport között, mint az egy szekcióba tartozó *P. balsamifera* L. és *P. maximowiczii* HENRY között. Ugyancsak érdekesség, hogy három *P. balsamifera* L. klónt a *P. trichocarpa* TORR. et GRAY klasztrebe sorolt, ami klónkeveredésre utalhat. Barrett és munkatársaival ellentétben (Barrett et al., 1993) a kutatók nem találtak allélmintázatbeli különbséget *P. deltoides* MARSCH. var. *deltoides* és *P. deltoides* MARSCH. var. *occidentalis* klónok között.

Magas várt heterozigóciát ($H_e=0,603$) és más rezgő nyár fajokkal (*Populus tremula* L., *P. tremuloides* MICHX.) összevetve magas populációk közötti genetikai diverzitást ($R_{ST}=0,213$) mértek Lee és munkatársai öt dél-koreai *Populus davidiana* DODE [*Populus tremula* var. *davidiana* (Dode) C. K. SCHNEID.] populáció 5 SSR markerrel végzett vizsálata során (Lee et al., 2011). Utóbbi értéket a faj elterjedési területének marginális zónájában található elszigetelt populációk között fellépett genetikai drifftel magyarázták.

Négy mikroszatellit lokuszt azonosítottak saját készítésű részleges *Populus tremuloides* génkönyvtár elemzésével Dayanandan és munkatársai (Dayanandan et al., 1998). A két-két di- és trinukleotid SSR lokuszra tervezett primerekkel 36 *P. tremuloides* egyed elemzése során 34 egyedi allélmintázatot mutattak ki. A primereket egyéb nyár fajokon is tesztelték [*P. deltoides* MARSCH., *P. nigra* L., *P. maximowiczii* HENRY, *P. × euramericana* (DODE) GUINIER], mely során a PTR2 mind a négy, míg a PTR4 lokusz három faj [*P. nigra* L., *P. maximowiczii* HENRY, *P. × euramericana* (DODE) GUINIER] esetében mutatott amplifikációt. Utóbbi alapján a szerzők megerősítettnek vélik Barrett és munkatársai (Barrett et al., 1993) által tett megállapítást, mely szerint a *P. nigra* L. és *P. maximowiczii* HENRY genetikailag közelebb áll a *P. tremuloides* MICHX.-hez, mint a *P. deltoides* MARSCH.

Finnországi rezgő nyár állományok térbeli genetikai struktúrájának vizsgálatához alkalmazott SSR markereket Suvanto és Latva-Karjanmaa (Suvanto et Latva-Karjanmaa, 2005). Emberi behatástól mentes és erdőműveléssel érintett erdőállományokból gyűjtött mintákat értékeltek 9 SSR lokusz alapján. Korábbi kutatásokkal ellentétben magas hektáronkénti klónszámot (12,7) és alacsony klónonkénti egyedszámot (2,1) állapítottak meg a vizsgált blokkokban (a vizsgált paraméterek tekintetében jelentős különbséget nem mutattak ki a természetes és a kezelt erdőállományok között). A Moran I mutató [a területi autokorrelációs vizsgálatokban használt, az egyes terület egységek szomszédos területekhez viszonyított intenzitásértékeit leíró statisztika (Tóth, 2003), amely allélfrekvencia értékekkel is értelmezhető (Hardy et Vekemans, 1999)] 10 méteres távolság-egységekben számított értékei alapján az első 10 méteren belül elhelyezkedő egyedek allélmintázata mutatott pozitív autokorrelációt (volt közel rokonnak vagy azonos klóhoz tartozónak tekinthető). Ezt a szerzők azzal magyarázzák, hogy erdőtüz vagy szélöntés okozta a kis területi kiterjedésű állománypusztulások rekolonizációja során megjelenő rezgő nyár magoncokra ható azonos környezeti nyomás (szelekció) hasonló allélszerkezetű egyedek fennmaradását segítette elő.

Ezzel szemben, véleményem szerint, sokkal inkább arról lehet szó, hogy az üres területek rekolonizációjában döntő mértékben a legközelebb álló ivarérett nőivarú egyed utódai vettek részt, és ez okozza a hasonló genetikai mintázatot. Külön érdekessége a kutatásnak, hogy a vizsgálatba bevont egyedek átlagos kora a bolygatatlan erdőállományokban 152 és 129 év volt (15 cm-es mellmagassági átmérő felett kerültek értékelésre az egyedek), ugyanis hazai viszonylatban 60 év feletti egyedek, köszönhetően elsősorban az őket érő biotikus károsításoknak, már nagyon ritkának számítanak (Gencsi et Vancsura, 1997).

A rezgő nyár spanyolországi főbb elterjedési területeiről származó összesen 82 egyed SSR analízisét végezték el Gómez és munkatársai, az egyes populációk genetikai változatosságának felmérése, illetve in vitro géngyűjtemény kialakításához felhasználható egyedek kijelölése céljából (Gómez et al., 2003). 6 mikroszatellit lokusz vizsgálata során magas átlagos heterozigóciát állapítottak meg a populációkban ($H_{exp}=0,475$), továbbá azon korábbi vizsgálati eredmény alapján, mely szerint a lokális elterjedésű magas frekvenciájú, illetve széles elterjedésű, de alacsony frekvenciájú allélek megőrzése fontosabb, mint a lokális elterjedésű alacsony frekvenciájú alléleké (Brown, 1979 cit. Gómez et al., 2003), a szerkesztett dendrogramon kis kapcsolódási távolságot mutató egyedeket (számszerint 26-ot) jelöltek ki az in vitro génbank kialakítására a vizsgált egyedek közül.

159 szardíniai származású fehér nyár egyed mikroszatellit elemzését végezték el Brundu és munkatársai a sziget fehér nyár populációjának genetikai és filogeográfiai jellemzése céljából (Brundu et al., 2008). A polimorf mintázatot mutató öt sejtmagi SSR lokusz elemzése alapján magas klónszámot azonosítottak a kutatók, a 159 egyed mindössze 26 genotípushoz tartozott. Ennek ismeretében különösen érdekes, hogy a számított diverzitás értékekben jelentős eltérés nem volt megfigyelhető a szardíniai és egy észak-olaszországi populáció (Ticino régió) között. A három kloroplaszt mikroszatellit lokusz vizsgálata mindössze három, egyébként csak a szardíniai fehér nyárrakra jellemző halpotípust azonosított, mely alapján, illetve a sejtmagi DNS elemzése során kimutatott két egyedi SSR allél figyelembe vételével a szerzők valószínűsítik a sziget utolsó jégkorszak alatti refugialis szerepét a fehér nyár esetében.

A Duna ausztriai folyása mentén gyűjtött egyedek bevonásával vizsgálták van Loo és munkatársai fehér nyár és a szürke nyár szubpopulációk térbeli genetikai szerkezetét (van Loo et al., 2008). A vizsgálatokba 3 szubpopuláció összesen 407 egyedét vonták be, a molekuláris genetikai vizsgálatokat pedig 19 SSR markerrel végezték, melyek mindegyike polimorf allélmintázatot mutatott. A fehér nyár és a szürke nyár esetében közel azonos klónarányt mutattak ki (21 és 24%), a klóncsoportok kiterjedése ugyanakkor a szürke nyár esetében nagyobb volt. A térbeli genetikai szerkezet jellemzésére Vekemans és Hardy által kifejlesztett, a páronkénti rokonsági koefficiens egyedek közötti távolságfüggő változását leíró Sp értéket (Vekemans et Hardy, 2004) alkalmazták. A szürke nyár esetében mintegy háromszor nagyobb Sp értéket mutattak ki a kutatók (mind egyed-, mind genotípus szinten), amit a fehér nyár szülővel visszakereszteződött egyedek térbeli eloszlásával, valamint a szürke nyár klóncsoportok nagyobb kiterjedésével magyaráztak.

Disszertációm témájához nagyban hasonló kutatásról számoltak be Lexer és munkatársai (Lexer et al., 2005). A fehér és a rezgő nyár között lejátszódó hibridizációs viszonyonyokat vizsgálták a Duna Bécs környéki szakasza mentén fellelhető hibridizációs zónában. A vizsgálatokba a zónában kijelölt 20-20 fehér és rezgő nyár, illetve 93 szürke nyár egyedet, valamint egy romániai fehér nyár és egy karintiai rezgő nyár referencia populációból származó 20-20 egyedet vontak be. A molekuláris genetikai vizsgálatok során 20 sejtmagi SSR lokusz és 8 kloroplaszt DNS fragmenthossz polimorfizmus elemzését végezték el. A 20

polimorf SSR lokusz elemzése során a rezgő nyár esetében mérték a magasabb diverzitás értékeket a két alapfaj közül, míg a szürke nyár köztes értékeket adott [várt és megfigyelt heterozigócia, valamint a legkisebb mintaszámra korrigált allélikus gazdagság (*allelic richness*, átlagos lokuszonkénti megfigyelt allélszám, melynek értékét, tekintettel annak mintaszámtól való függésére, célszerű a vizsgált populációkban a legkisebb populációméretre redukálni; Hedrick, P. W., 2011) tekintetében]. Az allélfrekvencia értékek alapján számított egyedbesorolás szerint a vizsgált szürke nyár egyedek a fehér nyár felé integrálódó hibridcsoportként mutatkoztak, jelezve, hogy a hibrid rajt zömében a fehér nyárral visszakereszteződött egyedek alkotják. A PCR-RFLP vizsgálat során 8 haplotípust azonosítottak a szürke nyárak között, melyek közül hat volt fehér és egy rezgő nyár eredetű, míg egy (H16) mindkét klaszterben előfordult, amit a szerzők ősi eredetű polimorfizmusnak tartanak. Az introgresszió uralkodó irányát, mely szerint a rezgő nyár a pollenadó és a fehér nyár pedig a pollenfogadó szülő, a szerzők citoplazmatikus inkompatibilitással magyarázzák.

Ugyancsak az említett fehér és rezgő nyár populációk, valamint a Duna menti hibridizációs zóna egyedeinek 19 mikroszatellit markerrel végzett elemzése során jelentős allélfrekvencia különbséget mutattak ki a kutatók a két alapfaj egyedei között (Lexer et al., 2007). A Bayes-féle genetikai szerkezet analízis során a hibridizációs zónával szomszédos szubpopulációk pánmiktikus egységként mutatkoztak, ami megerősítette azt a korábbi feltételezést, mely szerint két faj szomszédos állományai között magas szintű génáramlás áll fenn.

Többek között 83 mikroszatellit marker bevonásával végzett újabb elemzés során magas erősen differenciált lokusz arányt (35%) mutattak ki a fehér nyár és a rezgő nyár között Lexer és munkatársai az említett ausztriai hibridizációs zónában, ugyanakkor a nagy számban felfedezett alacsony fajok közötti diverzitást mutató lokuszok jelenlétét korábbi alkalmi, de tartós fajok közötti introgresszióra vezették vissza (Lexer et al., 2010).

Egy első generációs (F_1 -es) szürke nyár és egy fehér nyár klón keresztezéséből származó 86 BC_1 -es egyed finomléptékű genetikai vizsgálatát végezték el Macaya-Sanz és munkatársai (Macaya-Sanz et al., 2011). A 86 SSR és 13 EST (*Expressed Sequence Tag*) markerrel végzett vizsgálat során hat kromoszóma-hoz köthető 13 marker mutatott szignifikáns szegregáció-torzulást, amely összességében a polimorf lokuszok 20%-át tette ki. A 13 lokusz közül 12 esetében mutattak ki a kutatók szignifikáns rezgő nyár alléldominanciát, melyet episztatikus gének kölcsönhatásra, overdominancia vagy heterozigóta előny jelenlétére, illetve citoplazma-sejtmag kölcsönhatásra, vagy ezek kombinációjára vezettek vissza.

2.2.2.5. AFLP

A PCR-RFLP módszerhez hasonlóan az AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) markerezési technika is ötvözte az endonukleázokkal történő DNS emésztésnek és egy PCR reakciónak. A módszer lényege, hogy a PCR reakciót megelőzően a sejtmagi DNS-t egy gyakran és egy ritkán hasító restrikciós endonukleázzal hasítják. Ezt követően a hasított fragmentumok végeire speciális kettős fonálú szekvenciákat (adaptereket) ligálnak. A PCR reakció során olyan szelektív nukleotidokkal ligált primereket használnak, melyek a restrikciós fragmentumok hasítási helyeinek csak egyikéhez tudnak kapcsolódni (Hajósne Novák, 1999). A módszer előnye, hogy a restrikciós enzimekkel be lehet állítani a keletkező fragmentumok számát, hátránya, hogy az AFLP markerek domináns öröklődésűek, azaz közvetlenül nem alkalmasak heterozigóta lokuszok vizsgálatára.

66 köztermesztésben lévő nyár fajta genetikai azonosítását végezték el AFLP és SSR markerek felhasználásával Fossati és munkatársai (Fossati et al., 2005). Bár a három AFLP

primerpárral és 6 SSR primerrel végzett elemzések nagyban hasonló eredményeket mutattak, a mikroszatellit analízis bizonyult jobb felbontóképességűnek ('I-262'/'I-455' és 'Robusta'/'Hejdemij' fajták az AFLP analízissel nem voltak egymástól elkülöníthetők). A három primerpárral végzett AFLP elemzés összesen 201 értékelhető fragmentumot eredményezett, a Jaccard koefficiens értékek alapján végzett főkomponens analízis pedig alátámasztotta a módszer fajtaazonosításra való alkalmasságát (a két első főkomponens értékeikkel ábrázolt fajták származásuknak megfelelő határozott halmazokba tömörültek).

Populus deltoides MARSCH., *P. nigra* L. és *P. trichocarpa* TORR. et GRAY genetikai kapcsoltsági térképének elkészítéséhez használtak AFLP és SSR markereket Cervera és munkatársai (Cervera et al., 2001). Három klón felhasználásával képzett két család (*Populus deltoides* cv. S9-2 × *P. nigra* cv. Ghoy; *P. deltoides* cv. S9-2 × *P. trichocarpa* cv. V24) utódainak (127, illetve 105 egyed), valamint a szülők értékeléséhez családonként 50, illetve 41 AFLP primer kombinációt használtak. A kapcsoltsági térképek készítéséhez felhasznált AFLP markerek eloszlását, többek között Pearson-féle korrelációs együtthatóval is ellenőrizték; a vizsgálat eredményeképpen megállapították, hogy a markerek véletlenszerű eloszlást mutatnak a kapcsoltsági csoportokban.

Ugyancsak Cervera és munkatársai vizsgálták 27 nyárfajhoz tartozó 171, valamint 3 interspecifikus hibridhez tartozó 7 egyed (klón) felhasználásával az egyes nyárfajok genetikai és filogenetikai kapcsolatát AFLP markerek segítségével (Cervera et al., 2005). Az értékelés alapját az öt primer kombinációval végzett szelektív amplifikáció során kimutatott 151 polimorf AFLP marker (allél) képezte, az egyes egyedek genetikai kapcsoltságát a Dice- és Jaccard-féle hasonlósági együtthatóval jellemezték. Kutatásuk számos érdekes eredményt hozott. A *Tacamahaca* szekcióba tartozó *Populus koreana* REHD. és *P. maximowiczii* HENRY magasfokú genetikai kapcsoltságot mutatott; e két faj Eckenwalder szerint a *P. suaveolens* FISHER fajjal tekinthető azonosnak (Eckenwalder, 1996 cit. DiFazio et al., 2011). AFLP mintázata alapján genetikailag a *Leuce* szekcióba tartozó japán rezgő nyár (*P. sieboldii* MIQUEL) a *Tacamahaca* szekcióba tartozó *P. trichocarpa* TORR. et GRAY és a *P. balsamifera* L. között helyezkedik el, ami fajtakeveredést feltételez, mint ahogyan az is, hogy az Aigeiros szekción belül a *P. fremontii* S. WATSON a *P. deltoides* MARSCH. és a *P. nigra* L. hibridjének bizonyult (utóbbi tévedést maguk a szerzők is valószínűsítik). A legváltozatosabb, egyben a leghatározottabban elkülönülő csoportot a *Leuce* szekcióba tartozó fajok, illetve egyedek mutatták. A szürke nyár köztes elhelyezkedést mutatott a fehér és a rezgő nyár között a filogenetikai törzsfán. A *P. tremula* AFLP mintázata alapján nagyfokú hasonlóságot mutatott a *P. tremuloides* MICHX. –szel, amit a szerzők közös őstől való származásra vezetnek vissza, ugyanakkor, tekintettel arra, hogy ezen két fajhoz állélmintázata alapján a *P. davidiana* SCHNEID. is nagyon közel áll, eredményeikkel a szerzők alátámasztani vélik Eckenwalder azon felvetését, mely szerint mindhárman egy fajhoz tartoznak (Eckenwalder, 1996 cit. Cervera et al., 2005).

Az *Aigeiros* szekcióba tartozó európai fekete nyár és hibrid nyárok közötti introgresszió mértékét vizsgálták Smulders és munkatársai Hollandiában a Rajna és mellékfolyói mentén gyűjtött fekete nyár mintákban, AFLP és SSR markerek segítségével (Smulders et al., 2008). Az egy primer kombinációval végzett AFLP analízis alkalmasnak bizonyult a hibrid egyedek kimutatására. Az előzetesen kimutatott 51 AFLP szekvencia közül 48 mutatott polimorfizmust az egyedek között, és bár csak egy szekvencia bizonyult *Populus nigra* L. specifikusnak, a több informatív sáv esetben megfigyelt frekvencia különbségek lehetővé tették az introgresszió-mentes és hibrid egyedek kimutatását. A hibrid jellegű egyedek besorolását NewHybrid 1.0 programmal végezték a kutatók; ez a program az egyedeket

allélfrekvencia értékeik alapján osztályozza, és alkalmas olyan markerek értékelésére is, melyek nem mutatnak határozott mintázatbeli elkülönülést a szülőfajok között, illetve olyan esetek vizsgálatára is, mikor a szülőfajok allélmintázata nem ismert (Anderson et Thompson, 2002). Az AFLP vizsgálat során mutatott allélfrekvencia értékeik alapján a vizsgált 44 egyed közül 24 bizonyul introgresszió-mentes tiszta fekete nyárnak, 13 F_1 -es hibridnek, 5 *nigra*-ával visszakereszteződött egyednek, míg kettő tiszta *deltoides*-nek.

A Ticino-folyó menti fehér nyár állományok introgresszálságát vizsgálták Fossati és munkatársai AFLP és SSR markerekkel (Fossati et al., 2004). Referenciaminták bevonásával tesztelt 3 AFLP primerpár 133 értékelhető fragmentumot eredményezett, melyek közül 113 bizonyult polimorfnak. A fragmentumok között 23 mutatott fajspecifikusságot (14 volt jellemző a rezgő nyárra, míg 9 a fehér nyár mintákra). Az öt vizsgált SSR régió közül kettő mutatott a PCR reakciót követően fajspecifikus alléleket. Az AFLP vizsgálat során kimutatott allélfrekvencia értékek alapján számított Jaccard-féle hasonlósági együttható bevonásával hasonlósági mátrixot számítottak, mely alapján főkomponens analízist végeztek a kutatók. A legnagyobb diverzitást mutató első két főkomponens értékeik alapján ábrázolva a vizsgált 50 természetes eredetű fehér nyár közül 35 bizonyult introgresszió-mentes egyednek, 13 a két alapfaj közötti köztes elhelyezkedése alapján F_1 -es, míg kettő a fehér nyár szülővel visszakereszteződött (valószínűleg BC_1 -es) hibridnek.

2.2.2.6. SNP

Az SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) nem más, mint két egyed DNS-ének egy bázisbeli eltérése. Ugyanakkor az egy bázisbeli eltérést abban az esetben tekinthetjük SNP-nek, ha annak frekvenciája az adott populációban meghaladja az 1%-ot (Brooks in Kwok, 2003). A DNS láncban bekövetkező SNP hatással lehet egyes fehérjék működésére, szabályozására és expressziójára. A genomban előforduló SNP-k kimutathatóak többek között SSCP (*Single-strand Conformation Polimorphism*) módszerrel (Tahira et al. in Kwok, 2003), vagy PCR reakciót követő DNS szekvenálással (Kwok et Duan in Kwok, 2003). Az SSCP módszer lényege, hogy hevítéssel denaturált PCR amplifikátumokat nem denaturáló környezetben, poliakrilamid gélen választanak el, ahol az egyszálal DNS láncok az általuk tartalmazott komplementer bázisok révén saját magukkal hibridizálnak. Az így létrejött másodlagos struktúrák elektroforetikus mobilitása eltérő, amely lehetővé teszi a DNS láncokban fellelhető szekvencia eltérések detektálását (Glaubitz et Moran in Young et al., 2000). Az SNP-k potenciálisan a legjobb genetikai markerek, köszönhetően nagy számuknak a genomban, valamint adaptív jellegekkel való kapcsolatuknak (González-Martínez et al., 2006).

Nyolc *Populus balsamifera* L. populáció nukleotid diverzitását értékelték Breen és munkatársai három enzim lokusz elemzése alapján (Breen et al., 2009). Az adaptív tulajdonságok kifejeződésében szerepet játszó enzimek [Alkohol dehidrogenáz 1 (*Adh1*), Glicerinaldehid-3-foszfátáz dehidrogenáz (*G3pdh*), abszcizinsav inszenzitivitás (*ABI1B*)] lokuszaira tervezett primerekkel egyedenként 1827 bp hosszúságú DNS szakaszt vizsgáltak, melyekből 858 bp-nyi szekvencia jelentett kódoló régiót. A vizsgálat során lokuszonként 5-8 SNP-t azonosítottak. Az egyes populációk genetikai diverzitását többek között a Nei-féle nukleotid diverzitással (Nei, 1987) is értékelték. A kutatók ezen paraméter tekintetében a referenciaként vizsgálatba vont két másik észak-amerikai nyárfajhoz (*P. trichocarpa* TORR. et GRAY, *P. deltoides* MARSCH.) hasonló értékeket kaptak. Az európai rezgő nyárral végzett kutatások eredményeivel való összevetés során ugyanakkor a rezgő nyár populációkéhoz képest a *P. balsamifera* L. populációk nukleotid diverzitása jóval kisebb értéket mutatott

(példaként $\pi_{G3pdh\ bals.}=0,0022$, $\pi_{G3pdh\ trem.}=0,0145$). Az európai fajhoz viszonyított jelentősen alacsonyabb nukleotid diverzitást a kisebb effektív populációmérettel magyarázzák a kutatók, amely a legutóbbi glaciális okozta palacknyak effektusnak köszönhető.

A nyárak esetében a rövid nappalok indukálta rügyképzésben és növekedés-szabályozásban szerepet játszó fitokrom B2 (*phyB2*) fotoreceptor fehérje lokusz genetikai diverzitását vizsgálták különböző földrajzi szélességű rezgő nyár populációkban Ingvarsson és munkatársai (Ingvarsson et al., 2006). Két svédországi, valamint egy-egy ausztriai és francia populáció vizsgálva közepes nukleotid diverzitást állapítottak meg ($\pi_{phyB2}=5,96-7,24 \times 10^{-3}$), továbbá a vizsgált 9 SNP közül négy esetében mutatták ki azok frekvenciájának földrajzi szélesség függő klinális változatosságát (a svédországi minták esetében).

Svédországi rezgő nyár géngyűjteményből származó 12 egyed *phyB2* lokusz körüli régiójának összesen 800 pb hosszúságú DNS szakaszának diverzitását vizsgálták ugyancsak Ingvarsson és munkatársai (Ingvarsson et al., 2008). A vizsgált régióban 29 SNP azonosítottak; a *phyB2* lokuszon korábban azonosítottakkal együtt összesen 42 SNP étékelése során 8 esetében mutattak ki klinális változatosságot a származási hely földrajzi szélessége és az allélfrekvencia értékek között. A nyolc közül három SNP, melyek a *phyB2* régióban helyezkedtek el, a többszörös tesztelésen alapuló korrekciót követően is szignifikáns kapcsolatot mutatott a földrajzi szélesség adatokkal, ami a fotoperiodikussággal kapcsolatos adaptív genetikai differenciálódásra utal.

Ugyancsak az említett svédországi rezgő nyár gyűjteményből származó minták felhasználásával vizsgálták Ma és munkatársai a fotoperiodikussággal kapcsolatos génszabályozásban résztvevő enzimlokuszok genetikai és klinális változatosságát (Ma et al., 2010). 23 fotoperiodikus génszabályozásban részt vevő enzimlokuszon 113, míg a kontrollnak választott, az említett szabályozásban részt nem vevő 21 lokuszon 93 SNP-t azonosítottak. A vizsgált rezgő nyár populációk között a fotoperiodikus és kontrol SNP-k tekintetében sem szignifikáns diverzitás ($F_{ST}=0,018$, illetve $0,016$), sem szignifikáns várt heterozigótia különbség nem volt kimutatható. Az F_{ST} értékek heterogenitás vizsgálata ugyanakkor már szignifikáns differenciát mutatott a két csoport között, jelezvén, hogy a fotoperiodikus SNP-k heterogenitása nem a genetikai diverzitásbeli különbségekből származik. Öt, a fotoperiodikus génszabályozásban résztvevő lokuszokhoz köthető SNP esetében mutattak ki független kapcsolatot a növekedés lezárásával, és összességében négy SNP esetében volt klinális változatosság kimutatható.

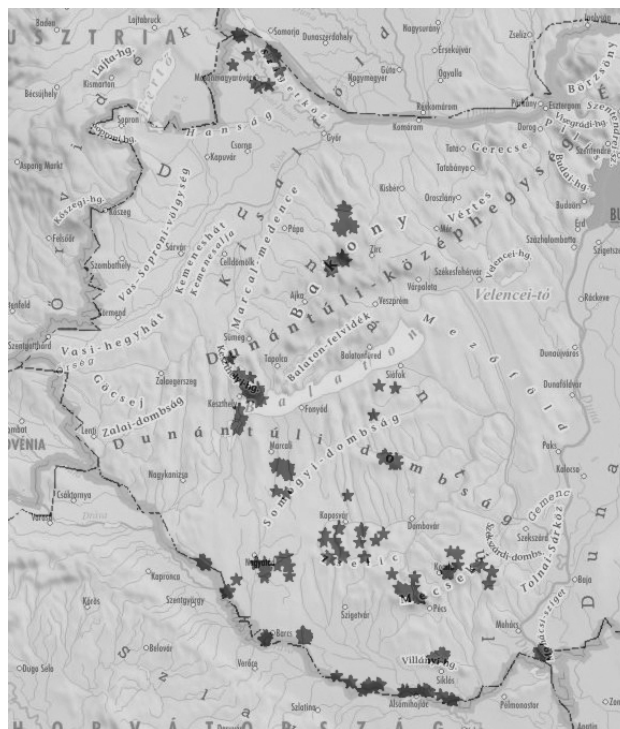
3. Anyag és módszer

3.1. Mintafák kijelölése, levélminta-gyűjtés

2006 és 2009 között összesen 931 mintafát jelöltem ki a Dunántúlon, érintve lehetőség szerint minél több olyan tájegységet, melyekre jelentősebb fehér nyár és rezgő nyár előfordulás jellemző. A mintagyűjtés alkalmával érintettem így a Drávamenti-síkság, a Villányi-helység, a Mecsek, a Baranyai-dombság, a Zselic, a Dunamenti-síkság, a Külső- és Belső-Somogy, a Keszthelyi-hegység, a Balatoni-medence, a Magas-Bakony, a Déli-Bakony, a Balaton-felvidék és a Szigetköz erdészeti tájakat (a mintagyűjtés helyszíneit az 1. ábra szemlélteti). Ugyanakkor számos fontos fehér és rezgő nyár populációt nem állt módomban mintázni, melynek elsősorban anyagi eredetű okai voltak. Így nem került vizsgálat alá a Nyugat-Dunántúl és a Duna-mente jelentős része sem. Amint erre lehetőségem adódik, a kimaradt populációk vizsgálatát is szeretném elvégezni.

A mintafák kijelölése során azon középidős, idős egyedek kerültek kiválasztásra, melyek üzemtervi adatok, a helyi szakemberek ismeretei, vagy elhelyezkedésük alapján természetes eredetűnek bizonyultak. Végző soron azon egyedeket tekintettem természetes eredetűnek, melyet önvetényülésből származónak, vagy egy korábban elpusztult egyed gyökérsarj utódjának ítéltam. Ezek figyelembe vételével gyűjtésem elsősorban más főfafajok alkotta erdőállományokban elegyfaként megőrzött, illetve erdőszegélyben, tisztáson álló fákra, illetve néhány esetben természetes úton felújított (sarjaztatott) fehér vagy szürke nyár állományokban álló egyedekre terjedt ki.

A telepített *Leuce* nyár állományokban való kijelölést lehetőségekhez mérten kerültem, de kivételes esetekben erre is került sor (pl. a Dunamenti-síkságon). A szempontjaimnak leginkább megfelelő egyedeket tartalmazó erdőrésztletek, területek felkeresésében helyi erdész vagy természetvédelmi szakemberek voltak a segítségemre. A mintafa kijelölés során egy tömbből vagy erdőrésztletből legfeljebb három mintafát választottam ki, a nagy kiterjedésű sarjcsoportok mintázásának elkerülése végett, illetve abból a megfontolásból, hogy a rendelkezésemre álló időszakban a lehető legnagyobb területen végezzek gyűjtést. Amennyiben egy erdőrésztletben több egyed közül volt lehetőségem választani (magasabb elegyarány vagy főfafajként való jelenlét esetében), úgy olyan egyedeket jelöltem ki, melyek felső lombkoronaszintben elfoglalt helyzetük, méretük és egészségi állapotuk alapján valószínűsíthetően hosszabb távon is aktívan részt vesznek a lokális génáramlási folyamatokban. A kiválasztott mintafákat színes festékkel megjelöltem, rögzítettem elhelyezkedésük GPS koordinátáit, többükről írásos és fényképes



1. ábra: A mintafák elhelyezkedése (megjegyzés: a balaton-felvidéki mintafák az alacsony mintaszám miatt nem kerültek vizsgálatra)

Amennyiben egy erdőrésztletben több egyed közül volt lehetőségem választani (magasabb elegyarány vagy főfafajként való jelenlét esetében), úgy olyan egyedeket jelöltem ki, melyek felső lombkoronaszintben elfoglalt helyzetük, méretük és egészségi állapotuk alapján valószínűsíthetően hosszabb távon is aktívan részt vesznek a lokális génáramlási folyamatokban. A kiválasztott mintafákat színes festékkel megjelöltem, rögzítettem elhelyezkedésük GPS koordinátáit, többükről írásos és fényképes

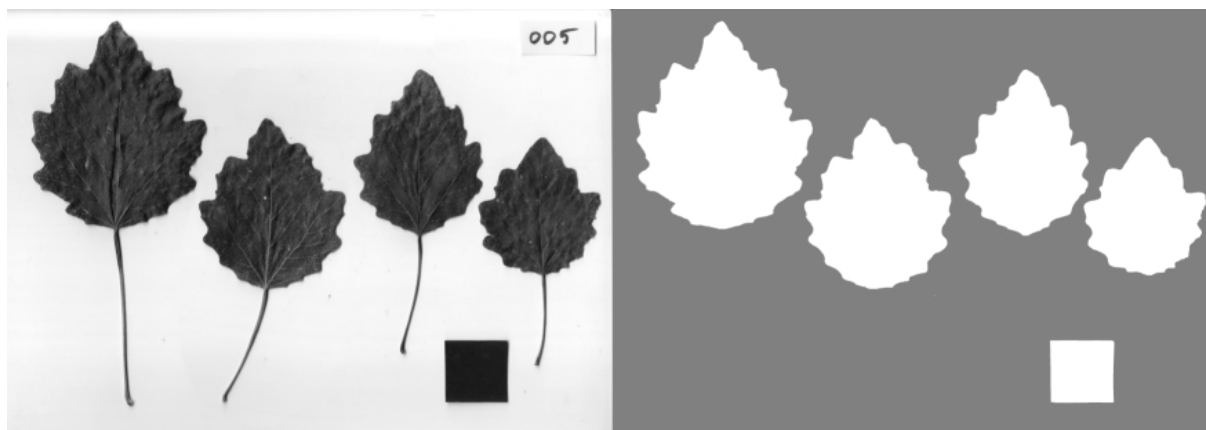
dokumentációt készítettem. A mintafákról ágnyeső olló segítségével 4-6 méteres magasságból olyan ágakat metszettem, mely lehetőség szerint minél több rövidhajtást hordoztak. Ezen ágakról rövidhajtás leveleket gyűjtöttem, külön a genetikai, külön a levélmorfológiai vizsgálatokhoz. A genetikai vizsgálatok céljára 1-2 ép, biotikus és abiotikus károsításoktól mentes, fiatalabb levelet választottam (a hosszúhajtások pillássága, szőrözöttsége a DNS kivonás előkészítését nehezíti). Az e célra gyűjtött leveleket simítózáras nejlon tasakba helyeztem, és a laborba való érkezétségig 4 °C-on folyamatosan hűtve tároltam. A morfológiai vizsgálatok céljára 5-10, az egyedre jellemző tipikus, ép, kifejtett rövidhajtás levelet választottam; több esetben is tapasztaltam kisebb mértékű egyeden belüli rövidhajtás levél változatosságot, ezért a levélalak elemzéshez a legnagyobb számban előforduló, általam jellemzőnek ítélt levélalakokat választottam ki. Az állományban álló, felszorult koronájú fákról sörétes fegyverrel történt a mintagyűjtés, ami miatt általában kevesebb levél állt rendelkezésemre a kellő mintaszám begyűjtésére. De ez esetekben is törekedtem az ép, tipikus levélalakok kiválogatására, és kerültem a deformált vagy aszimmetrikus levelek kiválasztását. Illetve amennyiben a lehullott minták azt lehetővé tették, a rövidhajtásokkal együtt hullott leveleket gyűjtöttem be. A morfológiai vizsgálatokra gyűjtött leveleket a mintagyűjtés ideje alatt papírzacskóban, a barnulás elkerülése végett hűtőben 4 °C-on tároltam. A mintagyűjtést követően a leveleket préselve szárítottam, majd a feldolgozásig papírzacskóban tároltam tovább.

A mintafa kijelölés alkalmával terepi fajbesorolást végeztem, mely során az egyedeket a fehér nyár, rezgő nyár és szürke nyár taxon valamelyikébe soroltam. Szürkenyárként határoztam meg minden egyedet, melyek köztes morfológiai jellegeket mutattak, függetlenül attól, hogy F₁-es, vagy valamelyik fajjal visszakereszteződött egyedként voltak azonosíthatóak. A besorolás alkalmával a következő morfológiai bélyegeket értékeltem: hosszúhajtás és rövidhajtás levelek alakja, a hajtás szőrözöttsége, kéreg színe és habitusa.

3.2. Levélmorfológiai vizsgálatok

A genetikai és morfológiai vizsgálatokba a leggyűjtött 931 egyed közül 439-et vontam be, melynek elsősorban szintén anyagi jellegű okai voltak (a genetikai vizsgálatok jelentős költségigénnyel bírnak, melyek megszabták az első körben vizsgálható egyedek számát). A levélmorfológiai elemzéshez mintafánként a legjobb állapotban lévő 3-5 levelet választottam ki, melyekről ezt követően Canoscan lide 20 típusú szkennelrel, 300 dpi-es felbontással digitális képet (jpeg) készítettem. A mintafánként kiválasztott levelek egy képre kerültek; a kép a mintafa-azonosító mellett egy 30 × 30 mm-es méretstandardot is tartalmazott. A levélmorfológiai vizsgálatok során összesen 2095 levél értékelését végeztem el.

Az elkészült képeket Paint.NET 3.5.11 (dopPDN LLC, 2013) képszerkesztő programmal készítettem elő a morfometriai elemzéshez. A képszerkesztés során eltávolítottam a levél nyelet, a leveleket függőleges helyzetbe forgattam, majd a levelek sziluettjét egy új munkalapra másoltam. A háttér szürke színnel töltöttem ki. Az eljárás eredményeképpen a levelek fehér színű lenyomatát tartalmazó szürke háttérű képet kaptam. Minderre azért volt szükség, mert az alkalmazott morfometriai szoftver a képi színek binarizálása során a levélerek árnyékát megtartja, melynek eltávolítása a későbbiekben a levélalak enyhe erodálódását vonhatja maga után. A képszerkesztési eljárás előtt álló képet, illetve az eljárás végeredményét a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A szkennelést követő és a morfolometriai értékeléshez előkészített kép

A több éves tárolás, illetve esetenként a gyűjtési körülmények miatt számos levélen levéllemez sérülések voltak megfigyelhetők (repedések, törések, sörétnyomok). A vizsgálatra kiválasztott leveleken lévő sérüléseket a képszerkesztő program segítségével retusáltam. A levéllemez digitális módon történő javítását egy példán keresztül a 3. ábra szemlélteti. A retusáláson átesett képek alkalmassá váltak a morfolometriai szoftverrel történő elemzésre. Tekintettel arra, hogy a morfolometriai szoftver csak 24 bites bitmap formátumú képeket tud



3. ábra: Levéllemez-repedés digitális retusálása

kezelni, a képszerkesztés után a felvételeket ebben a formátumban mentettem el.

A levél-morfolometriai elemzéseket Hiroyosi Iwata által fejlesztett Shape 1.3 (Iwata et Ukai, 2002b) szoftvercsomaggal végeztem. Az elemzésekhez a következő programokat használtam: ChainCoder, Chc2Nef, PrinComp,

PrinPrint. A programcsomag a következő weboldalon érhető el: <http://lbm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/~iwata/shape/>).

A mintafák leveleiről készített bitmap fájlok elemzését a ChainCoder képelemző szoftver alkalmazásával kezdtem. A program, több lépésben az eredeti képről egy bináris (fekete-fehér) képet készít, miközben csökkenthető a képek által esetlegesen tartalmazott képzaj mértéke. A kép betöltését megelőzően a program nyitó panelén megadtam az alakzatok és a háttér fényesség-viszonyát (esetemben a háttér volt sötétebb tónusú), a méretstandard méretét, elhelyezkedését (bár levélméret meghatározást nem végeztem, annak lehetőségének fenntartása céljából a kép jobb alsó negyedébe egy 30 × 30 mm-es standardot helyeztem el). Ezt követően kiválasztottam az elemezni kívánt képet. A betöltött képen az elemzés elvégezhető a kép egy elemén, vagy az általa tartalmazott valamennyi alakzaton (én természetesen a teljes kép elemzését végeztem el). A képről „Gray Scale” gombra kattintva szürke árnyalatú képet készítettem, a gördülő sávból kiválasztható additív alapszín alapján (esetemben, lévén, hogy fehér-szürke képeket készítettem, a kiválasztásnak nem volt jelentősége, így az alapbeállítást, tehát a vörös színt használtam). A következő lépésben megjelenő szürke árnyalatú kép pixel-tónus eloszlását ábrázoló hisztogram, illetve az árnyalati határérték alapján binarizált fekete-fehér képet készítettem a levéllenymatokat tartalmazó ábráról. A fekete-fehér képen meglévő, az alakzatok körvonalának leírását zavaró

szennyeződések (képzaj) ezt követően két szűrő segítségével is eltávolíthatók, illetve csökkenthetők, attól függően, hogy a képzaj milyen jellegű (porszemek, apró törmelékek, hajsál eltávolításához az „ero dil filter”, míg nagyobb kiterjedésű foltok törléséhez a „dil ero filter” ajánlatos, a megfelelő ismétlésszám beállítását követően – tekintettel arra, hogy a kép előkészítés során valamennyi zavaró alakzatot eltávolítottam, nem volt szükséges a szűrők használata). A következő lépésben a program táblázatos formában megjelenítette az általa a képen felismert alakzatokat (a méretstandarddal együtt), azok elhelyezkedését, valamint pixel méretét (a gomb melletti mezőben megadható, hogy mekkora pixel méret feletti alakzatokat tüntessen fel a listában). Ezt követően a „Chain Coding” gombra kattintva a program elkészítette a listában szereplő alakzatok körvonalát leíró lánckódokat (chain code; Freeman, 1974), melyeket egyenként mentettem el.

A lánckódokkal leírt levélkörvonalak elliptikus Fourier leíróit (elliptic Fourier descriptor – EFD) a Chc2Nef programmal állítottam elő. A leírók normalizálásához a leghosszabb sugár módszert (longest radius) és 75 harmonikust választottam a program kezdő paneljén. A leghosszabb sugár módszerrel történő normalizálás során lehetőségem nyílt a levelek megfelelő irányba való forgatására (a levél körvonalával harmonizáló első harmonikus ellipszis középpontjától legtávolabb lévő pont nem minden esetben esett egybe a levélcsúcscsal). A megnyitandó chc fájl és a feldolgozás során létrehozásra kerülő nef fájl nevének és helyének meghatározását követően előugró panelen elvégeztem a levelek megfelelő vizsgálati irányba forgatását. Minden egyes pozíció mentésének alkalmával a program elmentette az adott levél harmonikusaihoz tartozó elliptikus Fourier koefficienseket.

Az előző programmal megállapított elliptikus Fourier leírók főkomponens analízisét a PrinComp fájlal végeztem. A nef fájl megnyitását követően a megjelenő párbeszédpanelen kiválasztható, hogy a szimmetrikus vagy az aszimmetrikus koefficiensek elemzését kívánjuk-e elvégezni külön (én az együttes elemzésüket választottam, azaz mind a négy feltüntetett koefficiensre kijelöltem). Ezt követően a programmal elvégeztem az elliptikus Fourier leírók főkomponens analízisét. A főkomponens analízis során a következő értékeket számította a program: elliptikus Fourier koefficiensek átlagai, szórása, variancia-kovariancia mátrixa, a számított főkomponensek értéke, a levélalak változatosságára gyakorolt hatása százalékosan kifejezve, valamint a főkomponens vektorok értékei. Az adatokat a számítást követően txt fájlba mentettem. A következő lépésben a programmal kiszámítottam az egyes egyedekre vonatkoztatott főkomponens értékeket. Annak szemléltetésére, hogy az egyes főkomponensek a levélalak mely részének változatosságát írják le, a programmal ábrázoltam az átlagos főkomponens értékek alapján szerkesztett átlagos alakú levél alakváltozásait, az egyes főkomponensek értékeinek változtatása esetén (pozitív és negatív kétszeres szórás figyelembe vételével).

3.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok

3.3.1. DNS kivonás

A DNS kivonás, valamint a molekuláris genetikai vizsgálatok az Erdészeti Tudományos Intézet Genetikai Laboratóriumában, a laboratórium munkatársai által kerültek elvégzésre. A sejtmagi és kloroplaszt DNS kivonása fagyasztva tárolt rövidhajtás levelekből történt. A kivonáshoz a QIAGEN cég Dnease Plant Mini Kit-jét használtuk. A több lépésből álló kivonási folyamat eredménye mintegy 200 µl nagy tisztaságú DNS oldat lett, melyet a további

felhasználásig hűtve tároltunk. A DNS oldatból 50 µl-i mennyiséget -80°C-on tároltunk tovább, az egyedek genetikai állományának megőrzése céljából.

3.3.2. PCR-RFLP vizsgálat

A vizsgálatokhoz négy kloroplaszt specifikus primerpár – restrikciós endonukleáz kombinációt alkalmaztunk, melyek felsorolását az 1. táblázat tartalmazza.

cpPrimer	Restrikciós endonukleáz	Vizsgált fragmentumok hossza (bp)	Vizsgált fragmentumok száma
trnTP + trnDP	Hinfl	90-180	2
Rpl16R1516 + rpl16F71R	Eco-RI	310-380	5
Rps3f2 + ccmp10R	Hha I + Ssp I	205-320	5
ccmp10R + trnHM	Msp I	285-385	7

1. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálatokban alkalmazott primerpárok és restrikciós endonukleázok

A primerek kiválasztása Grivet és munkatársainak (Grivet et al., 2001), valamint Heinze (Heinze, 2005, 2007) adatai alapján történt. Az amplifikációhoz szükséges, 100 mintára számított PCR mix összetételét a 2. táblázat tartalmazza. A PCR plate-re fülenként 1 µl DNS, valamint 20 µl PCR mix került felvitelre.

Összetevő	Mennyiség (µl)
5 × PCR puffer	400
Magnézium-klorid (25 mM)	160
Desztillált víz	1312
dNTP (10 mM)	40
Taq polimeráz	8
Primer 1	40
Primer 2	40
Összesen	2000

2. táblázat: PCR mix összetétele

A Eppendorf Mastercycler Gradient készülékben végzett polimeráz láncreakció protokollját 3. táblázat tartalmazza.

Lépés	Hőmérséklet	Művelet	Időtartam
1.	94°C	Kezdő denaturáció	3 perc
2.	94°C	Denaturáció	50 másodperc
3.	70°C	Visszahűtés	1 perc
4.	<i>2-3. lépés ismétlése 9-szer</i>		
5.	94°C	Denaturáció	30 másodperc
6.	55°C	Primerkötődés	50 másodperc
7.	70°C	Lánchosszabbítás	4 perc
8.	<i>5-7. lépés ismétlése 34-szer</i>		
9.	4°C	Állandó hőmérsékletű tárolás leállításhoz	

3. táblázat: PCR-RFLP vizsgálat PCR protokollja

A PCR reakciót követően az amplifikáció minőségét 1,5%-os agaróz gélen (Roti® garose NEEO, Roth GmbH) történő gélelektroforézissel ellenőriztük. A mintákat etídium-bromiddal, a későbbi vizsgálatok során GelRed (Biotium Inc.) festettük és UV fény alatt tettük láthatóvá. A gélekről digitális fényképet készítettünk.

A PCR amplifikátumokat ezt követően restriktáz endonukleázzal (vagy endonukleáz párral) emésztettük. Az emésztéshez a 4. táblázatban szereplő összetevőket elegyítettük (a táblázatban az MspI enzimmel történő emésztés receptje található, 100 mintára számolva).

Összetevő	Mennyiség (μl)
10 × enzimpuffer	88
Enzim (MspI)	5
Desztillált víz	307
Összesen	400

4. táblázat: A DNS emésztéséhez használt enzimoldat összetevői (MspI)

Két enzimmel történt emésztés során enzimenként 44 μl enzimpuffert adtunk az oldathoz, illetve, tekintette arra, hogy a hozzáadott enzim mennyisége enzimenként változott (0,04 μl HhaI, 0,05 μl MspI, 0,05 μl Eco-RI, 0,07 μl SspI, illetve 0,1 μl HinfI mintánként), a desztillált víz mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy az a teljes oldat mennyiségét 400 μl-re egészítse ki (100 mintát figyelembe véve).

Az emésztéshez a mintákat plate-re vittük fel; zsebenként 5 μl DNS-t és 4 μl enzimoldatot mértünk ki. A emésztés 37°C-on termosztát szekrényben történt, legalább 4 órán keresztül. Az emésztést követő fragmentelválasztás 1,75 %-os agaróz gélen történt. A fragmentumok festését, detektálását és rögzítését a korábban ismertetett módon végeztük.

Az egyes fragmentek azonosításához Kodak 1D Image Analysis Software-t alkalmaztam. A haplotípusok meghatározását Fussi és munkatársai (Fussi et al., 2010) által alkalmazott metodika szerint készített saját protokoll alapján végeztem. A lokuszonként azonosított informatív alléleket számkódokkal láttam el (lokuszonként a legrövidebb fragmentektől indulva 1-től felfelé), majd az egyedek alléladatait a GenAlEx 6.5 programnak megfelelő formátumba szerkesztettem.

3.3.3. RAPD vizsgálat

A RAPD vizsgálatok során 20 Operon primert teszteltünk (Eurofins MWG Operon, <http://www.operon.com/>), melyek közül 5 mutatott polimorfizmust (OPA1, OPD5, OPE9, OPK8, OPK16). Az öt primer közül kettő bizonyult alkalmasnak a két faj elkülönítésére, ezért a RAPD elemzést a teljes vizsgálati mintasoron ezen két primerrel (OPD5, OPK8) végeztük el.

A PCR reakcióhoz szükséges PCR mix összetételét az 5. táblázat tartalmazza, 100 mintára számolva. A PCR mixből 13 μl-t mértünk ki mintánként a PCR plate-re, melyhez 2 μl DNS oldatot adtunk. A vizsgálatok során az Erdészeti Tudományos Intézetben Cseke Klára által kifejlesztett PCR protokollt alkalmaztuk, melynek leírását a 6. táblázat tartalmazza.

A fragmentek elválasztása, festése és rögzítése a PCR-RFLP módszer esetében ismertetettel megegyező módon történt.

Az értékelésre kerülő fragmentek a próbaftatások során jól reprodukálhatónak bizonyult fragmentekből kerültek kiválasztásra. A fragmentek meghatározását, akár csak a PCR-RFLP vizsgálatok eredményeinek kiértékelése során, Kodak 1D Image Analysis Software segítségével végeztem. A felvételek értékelése során a sávok minősége és polimorfizmusa

alapján a két primer esetében összesen 41 fragmentumot választottam ki a későbbi értékelésekhez (OPD5 - 20 db, OPK - 21 db), melyek a következő mérettartományban helyezkedtek el: 200-535 bp (OPD5), illetve 170-620 bp (OPK8). A kiválasztott fragmentumokat ezt követően gélfotónként binárisan kódoltam. Az egyedek binárisan kódolt fragmentumtípusát a kiértékeléshez fajonként, illetve populációnként összesítettem, és a GenAlEx 6.5 programnak megfelelő formátumba szerkesztettem.

Összetevő	Mennyiség (μl)
5 × puffer	300
Magnézium-klorid (25 mM)	90
Primer	150
dNTP	15
Taq polimeráz	15
Desztillált víz	730
Összesen	1300

5. táblázat: RAPD vizsgálathoz használt PCR mix összetétele

Lépés	Hőmérséklet	Művelet	Időtartam
1.	95°C	Kezdő denaturáció	15 perc
2.	95°C	Denaturáció	1 perc
3.	38°C	Bekötődés	1 perc
4.	72°C	Lánchosszabbítás	2 perc
5.	2-4. lépés ismétlése 39-szer		
6.	72°C	Végső lánchosszabbítás	10 perc
7.	4°C	Állandó hőmérsékletű tárolás leállításig	

6. táblázat: RAPD vizsgálat során alkalmazott PCR protokoll

3.3.4. SSR vizsgálat

Az SSR vizsgálatokat 6 primer felhasználásával végeztük, melyek mindegyike polimorfnak bizonyult a vizsgált növényanyag tekintetében. A felhasznált primerek a következők voltak: WPMS14, WPMS16, WPMS18, WPMS20 (WPMS sorozat *Populus nigra* L.-ra kifejlesztve, Van der Schoot et al., 2000, Schmulders et al., 2001), valamint PMGC2060 és PMGC2163 (PMGC sorozat, http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm). A mikroszatellit vizsgálatok során alkalmazott PCR mix összetételét, valamint a PCR protokollt a 7. és 8. táblázatok tartalmazzák.

A PCR vizsgálatot követően a reakció sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük, a korábban ismertetett módszer szerint. A felszaporított fragmentek elválasztása ABI PRIZM™ 310 Genetic Analyzer készülékkel történt, a keletkezett fragmentek hosszának meghatározása GeneMapper szoftver segítségével végezték a labor munkatársai.

A GenAlEx 6.5 szoftverrel történő elemzésre az egyedenkénti alléladatokat táblázatos formába szerkesztettem, melyben minden egyes egyedhez hozzárendeltem a hat lokusznak megfelelő összesen 12, hosszukkal jellemzett allélt.

Összetevő	Mennyiség (μl)
5 × puffer	3
Magnézium-klorid (1,5 mM)	1,5
Forward primer	0,4
Reverse primer	0,4
dNTP mix (10 mM)	0,25
Taq polimeráz	0,08
Desztillált víz	8,37
DNS minta (10 ng/ μl)	1-2

7. táblázat: PCR mix összetétele SSR vizsgálatokhoz

Lépés	Hőmérséklet	Művelet	Időtartam (NP)	Időtartam (LP)
1.	94°C	Kezdő denaturáció	15 perc	15 perc
2.	94°C	Denaturáció	5 másodperc	45 másodperc
3.	50-60°C	Bekötődés	15 másodperc	45 másodperc
4.	72°C	Lánchosszabbítás	60 másodperc	105 másodperc
5.	2-4. lépések ismétlése 30-szor			
6.	72°C	Végső lánchosszabbítás	10 perc	10 perc

8. táblázat: az SSR vizsgálatok során alkalmazott PCR protokoll

3.4. Statisztikai elemzés

A levélmorfológiai vizsgálatok során kapott, az egyes egyedek levélalakját jellemző főkomponens értékeket Statistica 6.0 programmal (Statsoft. Inc., 2001a) értékeltem. Az értékelés során a főkomponens értékeket diszkriminancia analízisnek („*Discriminant Function Analysis*”), illetve ezen vizsgálattal egybekötve kanonikus varianciaanalízisnek („*Canonical Analysis*”) vettem alá.

A különböző markerezési eljárások eredményeképpen nyert fragmenthossz és –mintázat adatokat a fontosabb genetikai diverzitás értékek meghatározása céljából GeneAEx 6.5 szoftverrel (Peakall et Smouse 2006, 2012a) értékeltem. A genetikai távolság adatokból Statistica 6.0 szoftver segítségével készítettem dendrogramokat („*Cluster Analysis*”).

4. Eredmények és megvitatásuk

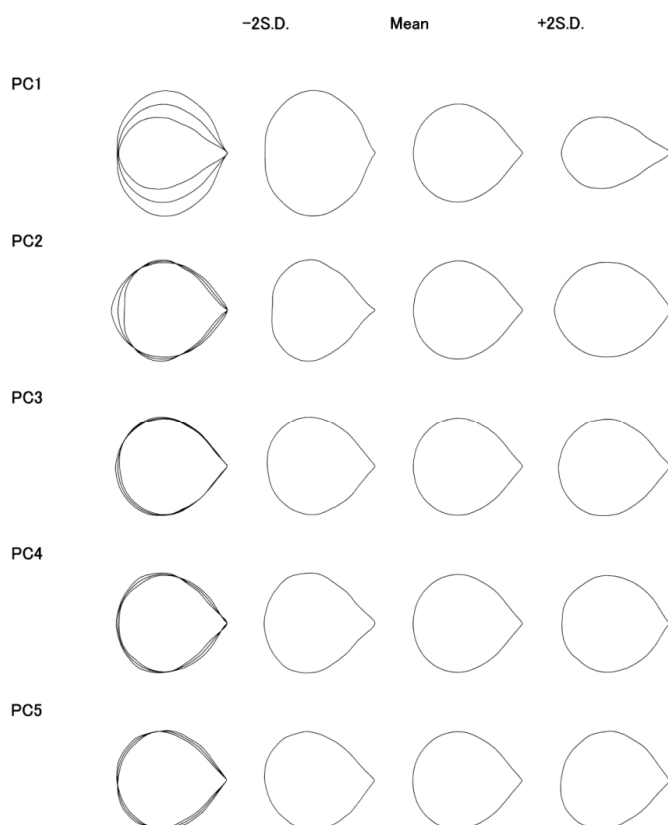
4.1. Levélmorfológiai vizsgálatok

4.1.1. Levélalak elemzés Shape 1.3 programmal

A 2095 levélen 75 harmonikussal végzett főkomponens analízis során 300 főkomponens (Principal Components – PC) került meghatározásra, azaz a levelek alakváltozatosságáért ezen 300 főkomponens felelős (az első öt főkomponens sajátértékét, valamint a teljes varianciához való hozzájárulásának arányát az 9. táblázat, míg a 300 főkomponens ezen értékeit az 1. számú melléklet tartalmazza).

Főkomponens	Sajátérték	Részarány (%)	Halmazott részarány (%)
PC1	$1,37 \times 10^{-2}$	68,25	68,25
PC2	$1,14 \times 10^{-3}$	5,66	73,91
PC3	$8,29 \times 10^{-4}$	4,13	78,04
PC4	$6,36 \times 10^{-4}$	3,17	81,21
PC5	$4,18 \times 10^{-4}$	2,09	83,30

9. táblázat: Főkomponensek sajátértéke és a teljes varianciához való hozzájárulásának mértéke



4. ábra: Az első öt főkomponens által leírt levélalak változatosság (jelmagyarázat lásd a szövegben)

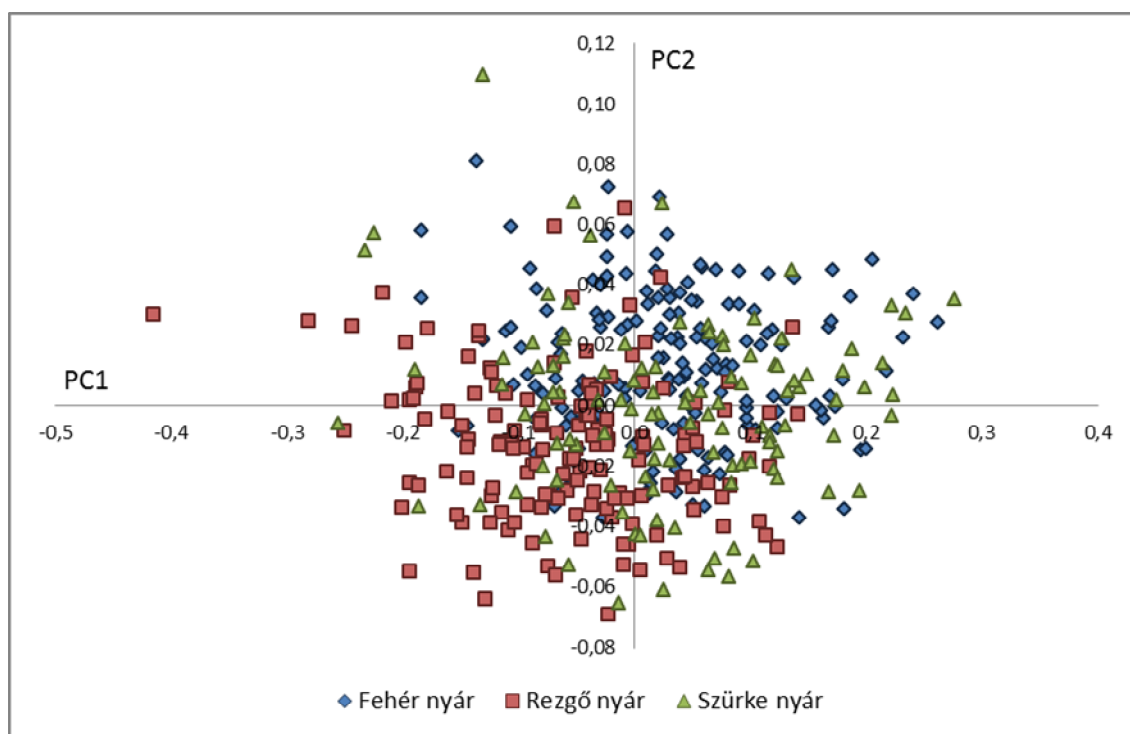
Az egyes főkomponensek a levéllemez különböző részeinek változatosságát írják le. Szemléltetésképpen az első öt főkomponens levélalak változatosságra gyakorolt hatását a 4. ábrán mutatom be. Az ábra harmadik oszlopa a főkomponens átlagok alapján szerkesztett átlagos levélalakot szemlélteti, míg a mellette jobb- és baloldalon az adott főkomponens kétszeres negatív és pozitív szórása alapján rajzolt levélalak látható. Az első oszlop a három levélkontúr egymásra vetítését szemlélteti. A teljesség igénye nélkül, az első főkomponens, amely a teljes levélalak-variancia közel 70 %-áért felelős, a levélszélesség és a levélhossz arányát írja le, a második főkomponens a levélváll és a levélcsúcs alakját, míg a harmadik a levélváll jobb oldali aszimmetriáját fejezi ki. Az ötödik főkomponens a levéllemez aszimmetriáját jellemzi.

Bár a levélalak varianciára gyakorolt hatásának %-os mértékét nem ismertetik, Lexer és

munkatársai által végzett levélmorfológiai vizsgálatok is a levélhossz-levélszélesség arányt leíró főkomponenst helyezték sorrendben az első helyre (PC1) a szimmetrikus elemek közül, 84 *Leuce* nyár egyedről származó 527 rövidhajtás levél értékelése során (Lexer et al., 2009). Esetükben, akár az én vizsgálataim alapján is, a második főkomponens (PC2) a levélcúcs és levélalap alakját írja le, jól mutatva a módszer *Leuce* nyáron való eredményes alkalmazhatóságát. A vizsgálataim alapján számított első 20 főkomponens által leírt levélalak változatosságát a 2. számú melléklet tartalmazza.

Az egyes egyedek jellemezhetők a vizsgálatba bevont levelek körvonala alapján számított főkomponens értékekkel. Ennek érdekében az első 20 főkomponens értékeit átlagoltam valamennyi egyed esetében (természetesen attól függően, hogy hány levelet szkenneltem be, ez 3-5 adatból képzett átlagot jelentett főkomponensenként). Végeredményben egy 20 számból álló, az egyedeket jellemző számsort kaptam, melyek felhasználásával diszkriminancia és kanonikus analízist végeztem.

Annak felderítése érdekében, hogy a levélalak varianciát legnagyobb arányban leíró két főkomponens alkalmas-e az egyes fajok elkülönítésére, az egyedeket PC1 és PC2 értékeikkel egy kétdimenziós koordináta rendszerben ábrázoltam. A koordináta-rendszert az 5. ábra szemlélteti. Az ábrán jól látható, hogy bár a terepi meghatározás alapján elkülönített fajok egyedei jól körülhatárolható halmazokat alkotnak, az átfedés a két halmaz között jelentős. A hibrid szürke nyár egyedek pedig a két alapfaj teljes területét lefedik. Ezek alapján megállapítható, hogy önmagában ezen két főkomponens érték nem alkalmas a taxonok jellemzésére, így az általam tervezett fajmeghatározásra sem.



5. ábra: Az alapfajok és a hibrid egyedek ábrázolása PC1 és PC2 értékeikkel

4.1.2. Főkomponensek szignifikancia-vizsgálata

Annak eldöntése érdekében, hogy az egyes főkomponensek milyen mértékben vesznek részt a fajok közötti variancia kialakításában, szignifikancia-vizsgálatot hajtottam végre. A vizsgálatot a Student-tesztel végeztem, a Statistica 6.0 program segítségével [*T-test for*

independent samples (groups)]. A vizsgálat alapját a 20 főkomponens érték átlaggal jellemzett, és a terepi meghatározás alapján csoportokba (fehér nyár, rezgő nyár, szürke nyár) sorolt 439 egyed képezte. A program az egyes csoportok között párosával végezte el a szignifikancia-vizsgálatot. Az eredményeket táblázatos formában a 3. számú melléklet tartalmazza.

Amint az a mellékletben található táblázatokból kiolvasható, a fehér és rezgő nyárak vizsgálata során 11 főkomponens mutatott szignifikáns differenciát a fajok között, melyek közül 8 bizonyult erősen szignifikánsnak ($p < 0,001$). A rezgő és a szürke nyár csoport között megfigyelt szignifikáns differenciát adó főkomponensek száma 7, közülük 6 bír erőteljes szignifikanciával. A legkevesebb szignifikáns differenciát mutató főkomponens a fehér és szürke nyárak között volt kimutatható (összesen 6 darab), és közülük csak kettő bizonyult erősen szignifikánsnak, ami morfológiai (és genetikai) értelemben kisebb távolságra utal a két csoport között, mint a szürke nyár-rezgő nyár viszonylatban. Érdemes megemlíteni, hogy csupán a PC2 és PC3 főkomponensek bizonyultak mindhárom csoport összevetésében szignifikánsan eltérőnek a csoportok között, ezért ezen főkomponensek értékeit külön ábrázoltam. A kétdimenziós koordináta-rendszerben ugyanakkor ezen főkomponens értékek mentén sem volt markáns szegregáció megfigyelhető a két alapfaj pontfelhője között, a hibrid egyedek pedig ezen esetben is a két alapfaj halmazát lefedő elhelyezkedést mutattak (az ábrát a 4. melléklet tartalmazza).

Szándékomban állt a főkomponensek egyedek közötti Student-tesztjét is elvégezni, de a nagyszámú minta folytán a Statistica 6.0 programmal erre nem volt lehetőségem.

4.1.3. Diszkriminancia analízis

A diszkriminancia analízis egy több kvantitatív tulajdonág együttes értékelésén alapuló módszer, mely két populáció szétválasztására alkalmas (Sváb, 1973). A módszert a vizsgált faj és hibrid csoportok közötti differencia vizsgálatára, valamint a terepi egyedsorolás helyességének ellenőrzésére használtam.

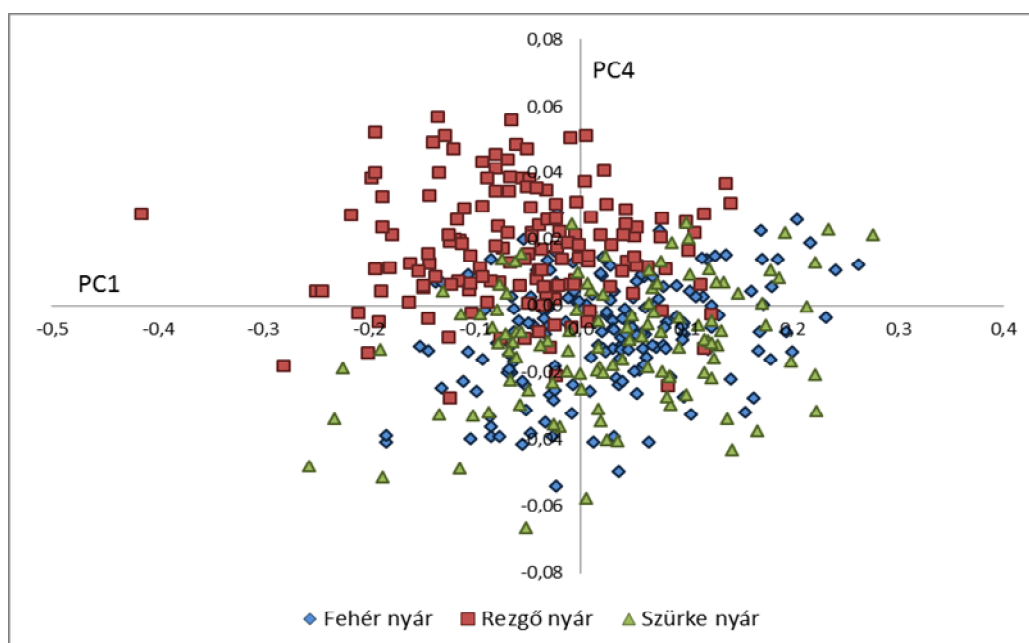
A vizsgálatba, mint a Student-teszt esetében is, a taxonok szerint besorolt, 20 főkomponens átlagaikkal jellemzett, összesen 439 egyedet vontam be. Az elemzést a Statistica 6.0 program „*Discriminant analysis*” módszerével végeztem. Az analízis eredményeinek összesítőjét a 10. táblázat tartalmazza.

A táblázatból kiemelendő a parciális Wilks-féle lambda értéke, amely az adott változó (főkomponens) egyedi hozzájárulását fejezi ki a teljes diszkriminációhoz (Statsoft. Inc., 2001b). A Wilks-féle lambda értéke nulla és egy között változik, attól függően, hogy az adott csoportosító változó a varianciának mekkora mértékét magyarázza - amennyiben nagy részét, úgy a csoportok átlagai között szignifikáns differencia áll fent, és a lambda értéke 0-hoz közelít (Varga et Szilágyi, 2011). A diszkriminancia analízis szerint a negyedik és az első főkomponens járul legnagyobb mértékben hozzá a csoportok közötti diszkriminációhoz (ezen változók bírnak a legalacsonyabb parciális Wilks-féle lambda értékekkel). Ennek vizuális ellenőrzése céljából a két főkomponens értékekkel kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázoltam az egyes csoportokba tartozó egyedeket. Bár az első két főkomponens értékekkel szerkesztett diagramhoz képest a két alapfaj egyedeinek pontfelhője valamelyest jobban szétválik, az átfedésük még jelentős. A hibrid szürke nyár egyedek ugyanakkor az említett diagramhoz képes már jóval inkább mutatnak köztes elhelyezkedést a két alapfaj egyedeihez viszonyítva, bár pontthalmazuk a fehér nyárak halmazával jelentős átfedést mutat. Ez összefüggésbe hozható Bartha Dénes vizsgálatának eredményével, mely szerint a természetben az ismertett virágzásbiológiai okokból

kifolyólag a szürke nyárak fehér nyár szülővel való visszakereszteződésének esélye magasabb, ami a fehér nyár irányába intergradálódó hibridrajok létrejöttét segíti elő (Bartha, 1999, 2005). A PC1 és PC4 értékekkel szerkesztett diagramot a 6. ábra szemlélteti.

Főkomponens	Wilks lambda	Parciális Wilks lambda	F-érték	p-szint	Tolerancia	1-Tolerancia (R ²)
PC1	0,27784	0,66979	102,79160	0,00000	0,77582	0,22419
PC2	0,26986	0,68960	93,85100	0,00000	0,78918	0,21082
PC3	0,19010	0,97892	4,48900	0,01178	0,93581	0,06419
PC4	0,39470	0,47148	233,72580	0,00000	0,67720	0,32280
PC5	0,18780	0,99093	1,90810	0,14965	0,91084	0,08916
PC6	0,23973	0,77625	60,09930	0,00000	0,80985	0,19015
PC7	0,19209	0,96878	6,71950	0,00134	0,89463	0,10537
PC8	0,18672	0,99663	0,70540	0,49448	0,95521	0,04479
PC9	0,18724	0,99385	1,28990	0,27640	0,86364	0,13636
PC10	0,18695	0,99542	0,95990	0,38379	0,87086	0,12914
PC11	0,18659	0,99732	0,56030	0,57149	0,84489	0,15511
PC12	0,18868	0,98629	2,89920	0,05618	0,95521	0,04479
PC13	0,18663	0,99711	0,60510	0,54651	0,83377	0,16624
PC14	0,18814	0,98909	2,29890	0,10164	0,84773	0,15227
PC15	0,18705	0,99490	1,06880	0,34434	0,84833	0,15167
PC16	0,18998	0,97951	4,36110	0,01335	0,91714	0,08286
PC17	0,18729	0,99360	1,34380	0,26197	0,91068	0,08932
PC18	0,18698	0,99523	0,99960	0,36890	0,95546	0,04454
PC19	0,19403	0,95909	8,89420	0,00017	0,94231	0,05769
PC20	0,23875	0,77946	58,99330	0,00000	0,75824	0,24176

10. táblázat: Összefoglaló diszkriminancia táblázat 20 főkomponens értékelése alapján



6. ábra: Az alapfajok és a szürke nyár egyedeinek elhelyezkedése és a PC1 és PC4 értékek alapján szerkesztett koordinátarendszerben

A Statistica programmal kiszámítottam az egyes csoportok négyzetes Mahalanobis távolságát, ami a változók csoportátlagának matematikai különbségének (távolságának) feleltethető meg (Sváb, 1979). A három csoport négyzetes Mahalanobis távolságát a 11. táblázat mutatja be.

A táblázatból jól látható, hogy a távolságok alapján a szürke nyár köztes elhelyezkedést mutat, amely természetesen hibrid voltaival magyarázható. Ugyancsak feltűnő, hogy a szürke nyár jóval közelebb helyezkedik el a fehér nyárhoz, ami szintén összefüggésbe hozható a terepi és virágzásbiológiai megfigyelések eredményeivel.

	Fehér nyár	Rezgő nyár	Szürke nyár
Fehér nyár	0,000	18,329	1,175
Rezgő nyár	18,329	0,000	14,041
Szürke nyár	1,175	14,041	0,000

11. táblázat: Az egyes csoportok négyzetes Mahalanobis távolsága

Hasonló eredményeket mutatnak a diszkriminancia analízis során kapott F és p értékek (12. táblázat).

	Fehér nyár	Rezgő nyár	Szürke nyár
Fehér nyár	-	0,000000	0,00
Rezgő nyár	70,60781	-	0,000000
Szürke nyár	3,8284	43,05651	-

12. táblázat: A diszkriminancia analízis során számított F-értékek és valószínűségi (p) szintek

A táblázat alapján megállapítható, hogy a három csoport között a 20 főkomponens átlag alapján szignifikáns különbség áll fent, valamint hogy a szürke nyár a két alapfajhoz képest köztes elhelyezkedést mutat, és a fehér nyár taxon felé mutat kisebb távolságot.

A program az egyes fajokra, illetve a hibrid egyedekre jellemző főkomponens értékek alapján (a csoportonkénti főkomponens átlagokat az 5. számú melléklet tartalmazza) elkészítette az általam tett taxon-besorolás értékelését. A besorolás eredményét a 13. táblázat tartalmazza, feltüntetve, hogy a program az adott taxon egyedeit mely taxonokba tartja besorolhatónak.

	Helyes besorolás aránya	Fehér nyár p=,39863	Rezgő nyár p=,34396	Szürke nyár p=,25740
Fehér nyár	85,71	150	1	24
Rezgő nyár	98,68	2	149	0
Szürke nyár	42,48	56	9	48
Összesen	79,04	208	159	72

13. táblázat: Diszkriminancia analízis során számított osztályozási mátrix

A levélalakot jellemző elliptikus Fourier leírókból származtatott főkomponensek diszkriminancia analízise alapján tehát, a Statistica program számításai szerint, a fehér nyár egyedek mintegy 86%-a, a rezgő nyár egyedek 99 %-a és a szürke nyár egyedek 42 %-a került helyesen meghatározásra a terepi fajbesorolás alkalmával. A táblázat alapján jól látható,

hogy a legnagyobb arányú téves besorolás a hibrid egyedeket érintette, valamint, hogy az elsősorban a fehér nyár – szürke nyár csoportok közötti átsorolásból (tévesztésből) származik. Természetesen figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a visszakereszteződött egyedek és a szülő fajok között éles morfológia határ nem vonható, valamint, hogy a program kizárólag a levelek körvonalának értékelését végezte el. Ugyanakkor a kutatási tématerv készítése során fontosnak tartottam egy konkrét morfológiai bélyeg egzakt értékelésén alapuló fajmeghatározás elvégzését.

A diszkriminancia analízis során számított egyedbesorolás eredményét a 6. számú melléklet tartalmazza.

4.1.4. Kanonikus analízis

A diszkriminancia analízis keretein belül a főkomponens értékek, mint változók bevonásával kanonikus analízist (*Canonical analysis*) végeztem (az értékelés alapját a 20 főkomponens átlaggal jellemzett egyedek képezték). Az analízis során a program kanonikus változókat számolt (szám szerint kettőt), melyek Khi^2 teszttel végzett szignifikancia vizsgálatának eredményeit a 14. táblázat tartalmazza.

Eltávolított változók száma	Sajátérték	Kanonikus R	Wilks-féle lambda	Khi ² érték	szabadságfok	p-szint
0	3,744252	0,888380	0,186092	717,1658	40	0,000000
1	0,132673	0,342247	0,882867	53,1335	19	0,000045

14. táblázat: Kanonikus változók szignifikancia vizsgálatának eredményei

A táblázat első sora a meghatározott két kanonikus változó együttes figyelembe vételével, míg a második sor a második (tehát az első eltávolításával nyert) változó bevonásával végzett értékelés eredményeit mutatja (*Step-down* teszt). Az eredmények jól mutatják, hogy az első kanonikus változó (CV1) hatása a csoportok közötti diszkriminancia mértékére jelentősebb, mint a második kanonikus változó (CV2). A két változó együttes Wilks-féle lambda értéke 0,186, ami az imént említett jelentős diszkriminatív hatást mutatja.

A kanonikus változók átlaga értelmezhető az egyes csoportokra is. A Statistica programmal számolt, egyes csoportokra jellemző változók értékét a 15. táblázat mutatja be.

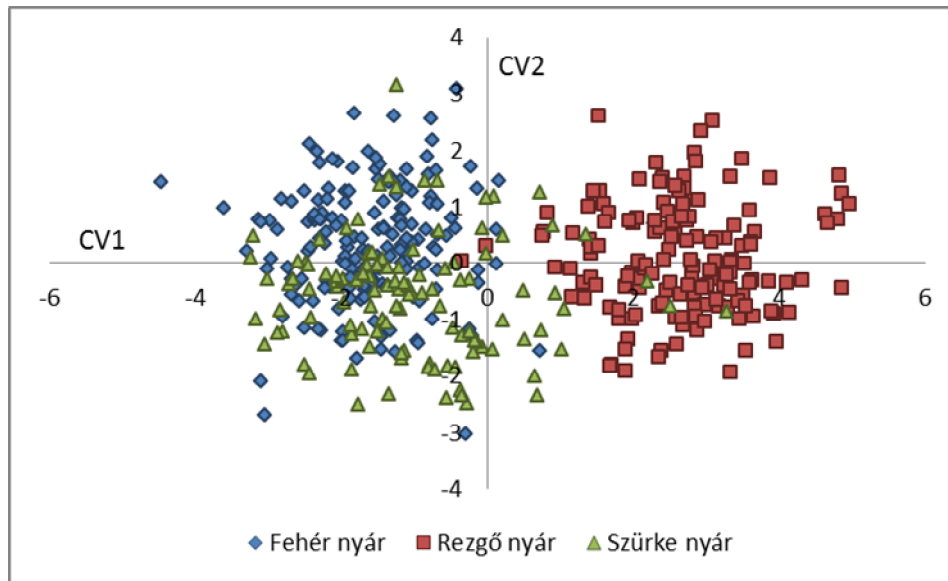
	CV1	CV2
Fehér nyár	-1,61396	0,32631
Rezgő nyár	2,64428	0,05963
Szürke nyár	-1,03402	-0,58503

15. táblázat: Az egyes csoportokra számított kanonikus változók átlagos értékei

A táblázatból jól kivehető, hogy a két alapfaj, valamint a hibrid szürke nyár határozott, egymástól jól elkülöníthető kanonikus változó értékekkel rendelkeznek. A változók ugyanakkor alkalmasak az egyes egyedek jellemzésére is. A vizsgált egyedek Statistica programmal számolt kanonikus változó értékeit a 7. melléklet tartalmazza.

Kanonikus értékekkel az egyes egyedek egy kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázolhatók. A változók ilyen módon történő ábrázolása, amennyiben a megfigyelési egységek (esetemben fajok és a hibrid alakok) szakmailag jól elkülöníthetők, értékes információkkal szolgálhatnak (Sváb, 1979). Annak kiderítése érdekében, hogy a kanonikus

változók alkalmasak-e a csoportok elkülönítésére, elvégeztem az egyedek koordináta-rendszerben történő ábrázolását, melynek eredményét a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: Kanonikus változó értékeikkel ábrázolt egyedek

Az ábrán jól látható, hogy a két alapfaj egyedei által alkotott pontfelhők egymástól határozottan elkülönülnek, az átfedés közöttük gyakorlatilag elhanyagolható (a diszkriminancia analízis két rezgő nyár egyedet fehér nyárnak minősített, ezen két egyed található csak a fehér nyár pontfelhőben). A szürke nyárak elhelyezkedése köztes, viszont erősen fehér nyár pólusú. A hibrid egyedek alkotta pontfelhő erős átfedést mutat a fehér nyárak halmazával, amely összefüggésbe hozható a fehér nyár felől történő erőteljes introgresszióval.

A levélmorfológiai vizsgálatok eredményeinek összefoglalásaként megállapítható, hogy a két faj egyedeinek levélalak változatosságára a levélhossz, levélszélesség arány van a legnagyobb hatással. Ezt jól mutatja a levélalakot leíró elliptikus Fourier leírók főkomponens analízise során meghatározott első főkomponens teljes varianciához való jelentős (68,25 %) hozzájárulása. Ugyanakkor pusztán főkomponens értékeik alapján az egyes egyedek nem bizonyultak taxon szinten határozottan elkülöníthetőnek. Ezt támasztja alá, hogy sem a két legjelentősebb variáció hányadú (PC1, PC2), sem a valamennyi taxon esetében szignifikáns differenciát mutató (PC2, PC3), sem pedig a diszkriminancia analízis során a legerőteljesebb diszkriminatív hatást eredményező (PC1, PC4) főkomponensek értékeivel kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázolt egyedek nem mutattak markáns taxon szintű szegregációt. A diszkriminancia analízis keretében elvégzett kanonikus elemzés során meghatározott két kanonikus változó ugyanakkor már eredményesnek bizonyult az egyedek taxonok szerinti elkülönítésére, amely bizonyította, hogy a *Leuce* szekcióba tartozó hazai nyár fajok elliptikus Fourier leírókon alapuló levélmorfometriai elkülönítése lehetséges.

Kétdimenziós koordináta-rendszerben kanonikus változó értékeikkel (CV1, CV2) ábrázolt szürke nyár egyedek részben a két alapfaj közötti, de elsősorban a fehér nyár egyedek halmazával átfedő elhelyezkedést mutattak, ami alátámasztja azt a megfigyelést, mely szerint a természetben létrejövő első generációs (F_1 -es) szürke nyár egyedek, elsősorban virágzásbiológiai okokból kifolyólag a fehér nyár szülővel kereszteződnek vissza, ami a fehér nyár felé intergradálódó hibrid alakkör kialakulását idézi elő (Bartha 1999, 2005). Ugyancsak

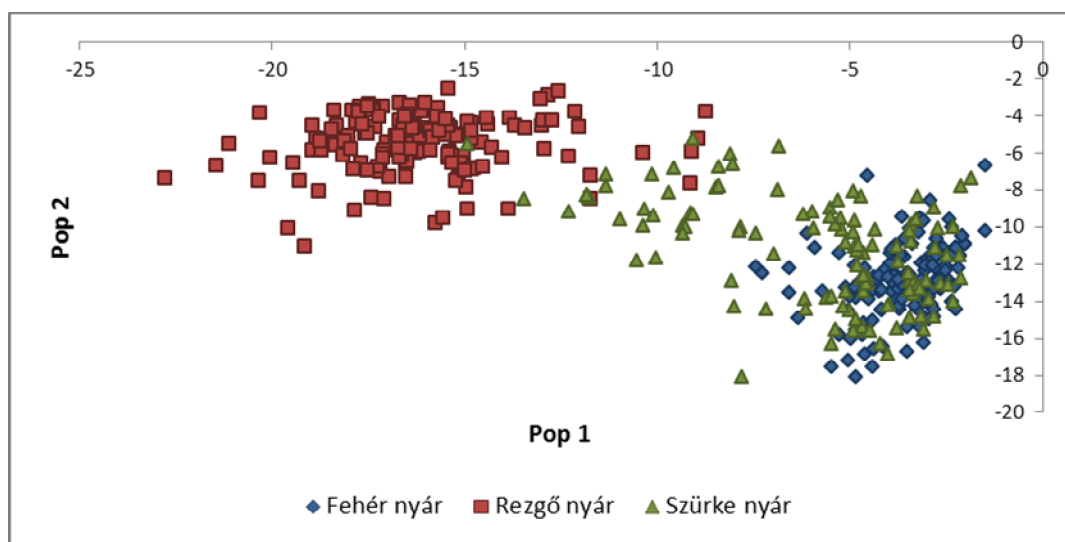
ezt a megfigyelést támasztják alá a diszkriminancia analízis során az egyes taxonok között meghatározott Mahalanobis távolságok. Ezen statisztikai mutató alapján a szürke nyár a két alapfaj közötti elhelyezkedést és a fehér nyár irányában kisebb távolságot mutat a rezgő nyárhoz képest. Tehát összességében a vizsgálat eredményei alátámasztják a szürke nyár fehér nyár és rezgő nyár közötti, morfológiai értelemben vett átmeneti jellegét.

4.2. Genetikai vizsgálatok

4.2.1. Egyedbesorolás molekuláris genetikai és levélmorfológiai jellegek alapján

Ahhoz, hogy a két alapfaj populációinak genetikai diverzitását az introgresszált egyedektől mentesen értékelhessem, el kellett végezni a leggyűjtött egyedek faji besorolását. Erre a célra a 439 egyeden elvégzett mikroszatellit és, tekintettel a diszkriminancia analízis eredményeire, a levélmorfológiai vizsgálatok eredményeit együttesen használtam.

A hat markerrel végzett SSR vizsgálatok során nyert allél adatok felhasználásával a GenAEx 6.5 program „Population assignment” módszerével végeztem el az egyedbesorolást. A Paetkau és munkatársai által kidolgozott módszer logaritmikus valószínűségi értékeket számít minden egyes egyedre az allélfrekvencia értékekkel jellemzett, egyedek között véletlenszerű párosodást feltételező, előre meghatározott populációk tekintetében (Peakall et Smouse, 2012b). Végül a program értékeli a feltételezett faji besorolás helyességét, meghatározva az egyes egyedek allélfrekvencia értékeik szerinti legvalószínűbb csoporthoz (fajhoz) való tartozását. Az elemzést 437 egyeden végeztem el (két egyed nem mutatott értékelhető alléladatokat három vagy több lokusz esetében). A terepi fajmeghatározás allélfrekvencia adatok szerinti pontosságát szemlélteti a 8. ábra, melyen jó látható, hogy téves besorolásokat elsősorban a fehér nyár-szürke nyár csoportok viszonylatában tettem; ez az eredmény nagy hasonlóságot mutat a levélmorfológiai vizsgálatok eredményeivel (lásd kanonikus analízis).



8. ábra: Terepi fajmeghatározás ellenőrzése mikroszatellit markerekkel

A hat markerrel végzett mikroszatellit vizsgálat egyedbesorolás eredményét az egyedek logaritmikus valószínűségi értékeivel a 8. számú melléklet tartalmazza.

A genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok alapján számított egyedbesorolási adatokat összevettem egymással. Az egyes módszerek besorolási adatait a 16. táblázat tartalmazza.

Besorolás	SSR analízis	Levélmorfológia	Átfedés
Fehér helyes	141	149	119
Fehérből szürke	33	24	2
Fehérből rezgő	0	1	0
Rezgő helyes	149	149	148
Rezgőből fehér	0	2	0
Rezgőből szürke	2	0	0
Szürke helyes	39	48	21
Szürkéből fehér	65	55	41
Szürkéből rezgő	8	9	4
Összesen	437	437	335

16. táblázat: A genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok során számított egyedbesorolások összevetése

A táblázatból jól látható, hogy a két módszer között elsősorban a fehér nyár-szürke nyár csoport tekintetében tapasztalható besorolási eltérés, ami jól mutatja az introgresszált egyedek azonosításának nehézségeit. Erre való tekintettel a populációgenetikai vizsgálatokba csak azon egyedeket vontam be, melyek egyedbesorolása a genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok alapján egyezést mutatott. Így összesen 160 fehér nyár, 152 rezgő nyár és 23 szürke nyár vált alkalmassá a további értékelésekre. A kiválasztott egyedek gyűjtési helyek (populációk) közötti eloszlását a 17. táblázat szemlélteti.

Populáció	Fehér nyár	Rezgő nyár	Szürke nyár
Drávamenti-síkság	23	11	1
Villányi-hegység	3	13	0
Mecsek	9	27	2
Közép- és Alsó-Duna-ártér	8	0	0
Belső-Somogy	26	45	8
Külső-Somogy	8	4	0
Zselic	18	15	5
Bakony	15	20	5
Keszthelyi-hegység	18	16	0
Balatoni-medence	8	0	0
Szigetköz	24	1	2
Összesen	160	152	23

17. táblázat: A vizsgált populációk egyedszáma az alapfajok és a hibrid szürke nyár tekintetében (jelmagyarázat: a genetikai vizsgálatokra kiválasztott populációk cellái zöld színnel kerültek kiemelésre)

Tekintettel arra, hogy a populációgenetikai vizsgálatokhoz javasolt minimális populáció méret [50, (Mátyás, 2002)] egy gyűjtési helyszín esetében sem állt rendelkezésemre, a populációk kiválasztásához szükséges minimális elemszámot 15 egyedben határoztam meg. Ettől egy, általam a terepi vizsgálatok tapasztalatai alapján nagyon értékesnek tartott (villányi-hegységi rezgő nyár) populáció esetében tértem el. A populációgenetikai vizsgálatokra kijelölt populációkat a 17. táblázat zöld színnel jelölt cellái mutatják.

4.2.2. SSR analízis

Az egyes populációk genetikai diverzitását leíró fontosabb statisztikai mutatók (allélfrekvencia, heterozigócia, F statisztika értékek) meghatározását a GenAEx 6.5 szoftver „Frequency” menüjének segítségével végeztem. A számítások kezdő lépéseként kiválasztottam a mikroszatellit vizsgálatoknak megfelelő adatformátumot (kodomonáns jellegnek megfelelő lokuszonként kétallélos formátum), majd a következő ablakban kijelöltem a számomra fontos statisztikai mutatókat (a fent említett mutatók mellett az allélmintázatot és a Nei-féle genetikai távolságot). Ezt követően a program elvégezte a kiválasztott statisztikai értékek meghatározását.

A lokuszonként meghatározott allélfrekvencia értékek alapján a kiválasztott primerek (lokuszok) mindegyike polimorfnek bizonyult a rezgő nyár populációk esetében. A fehér nyárak esetében ugyanakkor csak négy lokusz mutatott minden populáció esetében polimorfizmust; a WMPS16 primer a bakonyi populációban nem, míg a WMPS20 primer csak a drávamenti populációban mutatott egynél több allélt. Az egyes populációk fontosabb genetikai diverzitás értékeit a 18. táblázat tartalmazza.

A genetikai diverzitás, ezáltal a populáció alkalmazkodóképességének értékelésére alkalmas (Mátyás, 2002) Shannon-féle információs index (Shannon et Weaver, 1949) alapján a fehér nyár esetében a belső-somogyi populáció bizonyult a legdiverzebbnek ($I=0,814$). Ugyanezen állományt jellemzi a legmagasabb átlagos allélszám is ($N_a=4,333$), ugyanakkor, annak ellenére, hogy a fajon belül ezen populáció vizsgált egyedszáma volt a legmagasabb, a heterozigócia értékek tekintetében elmarad a szigetközi és zselici populációktól (a zselici állomány effektív allélszáma is magasabb a somogyinál). Utóbbi populáció azért is érdekes, mert a magas diverzitás értékeket az egyik legalacsonyabb egyedszám mellett adta. Valamennyi vizsgált paraméter alapján a bakonyi fehér nyár populáció mutatta a legalacsonyabb diverzitás értékeket. A fixációs index értékek valamennyi vizsgált fehér nyár populáció esetén negatív előjelűek, ami heterozigóta többletet jelez (Mátyás, 2002). Még egyszer kiemelendő továbbá, hogy a fehér nyárak esetében egyedül a Drávamenti-síkságon mintázott populációban mutatott valamennyi SSR lokusz polimorfizmust.

Populáció		N	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
Fehér nyár	Bakony	15,000	2,667	1,609	0,521	0,344	0,301	-0,121
	Belső-Somogy	26,000	4,333	2,240	0,814	0,410	0,396	-0,050
	Drávamenti-síkság	22,333	4,000	2,313	0,784	0,403	0,379	-0,053
	Keszthelyi-hegység	18,000	3,500	1,918	0,683	0,389	0,353	-0,086
	Szigetköz	23,500	3,833	2,224	0,791	0,449	0,404	-0,074
	Zselic	17,833	3,667	2,399	0,802	0,422	0,409	-0,019
Rezgő nyár	Bakony	19,833	5,833	2,802	1,225	0,557	0,602	0,070
	Belső-Somogy	44,167	6,833	3,042	1,255	0,575	0,597	0,030
	Keszthelyi-hegység	16,000	4,833	2,412	1,002	0,479	0,495	0,027
	Mecsek	26,667	5,333	2,775	1,119	0,539	0,556	0,042
	Villányi-hegység	12,667	3,500	2,268	0,923	0,521	0,511	-0,043
	Zselic	14,833	5,667	3,195	1,222	0,586	0,581	-0,060

18. táblázat: Mikroszatellit vizsgálat diverzitás értékei (jelmagyarázat: N – mintaszám, N_a – átlagos lokuszonkénti allélszám, N_e – effektív allélszám, I – Shannon információs index, H_o – megfigyelt heterozigócia, H_e – várt heterozigócia, F – fixációs index)

A rezgő nyár populációk esetében a fehér nyárakhoz képest feltűnően magasabb diverzitás értékek voltak megfigyelhetők. A Shannon-index-et alapul véve a belső-somogyi állomány bizonyult a legdiverzebbnek, ugyanakkor megjegyzendő, hogy a legmagasabb Shannon-index értéket a kiugróan magas vizsgált egyedszám mellett ($N=45$) adta (az egyedszámok esetében tapasztalható, a korábban közölt számoktól eltérő nem egész számok nullalléleket mutató egyedekre utalnak a populációban). Ennek fényében emelendő ki a bakonyi és a zselici populáció, melyek jóval alacsonyabb egyedszám mellett mutattak hasonlóan magas diverzitás értékeket, sőt, a bakonyi állomány várt heterozigócia, míg a zselici az effektív allélszám és a megfigyelt heterozigócia tekintetében adott magasabb értékeket a somogyinál. Shannon-index értéke, továbbá allélszám adatai alapján a villányi-hegységi populáció bizonyult a legkevésbé diverznek, míg a heterozigócia értékek alapján a Keszthelyi-hegységben mintázott állomány adta a legalacsonyabb értékeket. A fixációs index értékek alapján a Villányi-hegység és a Zselic rezgő nyár populációjának egyedei mutatnak a vizsgált lokuszok tekintetében heterozigóta többletet, míg a fennmaradó populációk egyedei heterozigóta hiányt.

Az egyes populációkban a GenAEx szoftver segítségével meghatároztam az előforduló egyedi allélek számát („Private Allele List” opció). A fehér nyár populációk közül a bakonyi és a szigetközi két, a drávamenti populáció egy egyedi, azaz kizárólag az adott populációra jellemző allélt hordozott. A rezgő nyár esetében a bakonyi kivételével valamennyi populációban találtam egyedi alléleket, a következő megoszlásban: Belső-Somogy és Zselic 3, Keszthelyi-hegység és Mecsek 2, illetve Villányi-hegység 1 db. A kimutatás eredményét táblázatos formában a 9. számú melléklet tartalmazza.

A populációk közötti és a populációkon belüli differenciáltság mértékének meghatározásához F és G statisztika értékeket számítottam a GenAEx 6.5 szoftver segítségével (az F statisztikát a korábban ismertetett módom, míg a G statisztikai mutatókat a program „G-Statistics Data Parameters” menüjének segítségével). Az egyes lokuszokra számított, illetve a fajokra vonatkoztatott átlagos F és G értékeket a 19. táblázat tartalmazza.

Lokusz	Fehér nyár				Rezgő nyár			
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
PMGC 2163	-0,118	-0,053	0,058	0,039	-0,138	-0,097	0,036	0,017
PMGC 2060	-0,044	-0,038	0,006	-0,015	-0,051	-0,032	0,018	-0,004
WPMS14	-0,004	0,030	0,034	0,012	0,002	0,034	0,032	0,009
WPMS16	-0,045	-0,024	0,021	0,000	0,128	0,155	0,031	0,005
WPMS18	-0,113	-0,072	0,037	0,018	0,064	0,102	0,041	0,017
WPMS20	-0,024	-0,004	0,020	-0,001	0,029	0,044	0,016	-0,007
Átlag	-0,058	-0,027	0,029	0,020	0,006	0,034	0,029	0,007

19. táblázat: SSR vizsgálatok során meghatározott F és G statisztika értékek

A populáción belüli differenciáltságot leíró F_{IS} értékek a szekción belül is alacsonynak számítanak [0,027-0,300 közötti F_{IS} értékeket határoztak meg kutatók *Populus alba* L., *P. tremula* L., *P. tremuloides* MICHX. fajokkal végzett mikroszatellit vizsgálatok során (DiFazio et al., 2011)]. Ugyancsak alacsonynak mondható a két faj esetében meghatározott populációk közötti differenciáltság (F_{ST}) is. 0,05 alatti F_{ST} érték már csekély mértékű differenciáltságnak számít (Mátyás, 2002), és mint az a táblázatban is látható, az általam vizsgált dunántúli régióban a populációk differenciáltságának eme mérőszáma a két fajra egységesen 0,029-es értéket adott. A Nei-féle populációk közötti differenciáltság (G_{ST}) értékei ugyancsak hasonló

eredményt mutattak. Az F_{ST} mutatóhoz hasonlóan a G_{ST} esetében is a 0,05-ös érték már igen alacsony mértékű populációk közötti differenciáltságot jelez (Mátyás, 2002); az esetemben ez a mutató a fehér nyár tekintetében 0,020, míg a rezgő nyár esetében 0,07 volt. Mindezek alapján megállapítható, hogy a Dunántúlon a két nyárfaj esetében igen csekély a populációk közötti és a populációkon belüli izoláció. Ez a populációk közötti intenzív génáramlással magyarázható, melyet sem izoláló földrajzi távolság, sem izoláló földrajzi akadály (magashegység) nem korlátoz. Továbbá, bár helyenként mozaikszerű előfordulásban ugyan, de a két faj természetes populációi, populációtöredékei szinte teljes egészében lefedik a Dunántúl területét, ami lehetőséget biztosít a pollen útján történő génáramlás fenntartására.

A 6 SSR markerrel számított diverzitás értékeket összevetettem Lexer és munkatársai által vizsgált három hibridizációs zóna, illetve fajonként három-három referencia populáció egyedeinek összesen 93 genetikai markerrel (köztük 83 SSR markerrel) végzett vizsgálatának eredményeivel (Lexer et al., 2010). A vizsgálat számomra külön érdekesege, hogy magyarországi mintákat is magában foglalt. A két vizsgálat eredményeit a 20. táblázat tartalmazza.

A referencia populációkkal összevetve a dunántúli régió vizsgált rezgő nyár populációja magasabb várt és megfigyelt heterozigóciát mutat, egyedül az átlagos lokuszonkénti allélszám tekintetében marad el azoktól (az olaszországi referencia populációt kivéve). A fehér nyár esetében a dunántúli populáció csak a megfigyelt heterozigócia értéket tekintve mutat magasabb diverzitást a Tisza- és a Ticino-folyó-menti állományokhoz képest. Mindez a dunántúli rezgő nyár populáció magasfokú genetikai változatosságára hívja fel a figyelmet. Ugyanakkor a populációkon belüli differenciáltság a két faj dunántúli populációjának tekintetében a legalacsonyabb, ami figyelembe véve azt a tényt, hogy kiterjedésében a vizsgáltak közül a legnagyobb régióról van szó, különösen érdekes, és a két faj korábban említett mozaikszerű, de a teljes régióra kiterjedő elterjedési területével magyarázható.

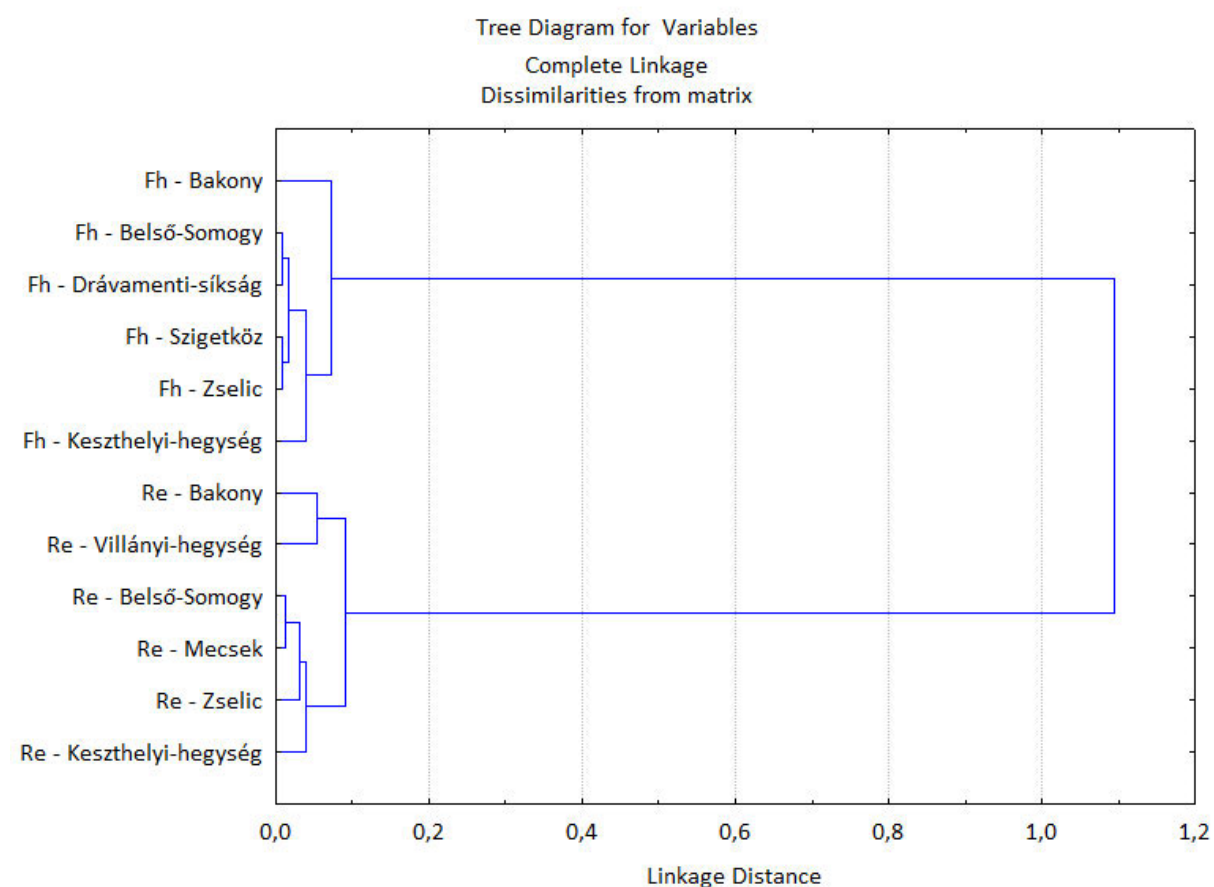
Régió	Populáció	N	Na	Ho	He	F_{IS}
Duna-mente	Hibridizációs zóna (~ 90 km)	192	8,581	0,489	0,596	0,201
	Fehér nyár referencia populáció	48	6,770	0,436	0,508	0,114
	Rezgő nyár ref. populáció (Keleti-Alpok)	48	6,757	0,425	0,533	0,177
Ticino-folyó	Hibridizációs zóna (~ 95 km)	138	6,694	0,517	0,590	0,129
	Fehér nyár referencia populáció	40	4,609	0,355	0,428	0,169
	Rezgő nyár ref. populáció (Alpok)	40	5,021	0,351	0,479	0,197
Tisza-mente	Hibridizációs zóna (~ 85 km)	106	7,331	0,470	0,610	0,227
	Fehér nyár referencia populáció	40	5,074	0,401	0,462	0,151
	Rezgő nyár ref. populáció (Zemplén)	40	5,568	0,450	0,547	0,167
Dunántúl	Fehér nyár	124	3,667	0,403	0,374	-0,058
	Rezgő nyár	136	5,333	0,543	0,557	0,006

20. táblázat: Saját vizsgálati eredmények összevetése ausztriai, olaszországi és magyarországi populációk diverzitás értékeivel, Lexer és munkatársai alapján (Lexer et al., 2010; jelmagyarázat: N – mintaszám, Na – átlagos lokuszonkénti allélszám, Ho – megfigyelt heterozigócia, He – várt heterozigócia, F_{IS} – populáción belüli differenciáltság)

Még markánsabb különbség mutatkozik a populációkon belüli differenciáltság terén az área marginális zónájában elhelyezkedő, széttagolódó populációkkal összevetve. *Populus davidiana* DODE [*Populus tremula* var. *davidiana* (Dode) C. K. SCHNEID.] öt dél-koreai

populációjának 5 SSR markerrel végzett vizsgálata során Lee és munkatársai 0,307-es F_{IS} értéket számítottak, ami már jelentős differenciálódást mutat (Lee et al., 2011). Ugyancsak magas F_{IS} értéket számítottak Hall és munkatársai svédországi 12 rezgő nyár populáció 18 mikroszatellit markerrel végzett elemzése során ($F_{IS}=0,197$; Hall et al., 2007 cit. Lee et al., 2011).

A GenALEx szoftverrel, a korábban ismertetett módon meghatároztam az egyes populációk Nei-féle genetikai távolságát (Nei, 1972). A genetikai távolság mátrixból a Statistica 6.0 programmal dendrogramot szerkesztettem [„Cluster Analysis”, „Joining (tree clustering)” módszer alapján]. A változók (populációk) kiválasztását követően a dendrogram szerkesztéséhez a *Complete linkage* kapcsoltsági módszert választottam, amely módszer két klaszter távolságát a legtávolabbi szomszédok távolsága alapján határozza meg (StatSoft, Inc. 2001c), vagyis a maximális távolságok minimalizására törekszik. Az ezen módszer alapján szerkesztett dendrogramot a 9. ábra szemlélteti, illetve az egyes populációk Nei-féle genetikai távolságát a 10. melléklet tartalmazza.



9. ábra: Nei-féle genetikai távolság mátrix alapján szerkesztett dendrogram [SSR analízis; jelmagyarázat: linkage distance – kapcsolódási (genetikai) távolság]

Az ábra alapján megállapítható, hogy a két faj genetikai távolságához képest az egyes fajokon belüli populációk genetikai távolsága csekély. A fehér nyár esetében a belső-somogyi és a drávamenti, illetve a szigetközi és a zselici populációk mutatnak egymással kis genetikai távolságot. Előbbi páros szorosabb genetikai kapcsolatát magyarázhatja a kis földrajzi távolság, utóbbi esetében ugyanakkor a jelentős távolság mellett a tájegység ökológiai adottságai is markánsan eltérőek. Ezen két populáció, bár alacsony allélfrekvencia értékek jellemzik őket, a várt és megfigyelt heterozigótia tekintetében a legváltozatosabb a

vizsgáltak közül. A keszthelyi-hegységi, valamint a bakonyi populációk a többitől jelentősebb genetikai távolságot mutatnak.

A rezgő nyár esetében sem mutatott a dendrogram egyértelmű kapcsolatot a genetikai és földrajzi távolság között. Ugyan a belső-somogyi, mecseki és zselici populációk genetikai távolsága viszonylag alacsony, ezen csoport villányi-hegységi populációtól számított, illetve a keszthelyi-hegységének a bakonyi populációtól számított genetikai távolsága magas. A Villányi-hegység populációja rendelkezik a legalacsonyabb mintaszámmal, ami részben magyarázhatja azt, hogy a rezgő nyár klaszteren belül külön ágra került, ugyanakkor a bakonyi populáció e fajon belül is megfigyelt szegregált elhelyezkedése már bizonyos szintű izolációra utal, ami ellentmondani látszik az alacsony populációk közötti differenciáltsági értékeknek.

4.2.3. RAPD analízis

A két primerrel végzett RAPD vizsgálat binomiálisan kódolt alléleredményeiből, az SSR vizsgálatnál ismertetethez hasonlóan, a GenAlEx 6.5 szoftver „Frequency” menüjének felhasználásával számítottam az egyes populációk allélfrekvencia, heterozigócia, valamint a Shannon-index, továbbá Nei-féle genetikai távolság értékeit. A meghatározott diverzitás értékeket a 21. táblázat tartalmazza. Tekintettel arra, hogy a vizsgálatokba később bevont mikroszatellit elemzés előzetes eredményei alapján egyes populációk esetében a vizsgált egyedek számát megemeltük, a legnagyobb mintaszámot az SSR elemzések alkalmával vizsgáltuk. Ezért, mint az a táblázatokból is kivehető, az egyes populációként vizsgált egyedszám markerezési technikaként részben eltérő.

	Populáció	N	Na	Ne	I	He
Fehér nyár	Bakony	14,000	0,732	1,121	0,140	0,084
	Belső-Somogy	13,000	1,098	1,205	0,220	0,137
	Drávamenti-síkság	22,000	1,366	1,166	0,213	0,123
	Keszthelyi-hegység	16,000	0,976	1,157	0,174	0,106
	Szigetköz	24,000	0,902	1,166	0,164	0,103
	Zselic	18,000	1,171	1,129	0,166	0,094
Rezgő nyár	Bakony	19,000	1,122	1,148	0,166	0,099
	Belső-Somogy	23,000	1,659	1,250	0,267	0,162
	Keszthelyi-hegység	15,000	1,073	1,168	0,180	0,109
	Mecsek	27,000	1,195	1,156	0,175	0,104
	Villányi-hegység	5,000	0,829	1,222	0,204	0,133
	Zselic	15,000	1,244	1,174	0,197	0,118

21. táblázat: A RAPD vizsgálat során meghatározott diverzitás értékek

Shannon-index értékeik alapján a fehér nyár populációk közül diverzitását tekintve a belső-somogyi és drávamenti populációk emelkednek ki. Közülük is a somogyi állomány emelendő ki külön, mely esetében a vizsgálat tekintetében magasnak számító ($I=0,220$) index értéket a legalacsonyabb mintaszám mellett adta ($N=13$). A bakonyi populációval összevetve, melynek mintaszáma hasonló a somogyihoz, előbbi bizonyult a legkisebb diverzitást hordozónak. A mikroszatellit vizsgálatokkal összevetve a fehér nyár esetében megállapítható, hogy a két markerezési eljárás eredményei hasonlóak. Mindkét esetben a somogyi állomány mutatta a legnagyobb, míg a bakonyi a legkisebb diverzitást.

A rezgő nyár esetében ez az összefüggés már csak részben áll fenn. A Shannon-index értékek alapján mindkét vizsgálat szerint a belső-somogyi populáció a legdiverzebb, ugyanakkor az SSR analízis során magas diverzitást mutató bakonyi populáció RAPD allélmintázata alapján a legalacsonyabb diverzitás értéket adta. Ezzel szemben a villányi-hegységi a RAPD markerek alapján vizsgálat során mutatott a markerezési technika tekintetében magas Shannon-index értéket ($I=0,204$), míg az SSR vizsgálat esetében a legalacsonyabbat ($I=0,923$). Előbbi annak tükrében is kiemelendő, hogy a populáció magas diverzitás értéke kritikusan alacsony mintaszám mellett állt elő.

A két markerezési technika Shannon-index értékei között tapasztalható nagyságbeli különbségek abból adódnak, hogy amíg a mikroszatellit vizsgálat során hat meghatározott lokuszon előforduló alléleket vizsgálunk, tehát több allélt is tudunk egy meghatározott lokuszhoz kötni, addig a RAPD vizsgálat során a genomban véletlenül felszaporított, ezáltal ismeretlen lokusz „eredetű” fragmentek vizsgálata történik meg. Azaz csak a kiválasztott fragmentek jelenlétét, illetve hiányát tudom értékelni, ezáltal az (elméleti) allélszám alacsonyabb lesz, ami kisebb Shannon-index értékeket eredményez. Ebből adódik az is, hogy a program a fragmentek frekvenciájából csak a várt (elméleti) heterozigóciát tudja meghatározni, a megfigyelt heterozigóciát nem.

A 22. táblázatban az egyes populációkban megfigyelt sávok (fragmentek) számát tüntettem fel.

Populáció		N	Megfigyelt fragmentek száma	Ritka fragmentek száma*	Egyedi fragmentek száma
Fehér nyár	Bakony	14	15	0	0
	Belső-Somogy	13	23	0	0
	Drávamenti-síkság	22	28	5	0
	Keszthelyi-hegység	16	20	1	0
	Szigetköz	24	19	2	0
	Zselic	18	24	1	0
Rezgő nyár	Bakony	19	23	1	0
	Belső-Somogy	23	34	9	2
	Keszthelyi-hegység	15	22	0	0
	Mecsek	27	25	7	0
	Villányi-hegység	5	17	0	0
	Zselic	15	26	0	0

22. táblázat: A RAPD vizsgálatok fragmentadatai populációnként (jelmagyarázat: *frekvencia<5%)

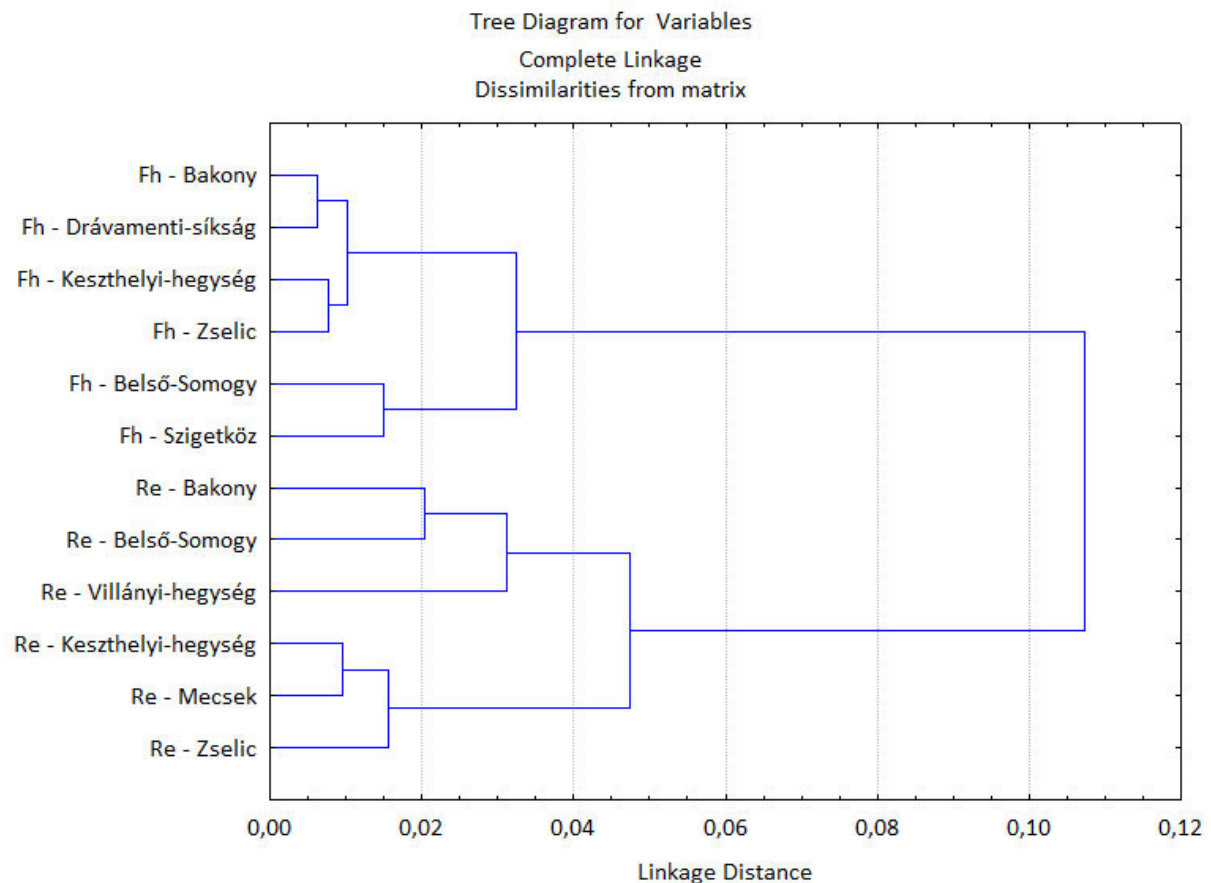
A megfigyelt fragmentek alapján, a diverzitás értékeknek megfelelően, a leggazdagabb populációnak a fehér nyár esetében a drávamenti, a somogyi, valamint a Shannon-index értékek alapján nem várt módon a zselici bizonyult. Utóbbi ellentmondásnak tűnő eredmény a zselici populáció alacsonyabb fragment frekvenciájával magyarázható. Míg belső-somogyi populáció sávfrekvenciájának átlaga 0,203, addig ez az érték a zselici populáció esetében csupán 0,118 volt (ez a különbség egyébként az effektív allélszámban is megmutatkozik). A legkevesebb fragmentet a bakonyi populációban mutattam ki. Egyedi, tehát kizárólag az adott populációban megfigyelt sáv a fehér nyár esetében nem volt kimutatható.

A rezgő nyár esetében a belső-somogyi populáció mutatta a legmagasabb fragmentszámot (34), melyek közül 9 bizonyult ritka fragmentnek. Ezen populáció esetében sikerült egyedül egyedi fragmenteket kimutatni. Ugyancsak magas fragmentszám volt a

zselici és a mecseki populációk esetében is kimutatható, utóbbi esetében a 25 fragment közül 7 frekvenciája volt 5% alatti. A Shannon-index értéke alapján legkevésbé diverz bakonyi állományban 23 fragmentum volt kimutatható.

A Nei-féle genetikai távolság adatokból összeállított mátrix alapján a Statistica 6.0 programmal dendrogramot szerkesztettem az egyes populációk közötti genetikai kapcsolat felmérése céljából, az SSR vizsgálat esetében ismertetett módon. A *Complete Linkage* módszerrel készített dendrogram a 10. ábrán látható.

Az ábra alapján megállapítható, hogy a kiválasztott két RAPD primer alkalmas a két faj egyedeinek elkülönítésére, ugyanakkor a két faj klaszterének kapcsolódási távolságából ítélve jóval kisebb felbontóképességgel bír, mint a 6 primerrel végzett SSR analízis. Akárcsak a mikroszatellit vizsgálat esetében, úgy a RAPD primerekkel sem sikerült kapcsolatot kimutatni az egyes populációk földrajzi és genetikai távolsága között. A legkisebb genetikai távolságot a fehér nyár esetében a bakonyi és a drávamenti, míg a rezgő nyár esetében a keszthelyi-hegységi és a mecseki populációk mutatták.



10. ábra: Nei-féle genetikai távolság mátrix alapján szerkesztett dendrogram [RAPD analízis; jelmagyarázat: linkage distance – kapcsolódási (genetikai) távolság]

4.2.4. PCR-RFLP vizsgálat

A négy kloroplaszt specifikus primerpár – restrikciós endonukleáz kombinációval végzett PCR-RFLP vizsgálat során, a keletkezett allélmintázatok alapján összesen 21 kloroplaszt haplotípust különítettem el. Az egyes haplotípusok elkülönítését saját protokoll alapján végeztem, az elnevezésüket nem igazítottam más szerzők által publikált eredményekhez. A

protokoll bemutatását a 23. táblázat tartalmazza. A kloroplaszt haplotípusok populációnkénti megoszlását, illetve frekvenciáját a 24. táblázat tartalmazza, a haplotípusok leszármazási viszonyait pedig a Network 6.2.1.2 filogenetikai szoftverrel [Fluxus Technology Ltd., Median-joining (MJ) network (Bandelt és mtsai 1999)] készített 11. ábra szemlélteti. A táblázat és a diagram az SSR és a levélmorfológiai vizsgálatok együttes értékelése során kiválasztott, és a PCR-RFLP vizsgálatba bevont 115 fehér nyár, 125 rezgő nyár és 21 szürke nyár adatai alapján készült.

Haplotípus száma	primer-enzim kombináció			
	Pr.1.+Hinf I	Pr.2.+EcoRI	Pr.3.+HhaI+SspI	Pr.4.+Msp I
1.	a	a	a	a
2.	a	a	a	b
3.	a	a	a	c
4.	a	a	b	b
5.	a	a	b	c
6.	a	a	b	d
7.	a	a	c	c
8.	a	a	c	d
9.	a	a	c	e
10.	a	a	c	f
11.	a	a	d	f
12.	a	a	e	g
13.	b	a	b	b
14.	b	b	b	b
15.	b	b	b	c
16.	b	b	c	d
17.	b	c	b	b
18.	b	c	b	c
19.	b	d	b	b
20.	b	d	b	c
21.	b	e	b	b

23. táblázat: Az egyes haplotípusok meghatározása során alkalmazott protokoll (megjegyzés: az egyes betűkódok az adott lokuszon detektált allélek sorszámaként értelmezendők. A sorrend az allélek lokuszonkénti elektroforetikus mobilitását mutatja, ahol az a jelű allélek a legkisebb elektroforetikus mobilitásúak)

A megfigyelt haplotípusok közül 12 bizonyult fehér nyár, míg 9 rezgő nyár eredetűnek. A fehér nyár haplotípusok közül a legnagyobb frekvenciával a H5-ös rendelkezik (N=43), míg 4 haplotípus csak egy egyedben volt kimutatható (H3, H7, H10, H12). A H2-es és a H5-ös haplotípusok széleskörű elterjedéssel bírnak, valamennyi vizsgált populációban megjelentek. A korábban említett ritka haplotípusok, valamint a H11-es haplotípus ugyanakkor csak egy adott populációban voltak jelen (H1 és H7 a Drávamenti-síkságon, a H10-es a Belső-Somogyban, míg a H11-es és H12-es a Szigetközben mintázott populációkban). A kimutatott, illetve a ritka haplotípusok számát figyelembe véve a drávamenti, a somogyi és a szigetközi populációk mutatták a legnagyobb diverzitást a fehér nyár esetében (mindhárom esetben összesen 8, közöttük sorrendben 2, 1 és 2 ritka haplotípus volt megfigyelhető). A vizsgálatba vont 21 szürke nyár közül 11 mutatott fehér nyár eredetű haplotípust (a szürke nyár egyedeket is tartalmazó populációk a 24. táblázatban zöld színnel kerültek kiemelésre).

A rezgő nyár eredetű haplotípusok közül a H17-es emelkedik ki frekvenciáját illetően (N=64). A csoportban ez az egyetlen haplotípus, amelyik valamennyi vizsgált populációban kimutatható volt. Négy haplotípus tekinthető ritkának a rezgő nyár csoportban (H13, H16, H20, H21), közülük három egy, míg egy haplotípus (H21) két populációban volt megfigyelhető. A teljes haplotípus szám, valamint a ritka haplotípusok száma alapján a bakonyi populáció emelkedik ki jelentősen a fajon belül (sorrendben 7, illetve 3-as értékekkel), míg a legalacsonyabb diverzitást a zselici populáció mutatta, összesen két haplotípussal. Ritka alléleket tartalmazott továbbá a Villányi-hegységben, a Mecsekben és a Belső-Somogyban mintázott populáció. A vizsgálatba vont 21 szürke nyár közül 10 tartalmazott rezgő nyár eredetű haplotípust.

	Fehér nyár haplotípusok												Rezgő nyár haplotípusok									
Populáció	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	
Drávamente	1	1	1	2	11		1	4	2													
Villányi-hg.														5			3		4	1		
Mecsek														8		1	15		5			
Zselic	5	1		4	7			2							5		10					
B.-Somogy	1	1		6	7	3		2	2	1				6			27	1	6		1	
Keszthelyi-hg.		3		1	4	6			3					2	7		2	5				
Bakony		7			5	4		1	2				1	5	2		7	1	3		1	
Szigetköz		2		3	9	1		6	1		2	1		1								
Frekvencia	7	15	1	16	43	14	1	15	10	1	2	1	1	27	14	1	64	7	18	1	2	

24. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálatok során megfigyelt haplotípusok egyedszáma populációnként
(jelmagyarázat: a zöld színnel kiemelt számokhoz tartozó haplotípusok voltak a vizsgált szürke nyárakban kimutathatók)

Az egyes lokuszokként megfigyelt allélok alapján a GenAlEx szoftver segítségével kiszámítottam az egyes populációk fontosabb diverzitás értékeit. A vizsgálat eredményeit a 25. táblázat tartalmazza.

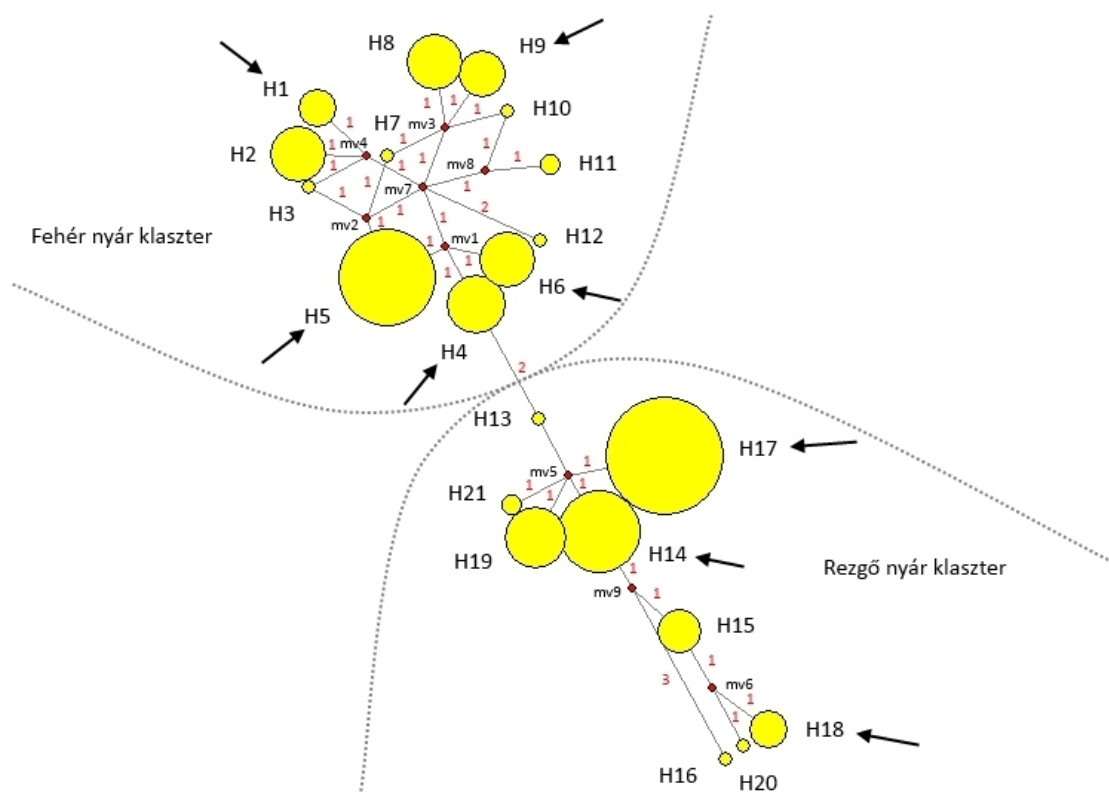
A fehér nyárak esetében, ami az a haplotípus adatokból várható is volt, a szigetközi populáció bizonyult kiemelkedően a legdiverzebbnek (valamennyi paraméter tekintetében). Ezen populációban sikerült továbbá kimutatni egyedül a vizsgált két faj populációi közül egyedi alléleket (számszerint kettőt). Shannon-index és haploid géndiverzitás értékeit figyelembe véve magas diverzitást mutatott még a zselici, a keszthelyi-hegységi és a drávamenti populáció is. A vizsgált paraméterek alapján a bakonyi állomány mutatta a legkisebb genetikai diverzitást.

A rezgő nyárak közül, a haplotípus adatokból szintén várható módon, a bakonyi populáció bizonyult a legdiverzebbnek, ezen populáció esetében számítottam a legmagasabb átlagos lokuszonkénti és effektív allélszámot, Shannon-index és haploid géndiverzitás értéket. A Shannon-index értéket figyelembe véve a villányi-hegységi populáció bizonyult a második legdiverzebbnek, ami figyelembe véve a tényt, hogy a vizsgált rezgő nyár populációk közül ez rendelkezett a legalacsonyabb mintaszámmal, figyelemre méltónak tekinthető. A hasonló egyedszámmal képviselt zselici állomány minden diverzitásmutató tekintetében jelentősen elmarad a villányitól. Külön említést érdemel, hogy a mintaszámát tekintve a legjobban képviselt somogyi populáció alacsony kloroplaszt DNS változatossággal bír a vizsgált DNS szakaszokat figyelembe véve.

Populáció		N	Na	Ne	I	h	N _{PR}
Fehér nyár	Bakony	15,000	2,000	1,746	0,484	0,298	0
	Belső-Somogy	18,000	2,500	1,964	0,562	0,306	0
	Drávamenti-síkság	23,000	2,500	1,747	0,548	0,299	0
	Keszthelyi-hegység	17,000	2,250	1,958	0,562	0,313	0
	Szigetköz	24,000	3,250	2,213	0,694	0,350	2
	Zselic	18,000	2,250	1,979	0,565	0,323	0
Rezgő nyár	Bakony	19,000	2,250	1,636	0,418	0,222	0
	Belső-Somogy	36,000	2,000	1,302	0,277	0,147	0
	Keszthelyi-hegység	16,000	1,500	1,392	0,312	0,217	0
	Mecsek	27,000	2,000	1,428	0,333	0,188	0
	Villányi-hegység	13,000	1,750	1,507	0,336	0,198	0
	Zselic	14,000	1,250	1,212	0,163	0,115	0

25. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálat során meghatározott diverzitás értékek (Jelmagyarázat: N – mintaszám, Na – átlagos lokuszonkénti allélszám, Ne – lokuszonkénti effektív allélszám, I – Shannon-féle információs index, h – haploid géndiverzitás, N_{PR} – egyedi allélek száma)

A 11. ábra az egyes haplotípus leszármazási viszonyait szemlélteti, amely lehetőséget biztosít az egyes fajok filogenetikai múltjának vizsgálatára.



11. ábra: Az egyes haplotípusok leszármazási viszonyait szemléltető Median-joining hálózat [jelmagyarázat: az mv rövidítés (median vectors) által jelzett pontok fel nem fedett, vagy kihalt haplotípusokat jeleznek, a haplotípusok közötti piros számok pedig a valószínűsíthető mutációs lépések számát jelentik; azokat a haplotípusokat, melyekkel a vizsgált szürke nyár egyedek rendelkeztek, nyilakkal jelöltem]

Az egyes fajok filogenetikai értékelése során a következő megállapításokat vettem figyelembe: a központi elhelyezkedésű és nagy frekvenciájú (nagy egyedszámot képviselő)

haplotípusok ősi jellegűek, illetve azok a populációk, melyek ezen haplotípusokat hordozzák, potenciális jégkorszaki refugialis populációknak, vagy ezen populációk közvetlen leszármazottjának tekinthetők (Posada et Crandall, 2001 cit. Fussi et al, 2010). Továbbá a magas haplotípus diverzitás ugyancsak refugialis populációkat, vagy lehetséges posztglaciális terjedési zónák találkozási pontjait jelölheti (Petit et al., 2003 cit. Fussi et al., 2010).

A fehér nyár esetében a legnagyobb frekvenciát mutató H5-ös haplotípus, bár a drávamenti populációban mutatta a legnagyobb egyedszámot, a többi vizsgált populációban is jelentős egyedszámmal képviselte magát. Nagy haplotípus diverzitást mutatott a drávamenti, a belső-somogyi és a szigetközi populáció is, illetve mindháromban mutattam ki egyedi, azaz csak arra a populációra jellemző haplotípust. Ezek a tények, valamint a Median-joining hálózat fehér nyár ágának összetettsége (12 haplotípus és 6 median vektor alkot kis genetikai távolsággal szerteágazó hálózatot) alapján úgy vélem, hogy a dunántúli régiót a fehér nyár több posztglaciális rekolonizációs irányból, de elsősorban a nagyobb folyók mentén, illetve a síkvidéki területeken keresztül népesítette be. Utóbbira utal a domb- és középhegységi populációk alacsonyabb haplotípus diverzitása. Fussi és munkatársai két fő refugialis régiót feltételeznek a fehér nyár esetében Közép-Európában, Olaszország (Appennini-félsziget) és Románia központtal (Fussi et al., 2010). Feltételezhető, hogy az általam vizsgált dunántúli régiót ezen két fő refúgiumból kiindulva rekolonizálta a fehér nyár.

A rezgőnyár esetében a Network 4.6.1.2 filogenetikai szoftver segítségével szerkesztett filogenetikai hálózat jóval egyszerűbb lefutású, a megfigyelt haplotípusokat egy kihalt ősi, vagy fel nem fedett, központi elhelyezkedésű haplotípusból származtatja. A haplotípusoknak a hálózat központi tengelyéhez való csatlakozása és a haplotípusok populációk közötti megoszlása között összefüggést nem találtam. A rezgő nyár esetében tapasztalt filogeográfiai szerkezet hiánya alapján Fussi és munkatársai igazoltnak vélik azt a feltevést, mely szerint a negyedidőszakbeli glaciálisok során a rezgő nyár több, egymással (genetikai) kapcsolatban álló, a jégpáncél közelében elhelyezkedő refúgiumokba húzódott vissza, továbbá feltételezik, hogy ezen refúgiumokból a területek rekolonizációja gyorsan történt meg (Fussi et al., 2010). A dunántúli minták vizsgálati eredményei alapján ugyanakkor feltételezhető, hogy a terület rekolonizációban a Bakonyban, valamint a dél-dunántúli domb- és középhegységi régióban fennmaradt populációk is szerepet játszottak. Ezen refugialis múlt létét látszik alátámasztani a bakonyi populáció magas haplotípus diverzitása, a H17-es haplotípus magas frekvenciája a bakonyi, zselici és mecseki populációkban, valamint a Villányi-hegységben, a Mecsekben és a Bakonyban feltárt ritka haplotípus előfordulás (sorrendben H20, H16, H21).

4.2.5. Hibrid egyedek elemzése Structure 2.1 szoftverrel

A genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok során szürke nyárként azonosított egyedek genetikai összetételét, az általuk reprezentált, a szülőfajoktól származó introgresszió mértékét Structure 2.1 szoftverrel (Pritchard et al., 2000) értékeltem. A szoftver a vizsgált egyedeket lokuszonkénti allélfrekvencia értékeik alapján csoportokba (populációkba) sorolja, párhuzamosan értékelve a csoportok allélfrekvencia értékeit is, meghatározva egyben azt a legvalószínűbb K számú csoportot, melybe a többlokuszos genotípus adatok alapján az egyedek tartozhatnak. A valószínűségi futtatások alapján nyert adatokat a Structure Harvester programmal (Earl et von Holdt, 2011) ábrázoltuk és értékeltük.

A teljes SSR vizsgálati mintasoron (437 egyed) elvégzett elemzés eredményeit a mikroszatellit és levélmorfológiai vizsgálatok által meghatározott szürke nyár egyedek rész-

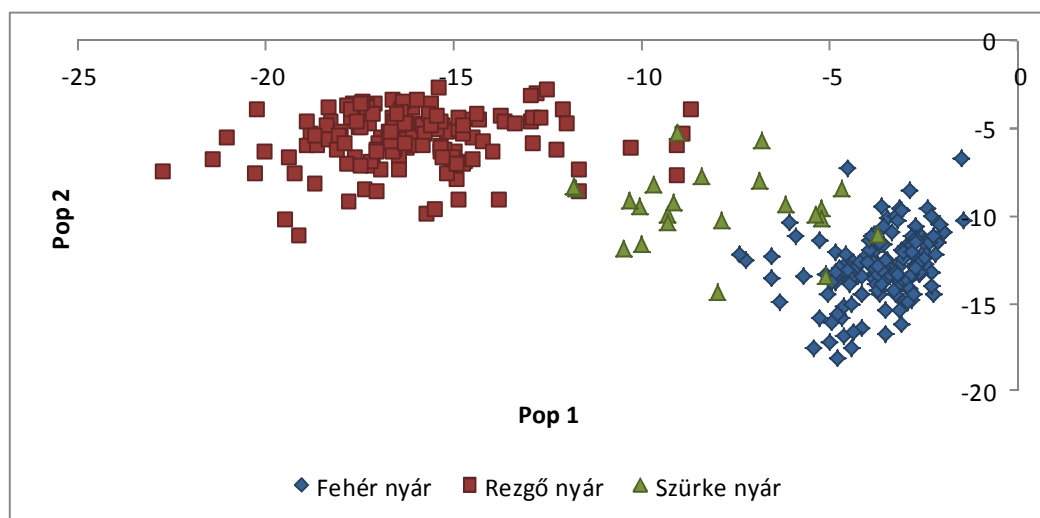
(23 egyed) és közös halmazán (123 egyed) is értékeltem. A két módszerrel szürke nyárként azonosított egyedek populációk közötti megoszlását a 26. táblázat tartalmazza.

Populáció	Genetikai + levélmorfológiai vizsgálat (metszet)	Genetikai + levélmorfológiai vizsgálat (közös halmaz)
Drávamenti-síkság	1	13
Villányi-hegység	0	1
Mecsek	2	9
Közép- és Alsó-Duna-ártér	0	7
Belső-Somogy	2	27
Külső-Somogy	6	9
Zselic	5	12
Bakony	5	20
Keszthelyi-hegység	0	4
Balatoni-medence	0	5
Szigetköz	2	16
Összesen	23	123

26. táblázat: Szürke nyárak megoszlása mintázott populációnként, illetve meghatározási sémánként

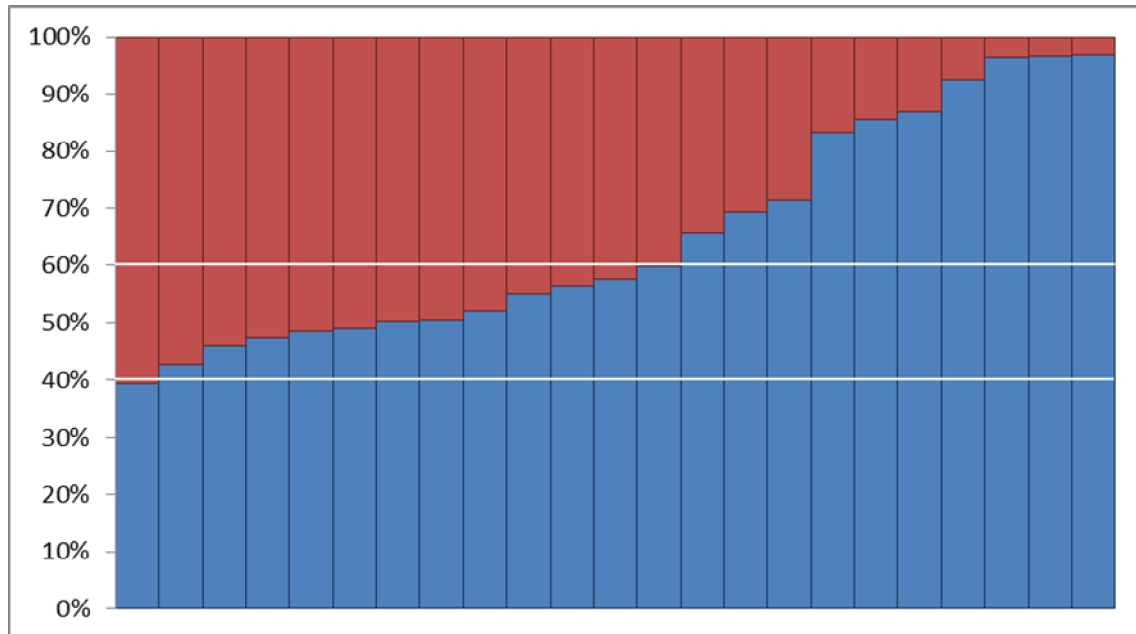
A futtatások eredményeképpen a Structure 2.1 program a teljes mintasorra két csoportot határozott meg, azaz az egyedeket az allélfrekvencia értékeik alapján két csoportba (fajba) sorolhatónak vélte. A szürke nyárak alkotta hibrid csoport tehát ezen vizsgálat alapján sem határozható meg genetikai értelemben a két alapfaj közötti diszkrét halmazként, hanem csupán a két faj közötti átmeneti alakok csoportjaként.

Az allélfrekvencia értékek alapján a program által meghatározott besorolási valószínűségekből következtetni lehet a hibrid egyedek származására (a hibridizáció jellegére). A közel azonos valószínűségi értékek ezek alapján első generációs (F_1 -es) hibrideket jeleznek, míg a valamelyik faj irányába eltolódott arányok visszakereszteződésre utalnak.



12. ábra: 6 SSR markerrel végzett egyedbesorolás grafikus ábrázolása, 23 szürke nyár egyed esetén

A 12. ábra a 6 mikroszatellit markerrel végzett molekuláris genetikai, illetve a levélmorfológiai vizsgálatok során egységesen hibridként azonosított egyedek egyedbesorolási diagramját, a 13. ábrán pedig ezen 23 szürke nyár egyed introgresszálságát szemlélteti.



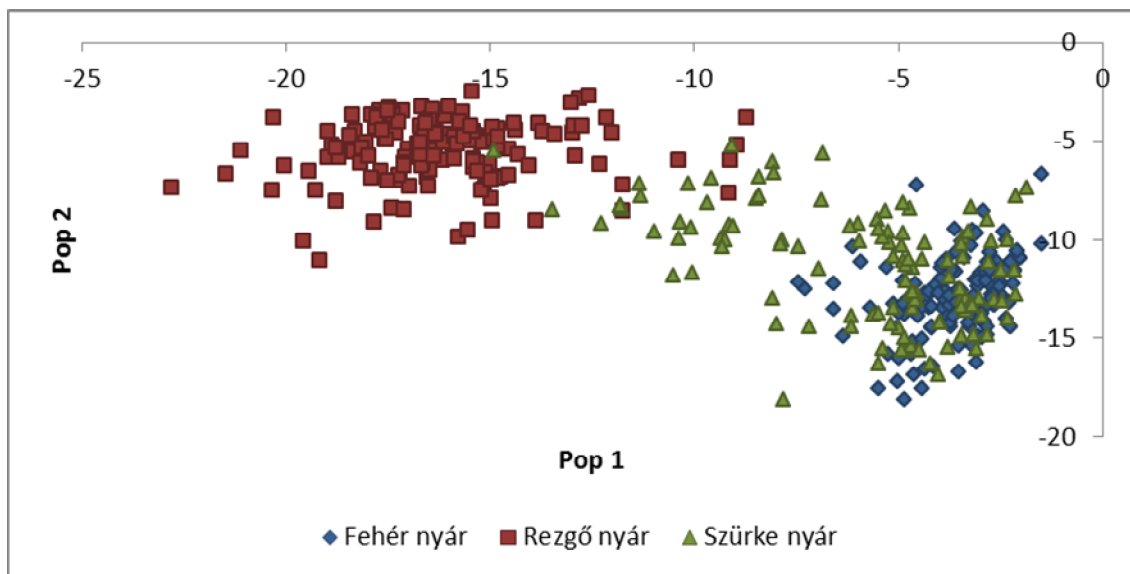
13. ábra: 23 szürke nyár egyed származása 6 SSR marker alapján (jelmagyarázat: kék színnel a fehér nyár, pirossal a rezgő nyár eredet valószínűsége látható, a fehér sáv pedig az első generációs hibridek választott értelmezési tartományát jelöli)

A 12. ábrán jól látható, hogy a két besorolási módszerrel egységesen szürke nyárként azonosított egyedek alapvetően a két faj egyedei által alkotott pontfelhők között helyezkednek el, csupán egy nagyon enyhe fehér nyár felé irányuló intergradálódás tapasztalható. Ezt a 13. ábra valószínűségi értékei is igazolják. Amennyiben a 40 és 60 % közötti valószínűségi határ figyelembe vételével tekintem az utódot első generációs hibridnek, úgy a megfigyelt 23 egyed közül 12 azonosítható F_1 -es szürke nyárként, azaz a szürke nyár egyedek több mint fele első generációs hibrid egyed. A maradék 11 egyed közül 10 a fehér nyár szülővel, míg egy egyed a rezgő nyárral visszakereszteződött hibridként azonosítható.

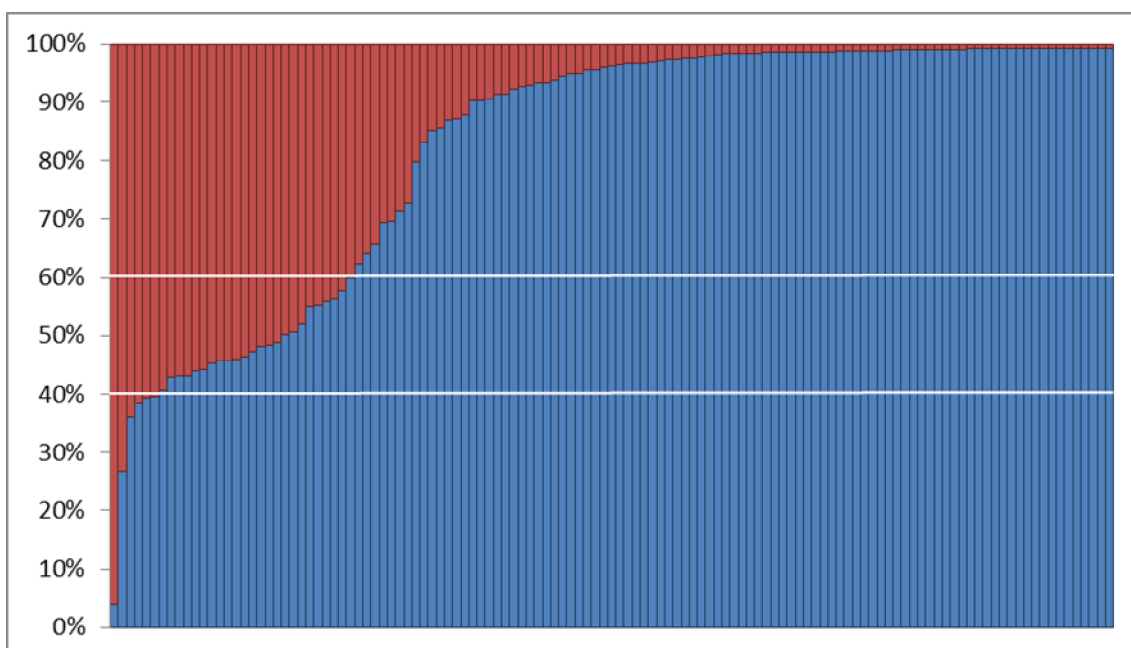
Amennyiben azokat az egyedeket tekintem szürke nyárnak, melyek a genetikai és levélmorfológiai vizsgálat közül bármelyik által szürke nyárként voltak azonosíthatóak, már más eloszlásértékeket kapok. Az ezen elv alapján azonosított összesen 123 szürke nyár egyed egyedbesorolási és hibridizációs ábráját a 14. és 15. ábra szemlélteti.

Az előző csoportosítási módszer eredményeitől eltérően a 123 szürke nyár egyed alkotta pontfelhő már erős fehér nyár irányú intergradálódást mutat a 14. ábrán. A hibridek alkotta halmaz csak csekély mértékben mutat átfedést a rezgő nyárak pontfelhőjével.

Ugyanazon valószínűségi határokkal számolva, 123 szürke nyár egyed esetén az első generációs hibridek száma 24, a fehér nyárral visszakereszteződött hibrideké 93, míg a rezgő nyár szülővel visszakereszteződött hibrideké mindösszesen 6. Ezen vizsgálatok is megerősítik tehát azt a megfigyelést, mely szerint a természetben létrejövő hibrid szürke nyár egyedek elsősorban a fehér nyár szülővel kereszteződnek vissza, és a visszakeresztezések folytán a szürke nyárak a fehér nyár szülőfaj felé intergradálódó hibrid rajt alkotnak (Bartha, 1999).



14. ábra: 6 SSR markerrel végzett egyedbesorolás grafikus ábrázolása, 123 szürke nyár egyed esetén



15. ábra: 123 szürke nyár egyed származása 6 SSR marker alapján (jelmagyarázat: kék színnel a fehér nyár, pirossal a rezgő nyár eredet valószínűsége látható, a fehér sáv pedig az első generációs hibridek választott értelmezési tartományát jelöli)

Amint azt korábban említettem, a genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok során egységesen szürke nyárként azonosított 23 egyed közül 21 esetében rendelkeztem haplotípus adatokkal. Ezek alapján a 21 egyedből 11 fehér nyár eredetű, míg 10 rezgő nyár eredetű haplotípust tartalmazott. Ez az arány a két vizsgálati módszer közös szürke nyár halmazán már egészen más értékeket mutatott: a 123 egyed közül 114 esetében rendelkeztem PCR-RFLP vizsgálati eredményekkel, melyek közül 94 egyed hordozott fehér nyár eredetű és csupán 20 rezgő nyár eredetű kloroplaszt DNS-t. Természetesen utóbbi mintasor esetében a fehér nyár–szürke nyár elkülönítés jóval nagyobb bizonytalanságot

hordoz (ez a 15. ábrán is megfigyelhető, hiszen az egyedek mintegy fele 95%-os valószínűséggel fehér nyárként azonosítható). Nagyon különleges eredményt kaptam ugyanakkor az első generációs, tehát F_1 -es hibridek vizsgálata során. Az első vizsgálati mintasoron (23 egyed) azonosított 12 F_1 -es hibrid közül 9 haplotípusa bizonyult rezgő nyár és csupán három fehér nyár eredetűnek. A kiegészített mintasoron (123 egyed) valószínűsített 24 első generációs hibridek közül 23 esetében rendelkeztem haplotípus adatokkal, melyek közül 12 haplotípusa mutatott rezgő nyár, és 11 fehér nyár eredetet. Az eredményeim arra engednek következtetni, hogy a fehér nyár és a rezgő nyár elterjedési területének átfedési zónáiban közel azonos arányban jönnek létre *alba* $\times$ *tremula* és *tremula* $\times$ *alba* eredetű szürke nyár egyedek. A rezgő nyárral visszakereszteződött, tehát rezgő nyár jellegű szürke nyár egyedek ritka előfordulására több tényező is magyarázatot adhat. Mérsékelheti a rezgő nyár szülővel való visszakereszteződés esélyét egyrészt a Lexer és munkatársai által feltételezett citoplazmatikus inkompabilitás (Lexer et al., 2005), amely a *tremula* $\times$ *alba* eredetű szürke nyárak esetében léphet fel, nehezítve a BC_1 -es nemzedék létrejöttét. A rezgő nyár jellegű szürke nyárak kialakulásának hátterében virágzásbiológiai okok is állnak. A rezgő nyár 2-12 nappal korábban kezd virágozni a fehér nyárnál, és a virágzás korábban is ér véget, így annak az esélye, hogy a létrejött nőivarú szürke nyárakat rezgő nyár pollen termékenyíti meg, kisebb a fehér nyárral való beporzáshoz (visszakereszteződéshez) képest (a két faj virágzási idejének átfedése könnyebben felmelegedő, elsősorban homoki ökotópokban nagyobb, így a szürke nyárak létrejöttének is ezen ökotópokban nagyobb az esélye; Bartha, 1999). Ugyanakkor nem hagyható figyelmen kívül az a Kopecky által tett megfigyelés sem, mely szerint a *canescens* $\times$ *tremula* keresztezésekből felnevelt utódok között a csökkent növekedésű egyedek száma magasabb, a heterózis hatást mutatóké viszont alacsonyabb a *canescens* $\times$ *alba* keresztezés utódnemzedékéhez képest (Kopecky, 1956). Tehát a természetben a rezgő nyárral visszakereszteződött egyedek fennmaradási esélye alacsonyabb a gyorsabb fiatalkori növekedést mutató, fehér nyárral visszakereszteződött szürke nyárakhoz képest. Megemlítené még továbbá, hogy a nyárak kétlaki növények, így egy első generációs nőivarú szürke nyár egyed esetében önbeporzás nem történhet, emiatt önbeporzásból származó hasadó nemzedékek (tehát a két alapfaj jellegzetességeit hordozó szürke nyárak) keletkezésével ilyen módon nem számolhatunk. Természetesen az okok feltárása további vizsgálatokat igényel, amely kiterjedhet a különböző ökotópokban keletkező szürke nyárak kloroplaszt DNS-ének elemzésére is.

5. Eredmények gyakorlati alkalmazhatósága, javaslatok a további kutatásokra

A jelenleg hatályos, az erdészeti szaporítóanyagokról szóló rendelet [110/2003 (X. 21.) FVM rendelet] két származási körzetet határoz meg a fehér nyár esetében a dunántúli régióra, melyek a következő tájegységeket foglalják magukba:

- 1. körzet: Göcseji bükk-táj, Göcseji fenyőrégió, Őrség, Vas-Zalai Hegyhát, Vas Megyei Dombvidék, Írottkőalja, Soproni Hegyvidék, Déli Pannonhát, Soproni Dombvidék, Kemenesalja, Kisalföldi Homok, Szigetköz, Hanság, Vértes, Bakonyalja, Magas-Bakony, Északi Pannonhát,
- 2. körzet: Villányi Hegyvonulat, Mecsek, Zselicség, Baranya-Somogy-Tolnai Hegyhát, Ormánság, Somogyi Homokvidék, Nagyberek és Kis-Balaton.

Tekintettel arra, hogy erdészeti szempontból elsősorban síkvidéki viszonyok között alkalmazott fafajról van szó, illetve, hogy az általam vizsgált fontosabb síkvidéki populációk (Szigetköz, Belső-Somogy, Drávamenti-síkság) közül a somogyi és a drávamenti populációk genetikai távolága a mikroszatellit elemzések alapján alacsonynak bizonyult, a jogszabály által kijelölt körzeteket elfogadhatónak tartom. Ugyanakkor fontosnak tartom megjegyezni, hogy a tudományos alapokra támaszkodó származási körzet kijelöléshez nélkülözhetetlen az általam nem vizsgált fontosabb fehér nyár populációk (pl.: Hanság, Göcsej, Mezőföld, Kemenesalja) által képviselt genetikai diverzitás megismerése is.

A rezgő nyár esetében a jogszabály nem határoz meg konkrét származási körzeteket, így tulajdonképpen az ország teljes területét egy származási körzetként értelmezi. Nyilvánvalóan ezt a fafaj nem meghatározó erdészeti jelentősége indokolta. Bár valóban nem állományalkotó főfafajról van szó a rezgő nyár esetében, számos erdőtársulásban fordul elő értékes elegyfajként, ami miatt fontos lenne az esetében is származási körzeteket elkülöníteni. Tekintettel arra, hogy a mikroszatellit elemzés során magas diverzitást mutató bakonyi, belső-somogyi, zselici és mecseki populációk közül utóbbi három genetikai távolsága kisebb, ezért adataim alapján legalább két származási körzet kialakítása javasolható a rezgő nyár esetében: az Dunántúli-középhegységet, illetve Észak- és Nyugat-Dunántúlt (1. körzet), valamint a középhegységtől délre eső közép- és dél-dunántúli tájegységeket magában foglaló területeken (2. körzet). A rezgő nyár elterjedése szempontjából jelentős nyugat-dunántúli területek genetikai diverzitásának felmérése fontos feladat, ami természetesen az általam javasolt származási körzet kialakítást is módosíthatja.

A molekuláris genetikai vizsgálatok alapján a fehér nyár esetében a belső-somogyi, szigetközi, zselici és drávamenti, a rezgő nyár esetében a belső-somogyi, bakonyi, zselici és mecseki populációk mutatták a legmagasabb genetikai diverzitást, ami ezen populációk genetikai változatosságának megőrzésére, védelmére hívja fel a figyelmet. Célszerűnek tartom törzsfák kijelölését ezen populációkban (akár az általam kijelölt egyedekre alapozva), illetve ezen törzsfák vegetatív utódainak felhasználásával ex situ génmegőrző ültetvények kialakítását.

A *Leuce* nyárak szaporítóanyag termelése hazánkban, egy vegetatív fajtától (*Populus alba* L. cv. Villafranca) eltekintve, szinte kizárólag döntött fáról gyűjtött magokból történő csemetenevelésen alapszik. 1-2 döntött anyafáról több tízezer csemete nevelésére alkalmas mag is gyűjthető, melyet jellemzően egy adott felhasználási körzetben (erdészet) ültetnek el. Így egy akár több ezer hektáros területre is féltestvér utódok kerülnek kiültetésre, melyek származásáról (és fenotípusos értékéről) csak az anyafa által nyerhetők részinformációk. Könnyű beátni, hogy így, főleg amennyiben az anyafa beporzásában döntően csak egy vagy

néhány hímvirág egyed vett részt, nagy kiterjedésű ültetésekhez csupán szűk genetikai változatossággal bíró szaporítóanyag felhasználása történik meg, ami jelentős ökológiai kockázatot hordozhat magában (adaptációs képesség csökkenés). Ezen szaporítóanyag termelési módszer továbbá évről évre csökkenti az ivarérett, méretes nőivirág egyedek számát az adott körzeten belül, ami az egyedszám csökkenés mellett a génáramlás korlátozása által veszélyeztetheti az adott populáció fennmaradását. Ezért mindenképpen célszerűnek tartom magtermesztő ültetvények kialakítását, a vizsgálataim alapján gyakori és ritka alléleket hordozó egyedek felhasználásával. Az ilyen típusú magtermesztő plantázatok egyben természetesen ex situ génmegőrző ültetvényekként is funkcionálnának.

Tekintettel arra, hogy számos értékes fehér nyár és rezgő nyár populáció nem került be a vizsgálatba, fontosnak tartom a populációgenetikai vizsgálatok kiterjesztését ezen területekre. Fehér nyár esetében ez elsősorban a duna-menti ártéri, valamint a hansági és mezőföldi populációkat, a rezgő nyár esetében pedig a Nyugat-dunántúli, a Hanság, valamint a Dunántúli-középhegység nem vizsgált populációit érintené. Természetesen érdemesnek tartom a vizsgálatokat a duna-tisza közí és tiszántúli régió populációira is kiterjeszteni.

Érdemes lenne a populációk genetikai diverzitasát az adaptációs képességet jobban feltáró izoenzim vizsgálatokkal is értékelni. Ehhez jó alapot nyújthat Bartha Dénes és Bordács Sándor fehér nyár populációk egyedein végzett észteráz és peroxidáz enzim vizsgálata (Bartha et Bordács, 1990).

A fehér nyár és a rezgő nyár közötti hibridizációs folyamatok további vizsgálatát is fontos feladatnak tartom. Az SSR és PCR-RFLP vizsgálatokat szeretném kiterjeszteni nagyobb számú szürke nyár egyedre, összekötve Bartha Dénes által is alkalmazott virágzásbiológiai megfigyelésekkel (Bartha, 1999), több, eltérő ökológiai adottságú ökotópban.

Már Koltay György és Kopecky Ferenc is felfigyelt a szintelen gesztű, tehát e tekintetben rezgő nyár jellegű szürke nyárak gazdasági értékére, illetve származásukkal kapcsolatos kutatások fontosságára (Koltay et Kopecky, 1954). Fontos nemesítési feladatnak érzem az ilyen típusú egyedek felkutatását, megőrzését, illetve olyan genetikai markerek szelektálását, melyek e tulajdonsággal kapcsolatosak, tehát lehetővé teszik szürke nyár egyedek akár csemetekorban történő szelektálását ezen tulajdonságra.

6. Összefoglalás

2006 és 2009 között a Dunántúl több, a fehér nyár és a rezgő nyár elterjedése szempontjából fontosabb tájegységeiben mintafa kijelöléseket végeztem, mely során összesen 931 mintafát jelöltem ki. A mintafa kijelölés során a következő erdészeti tájakat érintettem: Drávamenti-síkság, Villányi-helység, Mecsek, Baranyai-dombság, Zselic, Dunamenti-síkság, Külső- és Belső-Somogy, Keszthelyi-hegység, Balatoni-medence, Magas-Bakony, Déli-Bakony, Balaton-felvidék, Szigetköz. A kijelölt természetes eredetű, középídős, idős egyedekről levélmintákat gyűjtöttem genetikai és levélmorfológiai vizsgálatokhoz.

A herbáriumi körülmények között tárolt levélmintákat levélmorfológiai elemzésnek vettem alá, összesen 439 egyed esetében. Az egyedenként digitalizált 3-5 levél elemzését a levél körvonalát elliptikus Fourier leírók alapján értékelő Shape 1.3 programcsomaggal végeztem, mely során a Fourier leírók meghatározásán túl elvégeztem azok főkomponens analízisét is. A főkomponens analízis során az egyedek közötti levélalak varianciára a levélhossz-levélszélesség arányát kifejező főkomponens volt a legmarkánsabb hatással (a variancia 68,25 %-ért volt felelős). A fajok elkülönítésére, illetve a hibrid egyedek azonosítására ugyanakkor sem a két legjelentősebb (PC1, PC2), sem a szignifikancia vizsgálat során valamennyi csoport között szignifikáns differenciát mutató főkomponensek (PC2, PC3) nem bizonyultak alkalmasnak.

A levélalak varianciáját sorrendben legjobban meghatározó 20 főkomponens értékeikkel jellemzet egyedeket a Statistica 6.0 program segítségével diszkriminancia analízisnek vettem alá. A diszkriminancia analízis során kisebb távolságot állapítottam meg a terepi meghatározás során szürke nyárként azonosított egyedek és a fehér nyár egyedek csoportja között, mint a rezgő nyárakkal való összevetésben. A vizsgálat során elvégzett egyedbesorolás 86%-os egyezést mutatott a fehér nyárak, 99%-os egyezést a rezgő nyárak, és csupán 46%-os egyezést a szürke nyárak terepi besorolásával. A diszkriminancia analízis keretében elvégzett kanonikus analízis során egyedenként kanonikus változókat (CV1, CV2) számítottam. A két kanonikus változó értékükkel kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázolt fehér nyár és rezgő nyár egyedek határozott szegregációt mutattak, azaz egymástól jól elhatárolható halmazba tömörültek. Ez alapján megállapítható, hogy az elliptikus Fourier leírókkal jellemzett levélalak alkalmas a két faj elkülönítésére. A terepi meghatározás során szürke nyárként azonosított egyedek a két faj halmazával részben átfedő, de a fehér nyár irányába tömörülő, köztes elhelyezkedésű pontfelhőt alkottak, ami jól korrelál eredetükkel, valamint a korábbi morfológiai vizsgálatok során tett introgressziós megfigyelésekkel.

A leggyűjtött egyedek fajmeghatározását a levélmorfológiai vizsgálatok mellett 6 mikroszatellit markerrel végzett genetikai vizsgálattal is elvégeztem. Az egyedek alléladatai alapján GenAlEx 6.5 programmal végzett egyedbesorolás 75%-os egyezést mutatott a terepi meghatározás, illetve 77%-os egyezést a diszkriminancia analízis eredményeivel. Mindkét összevetés a fehér nyár - szürke nyár besorolás bizonytalanságát bizonyította, ezért a populációgenetikai vizsgálatokba azon egyedeket vontam be, melyek esetében a két vizsgálati módszer azonos eredményt adott. Ezek alapján összesen 160 fehér nyár, 152 rezgő nyár és 23 szürke nyár egyedet jelöltem ki a további vizsgálatokra.

A hat markerrel végzett SSR vizsgálatok során megállapított genetikai diverzitás értékeket figyelembe véve a fehér nyárak közül a belső-somogyi, a zselici és a szigetközi, a rezgő nyárak közül a bakonyi, a zselici és a belső-somogyi populációk mutatták a legmagasabb genetikai diverzitást. A két fajra megállapított F és G statisztika értékek

ugyanakkor külföldi vizsgálatok eredményeivel összevetve is alacsony populációkon belüli és populációk közötti genetikai diverzitást mutattak, ami a két faj dunántúli mozaikszerű, de szinte a teljes régiót lefedő elterjedési mintázatával, illetve az ebből fakadó erős populációk közötti génáramlással magyarázható. A populációk közötti Nei-féle genetikai távolság alapján a Statistica 6.0 programmal szerkesztett *Complete linkage* dendrogram csak részben mutatott kapcsolatot az egyes populációk genetikai és földrajzi távolsága között.

A tesztvizsgálatok során a fajok elkülönítésére alkalmasnak talált két polimorf RAPD primerrel 107 fehér nyár és 104 rezgő nyár egyeden végeztem elemzést. Az egyes populációk meghatározott genetikai diverzitás és fragment adatai alapján a fehér nyár esetében a belső-somogyi, a drávamenti és zselici, a rezgő nyár tekintetében pedig a belső-somogyi, a villányi-hegységi, a zselici és a mecseki populációk mutatták a legnagyobb genetikai diverzitást. Egyedi fragmenteket kizárólag a belső-somogyi rezgő nyár populáció esetében találtam. A Nei-féle genetikai távolság mátrix alapján szerkesztett dendrogramon az egyes populációk genetikai és földrajzi távolsága között nem volt kapcsolat kimutatható.

A fehér és rezgő nyár populációk kloroplaszt DNS diverzitását, illetve a fajok filogenetikai jellemzőit PCR-RFLP vizsgálattal elemeztem. A négy kloroplaszt specifikus primerpár-restrikciós endonukleáz kombinációban végzett vizsgálat során nyert alléladatok alapján a fehér nyárak között 12, a rezgő nyárak esetében 9 haplotípust mutattam ki. A haplotípus adatok és a meghatározott genetikai diverziás mutatók alapján a fehér nyárak között a szigetközi, a zselici, a keszthelyi-hegységi és a drávamenti, a rezgő nyárak között a bakonyi és a villányi-hegységi populációk mutatták a legnagyobb diverzitást. Az alléladatokból a Network 4.6.1.2 filogenetikai szoftver segítségével szerkesztett Median-joining hálózat összetett kapcsolatot mutatott ki a megfigyelt fehér nyár haplotípusok között. Ez alapján, valamint az egyes populációk haplotípus adataiból kiindulva feltételezhető, hogy a Dunántúlt a fehér nyár az utolsó glaciális követően több rekolonizációs irányból, elsősorban a nagyobb folyókat követve, illetve a síkvidéki régiókon keresztül népesítette be. A rezgő nyár esetében markáns tendencia nem volt megállapítható, ugyanakkor a bakonyi, a zselici és a mecseki populációk haplotípus adataiból kiindulva feltételezhetőnek tartom, hogy a dunántúli régió rekolonizálásában az említett térségekben, mint kisebb refugiumokban fennmaradt populációk vettek elsődlegesen részt. A 21 vizsgált szürke nyár egyed közül 11-ben fehér nyár, 10-ben pedig rezgő nyár eredetű kloroplaszt haplotípus volt kimutatható.

A genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok során szürke nyárként azonosított egyedek genetikai származását Structure 2.1 szoftverrel elemeztem. Az elemzést kiterjesztettem az egyedbesoroláshoz választott két módszer eredményeinek metsző (23 egyed) és közös halmazára (123 egyed). A program a teljes vizsgált mintaszám (437 egyed) alapján két csoport létezését feltételezte, tehát az egyedek allélfrekvencia értékeik alapján a két faj között genetikai értelemben létező köztes diszkrét csoportot nem valószínűsített. Ez alátámasztja a szürke nyár egyedekkel kapcsolatban végzett korábbi kutatások és megfigyelések eredményeit, mely szerint a hibrid szürke nyár egyedek morfológiai és genetikai értelemben is a két alapfaj közötti átmeneti alakoknak tekinthetők. Az egyes egyedek meghatározott csoportokhoz való tartozási valószínűségéből következtetett introgresszálsági foka alapján vizsgálati eredményeim is igazolják azt a megfigyelést, mely szerint a természetben létrejövő első generációs hibrid szürke nyárak elsősorban a fehér nyár szülővel kereszteződnek vissza, ami a fehér nyár szülő felé intergradálódó hibrid raj létrejöttét segíti elő. A Structure 2.1 szoftver segítségével első generációs hibridként azonosított szürke nyár egyedek PCR-RFLP markerezési eredményeinek elemzése során mindkét azonosítási adatsoron magas arányú rezgő nyár eredetű haplotípust találtam az

egyedek között. Ez arra enged következtetni, hogy a természetben közel azonos arányban keletkeznek anyai úton fehér nyár és rezgő nyár eredetű szürke nyár egyedek, azaz a két kereszteződési irány valószínűsége közel azonos. Az első generációs szürke nyár egyedek rezgő nyár szülővel való visszakereszteződésének, illetve a keletkező rezgő nyár jellegű szürke nyárak fennmaradásának esélyét több tényező akár együttes fellépése is mérsékelheti (citoplazmatikus inkompabilitás, virágzásbiológiai okok, utódpopuláció csökkent növekedési erélye).

7. Tézisek

1. Vizsgálataim alapján az elliptikus Fourier leírók használatán alapuló levélalak elemés alkalmas a fehér és a rezgő nyár egyedeinek elkülönítésére.
2. A mikroszatellit vizsgálatok alapján a két faj populációkon belüli és populációk közötti differenciáltsága nagyon csekély, ami jelentős génáramlásra utal az egyes populációk között.
3. A sejtmagi DNS két markerezési eljárással történt elemzése során nem sikerült kapcsolatot kimutatnom a két faj egyes populációinak földrajzi és genetikai távolsága között.
4. A kloroplaszt DNS vizsgálata során feltárt haplotípus diverzitás értékek és haplotípus leszármazási viszonyok eltérő filogenetikai utat valószínűsítene a két faj esetében a Dunántúlt érintő posztglaciális rekolonizációjuk tekintetében.
5. A szürke nyárként azonosított egyedek introgresszió vizsgálata során magasabb szintű fehér nyár irányából való introgressziót figyeltem meg az egyedekben, ami alátámasztja a korábbi terepi megfigyelések eredményeit, mely szerint a természetben kialakuló első generációs szürke nyárak nagyobb arányban kereszteződnek vissza a fehér nyár szülővel.
6. Az első generációs szürke nyárak között magas arányban azonosítottam rezgő nyár eredetű kloroplaszt DNS-t hordozókat, ami alapján feltételezhető, hogy a hibridizációs zónákban közel azonos arányban keletkeznek *alba* × *tremula* és *tremula* × *alba* származású hibridek.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálás köszönetemet kifejezni

a Duna-Dráva Nemzeti Park, a Mecseki Erdészeti ZRt., a SEFAG Erdészeti és Faipari ZRt., a Bakonyerdő Erdészeti és Faipari ZRt., valamint a Kisalföldi Erdőgazdaság ZRt. munkatársainak a terepi mintagyűjtés során nyújtott segítségükért,

Takács Roland és Toldi Valter kollégáimnak a mintafa-kijelölés és levélminta-gyűjtés során tanúsított álhatatosságukért és barátságukért,

Dr. Cseke Klára kolléganőmnek a genetikai vizsgálatok levezényléséért, alkalmasint végzéséért, valamint az adatok kiértékeléséhez és értelmezéséhez nyújtott tanácsaiért,

Rumi Józsefné és Tölgyesi Árpádné kolleganőimnek, akik lehetővé tették, hogy értékeljek és értelmezzek adatokat,

Dr. Berthold Heinze-ének a PCR-RFLP markerezési technika elsajátításához nyújtott segítségéért,

Dr. Borovics Attila megbízott intézetigazgató úrnak kitartó támogatásáért és tanácsaiért,

Dr. habil. Bartha Dénes professzor úrnak és Dr. Bordács Sándornak osztályvezető úrnak a munkahelyi vita során a munkámról adott őszinte véleményükért,

Prof. Dr. Mátyás Csabának, témavezetőmnek, az időért és figyelemért, amit nekem szentelt,

Tompa Mónikának a publikációk beszerzésében tett fáradozásaiért,

valamennyi meg nem nevezett kolléganőmnek és kollégámnak, akik segítettek munkámat,

az OTKA-ának, aki a kutatás pénzügyi keretének biztosításához járult hozzá,

Menyasszonyomnak, Édesanyámnak és Húgomnak, akik bölcs türelemmel és megértéssel viseltettek irántam az elmúlt hónapokban,

és végül Édesapámnak, akinek disszertációmaj ajánlom!

9. Irodalomjegyzék

1. Albutra, Q. B., Torres, M. A. J., Demayo, C. G. (2012): Shapes of mandibles of white stemborer *Scirpophaga innotata* (Walker, 1863) larvae associated with different rice varieties. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, 5(1): 45-58.
2. Anderson, E. C., Thompson, E. A. (2002): A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data. Genetics, 160: 1217-1229.
3. Bandelt, H. J., Forster, P., Roehel, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16: 37-48.
4. Barrett, J. W., Rajora, O. P., Yeh, F. C. H., Dancik, B. P. (1993): Mitochondrial DNA variation and genetic relationships of *Populus* species. Genome, 36: 87-93.
5. Bartha D., Bordács S. (1990): Elektrophoretische Untersuchungen an Weißpappel-Populationen in Ungarn. Die Holzzucht, 44: 23-25.
6. Bartha D. (2005): Ist die Graupappel eine eigene Art? Taxonomische Untersuchungen an den Populationen der Weisspappel (*Populus alba* L.). – Allgemeine Forst Zeitschrift/Der Wald 60: 252–254.
7. Bartha D. (1991b): Bastardierung und Introgression bei den Weisspappelpopulationen (*Populus alba* L.) in Ungarn. Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft, 80: 177-180.
8. Bartha D. (1991a): Gibt es Bodenrassen bei der Weisspappel? - Allgemeine Forst Zeischrift 46: 877.
9. Bartha D. (1999): Phänologische und taxonomische Untersuchungen bei den einheimischen Populationen der Weisspappel (*Populus alba* L.). - Publ. Univ. Horti. Industriaeque Alimentariae 59: 85-93.
10. Bartha D. (2004): A magyarországi nyár (*Populus* L.) taxonok határozókulcsa és rövid jellemzése. Flora Pannonica 2(2): 93.
11. Bisztray Gy. (2001): A genom összetétele. In: Velich I. (ed.) (2001): Növénygenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 425.
12. Bordács S. (2002): A DNS-polimorfizmus elemzéséhez alkalmazott módszerek. In: Mátyás Cs. (ed.) (2002): Erdészeti-természetvédelmi genetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 53.
13. Bordács S., Borovics A., Bach I. (2002): Genetic diversity of natural populations and gene bank of Black Poplar in Hungary. In: van Dam, B. C., Bordács S. (ed.) (2002): Genetic

- diversity in river populations of European Black Poplar – Implications for riparian ecosystem management. Csiszár Nyomda, Budapest. p. 93-106.
14. Borovics A., Gergácz J., Bordács S., Bach I., Bagaméry G., Gabnai E. (1999): A fekete nyár génmegőrzésében elért eredmények. Erdészeti Kutatások, 89: 135-148.
 15. Börcsök Z. (2009): Magyarországi mezei szil (*Ulmus minor* MILL. sensu lato) levélmorfológiai vizsgálata. Doktori (PhD) értekezés. Nyugat-magyarországi Egyetem, Roth Gyula Erdészeti és Vadgazdálkodási Tudományok Doktori Iskola, Sopron. p. 91-93.
 16. Breen, A. L., Glenn, E., Yeager, A., Olson, M. S. (2009): Nucleotide diversity among natural populations of a North American poplar (*Populus balsamifera*, Salicaceae). New Phytologist, 182: 763-773.
 17. Brooks, L. D. (2003): SNPs: Why Do We Care? In: Kwok, P.-Y. (ed.) (2003): Single Nucleotide Polymorphisms – Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 212: 1-14.
 18. Brown, A. H. D. (1979): Enzyme polymorphism in plant populations. Theoretical Population Biology, 15(1): 1-42.
 19. Brundu, G., Lupi, R., Zapelli, I., Fossati, T., Patrignani, G., Camarda, I., Sala, F., Castiglione, S. (2008): The Origin of Clonal Diversity and Structure of *Populus alba* in Sardinia: Evidence from Nuclear and Plastide Microsatellite Markers. Annals of Botany, 102: 997-1006.
 20. Carlo, J. M., Barbeitos, M. S., Lasker, H. R. (2011): Quantifying Complex Shapes: Elliptical Fourier Analysis of Octocoral Sclerites. Biology Bulletin, 220: 224-237.
 21. Cervera, M. T., Villar, M., Faivre-Rampant, P., Goué, M.-C., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1997): Application of Molecular Marker Technologies in Populus Breeding. In: Klopfenstein, N. B., Chun, Y. W., Kim, M.-S., Ahuja, M. R. (ed) (1997): Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of Populus. Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Fort Collins, Colorado. p. 101-115.
 22. Cervera, M. T., Strome, V., Ivens, B., Gusmão, J., Liu, B. H., Hostyn, V., Van Slycken, J., Van Montagu, M., Boerjan, W. (2001): Dense Genetic Linkage Maps of Three Populus Species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers. Genetics, 158: 787-809.
 23. Cervera, M. T., Strome, V., Soto, A., Ivens, B., Van Montagu, M., Rajora, O. P., Boerjan, W. (2005): Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 111: 1440-1456.

24. Chitwood., D. H., Headland, L. R., Kumar, R., Peng, J., Maloof, J. N., Sinha, N. R. (2012a): The Developmental Trajectory of Leaflet Morphology in Wild Tomato Species. *Plant Physiology*, 158: 1230-1240.
25. Chitwood., D. H., Headland, L. R., Ranjan, A., Martinez, C. C., Braybrook, S. A., Koenig, D. P., Kuhlemeier, C., Smith, R. S., Sinha, N. R. (2012b): Leaf Asymmetry as a Developmental Constraint Imposed by Auxin-Dependent Phyllotactic Patterning. *The Plan Cell*, 24: 2318-2327.
26. Chitwood., D. H., Kumar, R., Headland, L. R., Ranjan, A., Covington, M. F., Ichihashi, Y., Fulop, D., Jiménez-Gómez, J. M., Peng, J., Maloof, J. N., Sinha, N. R. (2013): A Quantitative Genetic Basis for Leaf Morphology in a Set of Precisely Defined Tomato Introgression Lines. *The Plant Cell*, 25: 2465-2481.
27. Cottrell, J. E., Krystufek, V., Tabbener, H. E., Milner, A. D., Connolly, T., Sing, L., Fluch, S., Burg, K., Lefèvre, F., Achard, P., Bordács S., Gebhardt, K., Vornam, B., Smulders, M. J. M., Vanden Broeck, A. H., Van Slycken, J., Storme, V., Boerjan, W., Castiglione, S., Fossati, T., Alba, N., Agúndez, D., Maestro, C., Notivol, E., Bovenschen, J., van Dam, B. C. (2005): Postglacial migration of *Populus nigra* L.: lessons learnt from chloroplast DNA. *Forest Ecology and Management*, 219: 293-312.
28. Culot, A., Vekemans, X., Lefebvre C., Homes, J. (1995): Taxonomic identification and genetic structure of populations of *Populus tremula* L., *P. alba* L. and *P. × canescens* (Ait.) Sm. complex using morphological and electrophoretic markers. In: Baradat, P., Adams, W. T., Müller-Strack, G. (Ed.) (1995): *Population genetics and genetic conservation of forest trees*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, p. 113-119.
29. Dayanandan, S., Rajora, O. P., Bawa, K. S. (1998): Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 950-956.
30. DiFazio, S. P., Slavov, G. T., Joshi, C. P. (2011): *Populus*: A Premier Pioneer System for Plant Genomics. In: Joshi, C. P., DiFazio, S. P., Kole, C. (ed) (2011): *Genetics, Genomics and Breeding of Poplar*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire. p. 1-28.
31. dotPDN LLC (2013): Paint.NET v3.5.11 free image and photo editing software. Web: <http://www.getpaint.net/>
32. Drost, D. R., Benedict, C. I., Novaes, E., Kirst, M. (2011): *Populus* Genomic Resources. In: Joshi, C. P., DiFazio, S. P., Kole, C. (ed) (2011): *Genetics, Genomics and Breeding of Poplar*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire. p. 34-36.
33. Earl, D. A., von Holdt, B., M. (2012): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359-361.

34. Eckenwalder, J. E. (1996): Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler, R. F., Bradshaw, H. D., Heilman, P. E., Hinckley, T. M. (ed.) (1996): Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Kanada. p. 7-32.
35. Farmer M. M., Barnes, B. V. (1978): Morphological variation of families of trembling aspen in southeastern Michigan. Michigan Botanist, 17: 141-153.
36. Fossati, T., Patrignani, G., Zapelli, I., Sabatti, M., Sala, F., Castiglione, S. (2004): Development of molecular markers to assess the level of introgression to *Populus tremula* into *P. alba* natural populations. Plant Breeding, 123: 382-385.
37. Fossati, T., Zapelli, I., Bisoffi, S., Micheletti, A., Vietto, L., Sala, F., Castiglione, S. (2005): Genetic relationships and clonal identity in a collection of commercially relevant poplar cultivars assessed by AFLP and SSR. Tree Genetics & Genomes, 1: 11-19.
38. Freeman, H. (1974): Computer processing of line drawing images. ACM Computing Surveys, 6: 57-97.
39. Furuta, N., Ninomiya, S., Takahashi, N., Ohmori, H., Ukai, Y. (1995): Quantitative Evaluation of Soybean (*Glycine max* L. MERR.) Leaflet Shape by Principal Component Scores Based on Elliptic Fourier Descriptors. Breeding Science, 45: 315-320.
40. Fussi, B., Lexer, C., Heinze, B. (2010): Phylogeography of *Populus alba* (L.) and *Populus tremula* (L.) in Central Europe: secondary contact and hybridisation during recolonisation from disconnected refugia. Tree Genetics & Genomes, 6(3): 439-450.
41. Ge, D., Chesters, D., Gómez-Zurita, J., Zhang, L., Yang, X., Vogler, A. P. (2011): Anti-predator defence drives parallel morphological evolution in flea beetles. Proceedings of the Royal Society B, 278: 2133-2141.
42. Gencsi L., Vancsura R. (1997): Dendrológia – Erdészeti Növénytan II. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 340.
43. Glaubitz, J., Moran, G. (2000): Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In: Young, A., Boshier, D., Boyle, T. (ed.) (2000): Forest conservation genetics - Principles and practice. Csiro Publishing, Collingwood, Australia. p. 40-49.
44. Gombocz E. (1926): Keresztezési kísérletek *Populus alba* L. és *Populus tremula* L. között. Magyar Botanikai Lapok, 25: 111-116.
45. Gombocz E. (1928): Untersuchungen über ungarischen Pappelarten. Botanikai Közlemények, 25: 2-20.

46. Gómez, A., Manzanera, J. A., Aguiriano, E., Grau, J. M., Bueno, M. A. (2003): SSR Markers for Monitoring an *in vitro* Core Collection of *Populus tremula*. *Silvae Genetica*, 52: 224-229.
47. González-Martínez, S. C., Krutovsky, K. V., Neale, D. B. (2006): Forest-tree population genomics and adaptive evolution. *New Phytologist*, 170: 227-238.
48. Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G., Petit, R. J. (2001): Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*, 1: 345-349.
49. H. Nagy A. (1999): Az izoenzimek fogalma, keletkezése, genetikája. In: Hajósne Novák M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p. 25.
50. Hajósne Novák M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p. 39-61.
51. Hall, D., Luquez, V., Garcia, V. M., Onge, K. R. S., Jasson, S., Ingvarson, P. K. (2007): Adaptive population differentiation in phenology across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula* L.): A comparison of neutral markers, candidate genes and phenotypic traits. *Evolution*, 61: 2849-2860.
52. Hamrick, J. L., Godt, M. W. J., Sherman-Broyles, S. L. (1992): Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In: Adams, W. T., Strauss, S. H., Copes, D. L. (ed.) (1992): Population Genetics of Forest Trees. Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees. Corvallis, Oregon, U.S.A., 1990. július 31. – augusztus 2. p. 95-124.
53. Hardy, O. J., Vekemans, X. (1999): Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83: 145-154.
54. Hedrick, P. W. (2011): Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, United States. p. 103-105.
55. Heinze, B. (2005): The chloroplast PCR primer database: tools for comprehensive phylogeographic analysis of a whole genome. Poszter, International Botany Congress, 2005. július 17-23., Bécs, Ausztria
56. Heinze, B. (2007): A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods*, 3:4.
57. Hiraoka, Y., Kuramoto, N. (2004): Identification of *Rhus succedanea* L. Cultivars Using Elliptic Fourier Descriptors Based on Fruit Shape. *Silvae Genetica*, 53(5-6): 221-226).

58. Imbert, E., Lefèvre, F. (2003): Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal of Ecology*, 91: 447-456.
59. Ingvarsson, P. K., Garcia, M. V., Hall, D., Luquez, V., Jansson, S. (2006): Clial Variation in *phyB2*, a Candidate Gene for Day-Lenght-Induced Growth Cessation and Bud Set, Across a Latitudinal Gradient in European Aspen (*Populus tremula*). *Genetics*, 172: 1845-1853.
60. Ingvarsson, P. K., Garcia, M. V., Luquez, V., Hall, D., Jansson, S. (2008): Nucleitod Polymorphism and Phenotypic Associations Within and Around the *phytochrome B2* Locus in European Aspen (*Populus tremula*, Salicaceae). *Genetics*, 178: 2217-2226.
61. Ishii, K., Iwata, H., Oshika, T. (2011): Quantitative Evaluation of Changes in Eyeball Shape in Emmetropization and Myopic Changes Based on Elliptic Fourier Descriptors. *Investigate Ophthalmology & Visual Science*. 52(12): 8585-8591.
62. Iwata, H., Niikura, S., Matsuura, S., Takano, Y., Ukai, Y. (1998): Evaluation of variation of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on image analysis using elliptic Fourier descriptors. *Euphytica*, 102: 143-149.
63. Iwata, H., Nesumi, H., Ninomiya, S., Takano, Y., Ukai, Y. (2002a): Diallel Analysis of Leaf Shape Variation of Citrus Varieties Based on Elliptic Fourier Descriptors. *Breeding Science*, 52: 89-94.
64. Iwata, H., Ukai, Y. (2002b): SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity*, 93: 384-385
65. Iwata, H., Niikura, S., Matsuura, S., Takano, Y., Ukai, Y. (2004a): Genetic Control of Root Shape at Different Growth Stages in Radish (*Raphanus sativus* L.). *Breeding Science*, 54: 117-124.
66. Iwata, H., Niikura, S., Matsuura, S., Takano, Y., Ukai, Y. (2004b): Interaction between Genetic Effects and Soil Type in Diallel Analysis of Root Shape and Size in Japanese Radish (*Raphanus sativus* L.). *Breeding Science*, 54: 313-318.
67. Iwata, H. (2006): Shape Ver. 1.3. A Software Package for Quantitative Evaluation of Biological Shapes Based on elliptic Forier descriptors. Program manual. <http://lbm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/~iwata/shape/manual.pdf>
68. Kanaga, M. K., Ryel, R. J., Mock, K. E., Pfreder, M. E. (2008): Quantitative genetic variation in morphological and physiological traits within quaking aspen (*Populus tremuloides*) population. *Canadian Journal of Forest Research*, 38: 1690-1694.
69. Keim, P., Paige, K. N., Whitham, T. G., Lark, K. G. (1989): Genetic Analysis of Interspecific Hybrid Swarm of *Populus*: Occurence of Unidirectional Introgression. *Genetics*, 123: 557-565.

70. Kiss J., Kondrák M., Törjék O., Kiss E., Gyulai G., Mázik-Tökei K., Heszky L. E. (2001): Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica*, 118: 213-221.
71. Koltay Gy., Kopecky F. (1954): Óshonos nyáraink leromlott öröklöttségének megjavítása. *Erdészeti Kutatások*, 1(2): 65-86.
72. Kopecky F. (1956): A szürkenyár telepítésének genetikai kérdései. *Az erdő*, 5(1): 23-29.
73. Kuhl, F. P., Giardina, C. R. (1982): Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. *Computer Graphics and Image Processing*, 18: 236-258.
74. Kwok, P.-Y., Duan, S. (2003): SNP Discovery by Direct DNA Sequencing. In: Kwok, P.-Y. (ed.) (2003): *Single Nucleotide Polymorphisms – Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, 212: 71-84.
75. Laurie, C. C., True J. R., Liu, J., Mercer, J. M. (1997): An Introgression Analysis of Quantitative Trait Loci That Contribute to a Morphological Difference Between *Drosophyla simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics*, 145: 339-348.
76. Lee, K. M., Kim, Y. Y., Hyun, J. O. (2011): Genetic variation in populations of *Populus davidiana* Dode based on microsatellite marker analysis. *Genes & Genomics*, 33: 163-171.
77. Lexer, C., Fay, M. F., Joseph, J. A., Nica, M.-S., Heinze, B. (2005): Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular Ecology*, 14: 1045-1057.
78. Lexer, C., Buerkle, C. A., Joseph, J. A., Heinze, B., Fay, M. F. (2007): Admixture in European *Populus* hybrid zones makes feasible the mapping of loci that contribute to reproductive isolation and trait differences. *Heredity*, 98: 74-84.
79. Lexer, C., Joseph, J., van Loo, M., Prenner, G., Heinze, B., Chase, M. W., Kirkup, D. (2009): The use of digital image-based morphometrics to study the phenotypic mosaic in taxa with porous genomes. *TAXON*, 58(2): 5-20.
80. Lexer, C., Joseph, J. A., van Loo, M., Barbará, T., Heinze, B., Bartha D., Castiglione, S., Fay, M. F., Buerkle, C. A. (2010): Genomic Admixture Analysis in European *Populus* spp. Reveals Unexpected Patterns of Reproductive Isolation and Mating. *Genetics*, 186: 699-712.

81. Lin, D. C., Hubbes, M., Zsuffa, L. (1997): Differentiation of Poplar Clones Using Random Amplified Polimorphic DNA Fingerprinting. In: Klopfenstein, N. B., Chun, Y. W., Kim, M.-S., Ahuja, M. R. (ed.) (1997): Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of Populus. Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Fort Collins, Colorado. p. 116-123.
82. Liu, J., Mercer, J. M., Stam, L. F., Gibson, G. C., Zeng, Z. B., Laurie, C. C. (1996): Genetic Analysis of Morphological Shape Difference in the Male Genitalia of *Drosophyla simulans* and *D. mauritiana*. Genetics, 142: 1129-1145.
83. Ma, X.-F., Hall, D., Onge, K. R. St., Jansson, S., Ingvarsson, P. K. (2010): Genetic Differentiation, Clinal Variation and Phenotypic Associations With Growth Cessation Across the *Populus tremula* Photoperiodic Pathway. Genetics, 186: 1033-1044.
84. Macaya-Sanz, D., Suter, L., Joseph, J., Barbará, T., Alba, N., González-Martínez, S. C., Widmer, A., Lexer, C. (2011): Genetic analysis of post-mating reproductive barriers in hybridizing European *Populus* species. Heredity, 107: 478-486.
85. Martinsen, G. D., Whitham, T. G., Turek, R. J., Keim, P. (2001): Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. Evolution, 55(7): 1325-1335.
86. Márquez, F., van der Molen, S. (2011): Intraspecific shell-shape variation in the razor clam (*Ensis macha*) along the Patagonian coast. Journal of Molluscan Studies, 77: 123-128.
87. Mátyás Cs. (2002): Erdészeti-természetvédelmi genetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p. 37-38., 124-125., 330.
88. Mebatsion, H. K., Paliwal, J., Jayas, D. S. (2012): Evaluation of variations in the shape of grain types using principal components analysis of the elliptic Fourier descriptors. Computers and Electronics in Agriculture, 80: 63-70.
89. Murray, B., Young, A., Boyle, T. (2000): Basic genetics. In: Young, A., Boshier, D., Boyle, T. (ed.) (2000): Forest conservation genetics - Principles and practice. Csiro Publishing, Collingwood, Australia. p. 13-14.
90. Nei, M., Li, W.-H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76: 5269-5273.
91. Nei, M. (1972): Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283-392.
92. Nei, M. (1987): Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, United States.

93. Ninomiya, S., Oshawa, R., Yoshida, M. (1995): Evaluation of Buckwheat and Tartary Buckwheat Kernel Shape by Elliptic Fourier Method. In Matano, T. et Ujihara, A. (ed.) (1995): Current Advances in Buckwheat Research: proceedings of the 6th International Symposium on buckwheat in Shinshu, August 24-29, 1995. Shinshu Univerity Press, p. 389-396.
94. Oshawa, R., Tsitsumi, T., Uehara, H., Namai, H., Ninomiya, S. (1998): Quantitative evaluation of common buckwheat (*Fagopyron esculentum* Moench) kernel shape by elliptic Fourier descriptors. Euphytica, 101: 175-183.
95. Peakall, R., Smouse, P. E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
96. Peakall, R., Smouse, P. E. (2012a): GenALEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics, 28: 2537-2539.
97. Peakall, R., Smouse, P. E. (2012b): Appendix 1 – Methods and Statistics in GenALEx 6.5. <http://biology.anu.edu.au/GenALEx/Download.html>
98. Petit, R. J., Aguinalalde, I., De Beaulieu, J. L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Muller-Starck, G., M., Demesure-Musch, B., Palme, A., Martin, J. P., Rendell, S., Vendramin, G. G. (2003): Glacial refugia: hotpots but not melting pots of genetic diversity. Science, 300: 1563-1565.
99. Posada, D., Crandall, K. A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends in Ecology & Evolution, 16: 37-45.
100. Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000): Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics, 155: 945-959.
101. Rae, A. M., Ferris, R., Tallis, M. J., Taylor, G. (2006): Elucidating genomic regions determining enhanced leaf growth and delayed senescence in elevated CO₂. Plant, Cell and Environmet, 29: 1730-1741.
102. Rahman, M. H., Rajora, O. P. (2002): Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation and genetic relationships of clones, cultivars and varieties of six poplar species from three sections of genus *Populus*. Genome, 45: 1083-1094.
103. Rajagopal, J., Bashyam, L., Bhatia, S., Khurana, D. K., Srivastava, P. S., Lakshmikumaran, M. (2000): Evaluation of Genetic Diversity in the Himalayan Poplar Using RAPD Markers. Silvae Genetica, 49(2): 60-66.
104. Rajora, O. P., Dancik, B. P. (1992): Genetic characterization and relationships of *Populus alba*, *P. tremula* and *P. × canescens*, and their clones. Theoretical and Applied Genetics, 84: 291-298.

105. Rajora, O. P., Rahman, M. H. (2003): Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus × canadensis*) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 470-477.
106. Rettig, J. E., Fuller, R. C., Corbett, A. L., Getty, T. (1997): Fluctuating asymmetry indicates levels of competition in an even-aged poplar clone. *OIKOS* 80: 123-127.
107. Rood, S. B., Cambell, J. S., Despins, T. (1985): Natural poplar hybrids from southern Alberta. I. Continuous variation for foliar characteristics. *Canadian Journal of Botany*, 64: 1382-1388.
108. Sabatti, M., D'Ovidio, R., Tanzarella, O. A., Scarascia, G. E. (2001): Assessment of geographic variation by RAPD markers among Italian open-pollinated progenies of *Populus alba* L.. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 423-428.
109. Saieed, N. Th., Douglas, G. C., Fry, D. J. (1994a): Induction and stability of somaclonal variation in growth, leaf phenotype and gas exchange characteristics of poplar regenerated from callus culture. *Tree Physiology* 14: 1-16.
110. Saieed, N. Th., Douglas, G. C., Fry, D. J. (1994b): Somaclonal variation in growth, leaf phenotype and gas exchange characteristics of poplar: utilization of leaf morphotype analysis as a basis for selection. *Tree Physiology*, 14: 17-26.
111. Salvini, D., Anzidei, M., Fineschi, S., Malvolti, M. E., Turchini, D., Vendramin, G. G. (2001): Low genetic differentiation among Italian populations of *Populus tremula* L. (Salicaceae) estimated using chloroplast PCR-RFLP and microsatellite markers. *Forest Genetics*, 8(1): 81-87.
112. Sánchez, N., Grau, J. M., Manzanera, A., Bueno, M. A. (1998): RAPD Markers for the Identification of *Populus* Species. *Silvae Genetica* 47(2-3): 67-71.
113. Sánchez, N., Grau, J. M., Alba, N., Manzanera, J. A., de los Angeles Bruno, M. (2000): Genetic Characterisation of *Populus tremula* Regions of Origin is Spain Using RAPD Fingerprints. *Silvae Genetica*. 49(2): 66-71.
114. Shannon, C. E., Weaver, W. (1949): The mathematical theory of communication. The University of Illinois Press, Urbana. pp. 117.
115. Slavov, G. T., Zhelev, P. (2010): Salient Biological Features, Systematics and Genetic Variation of *Populus*. In: Jansson, S., Bhalerao, R., Groover, A. (ed.) (2010): *Genetics and Genomics of Populus*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, 8: 15-38.
116. Smulders, M. J. M., Beringen, R., Volosyanchuk, R., Vanden Broeck, A., van der Schoot, J., Arens, P., Vosman, B. (2008): Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. × canadensis* Moench. Hybrid offspring completes for niches along the Rhine river in Netherlands. *Tree Genetics and Genomes*, 4: 663-675.

117. Smulders, M. J. M., Van der Schoot, J., Arens, P., Vosman, B. (2001): Trinucleotide repeat microsatellite markers for Black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes*, 1(3): 188-190.
118. Spies, T. A., Barnes, B. V. (1981): A Morphological Analysis of *Populus alba*, *P. grandidentata* and their Natural Hybrids in Southeastern Michigan. *Silvae Genetica* 30(2-3): 102-106.
119. StatSoft, Inc. (2001a): STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>
120. StatSoft, Inc. (2001b): Discriminant Function Analysis Results - Advanced Tab. In STATISTICA Electronic Manual. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>
121. StatSoft, Inc. (2001c): Example 1: Joining (Tree Clustering). In STATISTICA Electronic Manual. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>
122. Suvanto, L. I., Latva-Karjanmaa, T. B. (2005): Clone identification and clonal structure of the European aspen (*Populus tremula*). *Molecular Ecology*, 14: 2851-2860.
123. Sváb J. (1973): Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 333.
124. Sváb J. (1979): Többváltozós módszerek a biometriában. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 112., 180.
125. Tabugo, S. R. M., Torres, M. A. J., Olowa, L. F., Sabaduquia, M. A. B., Macapil, R. M., Acevedo, A. M., Demayo, C. G. (2012): Elliptic Fourier analysis in describing Shape of the Mandible of the Larvae of the Coconut Leaf beetle *Brontispa longissima* Gestro, 1885 (Chrysomelidae: Hispinae) collected from Plants with varying Degrees of Damage. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8): 19-26.
126. Tahira, T., Suzuki, A., Kukita, Y., Hayashi, K. (2003): SNP Detection and Allele Frequency Determination by SSCP. In: Kwok, P.-Y. (ed.) (2003): Single Nucleotide Polymorphisms – Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 212: 37-46.
127. Tóth G. (2003): Területi autokorrelációs vizsgálat a Local Moran I módszerével. *Tér és Társadalom*, 4: 39-49.
128. Yoshioka, Y., Iwata, H., Ohsawa, R., Ninomiya, S. (2004): Analysis of Petal Shape Variation of *Primula sieboldii* by Elliptic Fourier Descriptors and Principal Component Analysis. *Annals of Botany*, 94: 657-664.

129. Yoshioka, Y., Iwata, H., Ohsawa, R., Ninomiya, S. (2005): Quantitative evaluation of petal shape variation in *Primula sieboldii* caused by breeding process in the last 300 years. *Heredity*, 94: 657-663.
130. Yoshioka, Y., Iwata, H., Hase, N., Matsuura, S., Ohsawa, R., Ninomiya, S. (2006): Genetic combining ability of petal shape in garden pansy (*Viola × wittrockiana* Gams) based on image analysis. *Euphytica*, 151: 311-319.
131. Yoshioka, Y., Ohsawa, R., Iwata, H., Ninomiya, S., Fukuta, N. (2006): Quantitative Evaluation of Petal Shape and Picotee Color Pattern in *Lisianthus* by Image Analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 131(2): 261-266.
132. Van der Schoot, J., Pispířková, M., Vosman, B. (2000): Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 317-322.
133. Van Loo, M., Joseph, J. A., Heinze, B., Fay, M. F., Lexer, C. (2008): Clonality and spatial genetic structure in *Populus × canescens* and its sympatric backcross parent *P. alba* in a Central European hybrid zone. *New Phytologist*, 177: 506-516.
134. Vanden Broeck, A., Storme, V., Cottrell, J. E., Boerjan, W., Van Bockstaele, E., Quataert, P., Van Slycken, J. (2004): Gene flow between cultivated poplars and native black poplar (*Populus nigra* L.): a case study along the river Meuse on the Dutch-Belgian border. *Forest Ecology and Management*, 197: 307-310.
135. Varga B., Szilágy R. (2011): Kvantitatív információképzési technikák. Digitális tankönyvtár.
http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0049_08_kvantitativ_informaciokepzesi_teknikak/3264/index.html
136. Vekemans, X., Hardy, O. (2004): New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13: 921-935.
137. Viscosi, V., Lepais, O., Gerber, S., Fortini, P. (2009): Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods. *Plant Biosystems*, 143(3): 564-574.
138. Wu, R., Stettler, R. F. (1994): Quantitative genetics of growth and development in *Populus*. I. A three-generation comparison of tree architecture during the first 2 years of growth. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 1046-1054.
139. Wu, R., Bradshaw, Jr. H. D., Stettler, R. F. (1997): Molecular genetics of growth and development in *Populus* (Salicaceae). V. Mapping quantitative trait loci affecting leaf variation. *American Journal of Botany*, 84(2): 143-153.

140. Zhan, Q. B., Wang, X. L. (2012): Elliptic Fourier Analysis of the Wing Outline Shape of Five Species of Antlion (Neuroptera: Myrmeleontidae: Myrmeleontini). *Zoological Studies* 51(3): 399-405.

10. Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák

1. ábra: A mintafák elhelyezkedése (megjegyzés: a balaton-felvidéki mintafák az alacsony mintaszám miatt nem kerültek vizsgálatra)	31
2. ábra: A szkennelést követő és a morfometriai értékeléshez előkészített kép	33
3. ábra: Levéllemez-repedés digitális retusálása	33
4. ábra: Az első öt főkomponens által leírt levélalak változatosság (jelmagyarázat lásd a szövegben)	39
5. ábra: Az alapfajok és a hibrid egyedek ábrázolása PC1 és PC2 értékeikkel.....	40
6. ábra: Az alapfajok és a szürke nyár egyedeinek elhelyezkedése és a PC1 és PC4 értékek alapján szerkesztett koordinátarendszerben	42
7. ábra: Kanonikus változó értékeikkel ábrázolt egyedek	45
8. ábra: Terepi fajmeghatározás ellenőrzése mikroszatellit markerekkel	46
9. ábra: Nei-féle genetikai távolság mátrix alapján szerkesztett dendrogram [SSR analízis; jelmagyarázat: linkage distance – kapcsolódási (genetikai) távolság]	51
10. ábra: Nei-féle genetikai távolság mátrix alapján szerkesztett dendrogram [RAPD analízis; jelmagyarázat: linkage distance – kapcsolódási (genetikai) távolság]	54
11. ábra: Az egyes haplotípusok leszármazási viszonyait szemléltető Median-joining hálózat [jelmagyarázat: az mv rövidítés (median vectors) által jelzett pontok fel nem fedett, vagy kihalt haplotípusokat jeleznek, a haplotípusok közötti piros számok pedig a valószínűsíthető mutációs lépések számát jelentik; azokat a haplotípusokat, melyekkel a vizsgált szürke nyár egyedek rendelkeztek, nyilakkal jelöltem]	57
12. ábra: 6 SSR markerrel végzett egyedbesorolás grafikus ábrázolása, 23 szürke nyár egyed esetén	59
13. ábra: 23 szürke nyár egyed származása 6 SSR marker alapján (jelmagyarázat: kék színnel a fehér nyár, pirossal a rezgő nyár eredet valószínűsége látható, a fehér sáv pedig az első generációs hibridek választott értelmezési tartományát jelöli)	60
14. ábra: 6 SSR markerrel végzett egyedbesorolás grafikus ábrázolása, 123 szürke nyár egyed esetén	61
15. ábra: 123 szürke nyár egyed származása 6 SSR marker alapján (jelmagyarázat: kék színnel a fehér nyár, pirossal a rezgő nyár eredet valószínűsége látható, a fehér sáv pedig az első generációs hibridek választott értelmezési tartományát jelöli)	61

Táblázatok

1. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálatokban alkalmazott primerpárok és restrikciós endonukleázok	35
2. táblázat: PCR mix összetétele	35
3. táblázat: PCR-RFLP vizsgálat PCR protokollja	35
4. táblázat: A DNS emésztéséhez használt enzimoldat összetevői (MspI).....	36
5. táblázat: RAPD vizsgálatához használt PCR mix összetétele	37
6. táblázat: RAPD vizsgálat során alkalmazott PCR protokoll	37
7. táblázat: PCR mix összetétele SSR vizsgálatokhoz	38
8. táblázat: az SSR vizsgálatok során alkalmazott PCR protokoll	38
9. táblázat: Főkomponensek sajátértéke és a teljes varianciához való hozzájárulásának mértéke.....	39
10. táblázat: Összefoglaló diszkriminancia táblázat 20 főkomponens értékelése alapján	42
11. táblázat: Az egyes csoportok négyzetes Mahalanobis távolsága.....	43
12. táblázat: A diszkriminancia analízis során számított F-értékek és valószínűségi (p) szintek	43
13. táblázat: Diszkriminancia analízis során számított osztályozási mátrix	43
14. táblázat: Kanonikus változók szignifikancia vizsgálatának eredményei	44
15. táblázat: Az egyes csoportokra számított kanonikus változók átlagos értékei	44
16. táblázat: A genetikai és levélmorfológiai vizsgálatok során számított egyedsorolások összevetése	47
17. táblázat: A vizsgált populációk egyedszáma az alapfajok és a hibrid szürke nyár tekintetében (jelmagyarázat: a genetikai vizsgálatokra kiválasztott populációk cellái zöld színnel kerültek kiemelésre)	47
18. táblázat: Mikroszatellit vizsgálat diverzitás értékei (jelmagyarázat: N – mintaszám, Na – átlagos lokuszonkénti allélszám, Ne – effektív allélszám, I – Shannon információs index, Ho – megfigyelt heterozigócia, He – várt heterozigócia, F – fixációs index)	48
19. táblázat: SSR vizsgálatok során meghatározott F és G statisztika értékek	49
20. táblázat: Saját vizsgálati eredmények összevetése ausztriai, olaszországi és magyarországi populációk diverzitás értékeivel, Lexer és munkatársai alapján (Lexer et al., 2010; jelmagyarázat: N – mintaszám, Na – átlagos lokuszonkénti allélszám, Ho – megfigyelt heterozigócia, He – várt heterozigócia, F _S – populáción belüli differenciáltság).....	50
21. táblázat: A RAPD vizsgálat során meghatározott diverzitás értékek	52
22. táblázat: A RAPD vizsgálatok fragmentadatai populációnként (jelmagyarázat: *frekvencia<5%)	53
23. táblázat: Az egyes haplotípusok meghatározása során alkalmazott protokoll (megjegyzés: az egyes betűkódok az adott lokuszon detektált allélek sorszámaként értelmezendők. A	

sorrend az allélek lokuszonkénti elektroforetikus mobilitását mutatja, ahol az a jelű allélek a legkisebb elektroforetikus mobilitásúak)	55
24. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálatok során megfigyelt haplotípusok egyedszáma populációnként (jelmagyarázat: a zöld színnel kiemelt számokhoz tartozó haplotípusok voltak a vizsgált szürke nyárakban kimutathatók)	56
25. táblázat: A PCR-RFLP vizsgálat során meghatározott diverzitás értékek (Jelmagyarázat: N – mintaszám, N_a – átlagos lokuszonkénti allélszám, N_e – lokuszonkénti effektív allélszám, I – Shannon-féle információs index, h – haploid géndiverzitás, N_{PR} – egyedi allélek száma)	57
26. táblázat: Szürke nyárak megoszlása mintázott populációnként, illetve meghatározási sémánként.....	59

11. Mellékletek jegyzéke (CD)

1. melléklet: Főkomponensek sajátértéke és a teljes varianciához való hozzájárulásának mértéke
2. melléklet: Az első 20 főkomponens részvétele a levélalak változatosságban
3. melléklet: Főkomponens értékek szignifikancia-vizsgálata
4. melléklet: A két alapfaj és a hibrid szürke nyár egyedek ábrázolása kétdimenziós koordinátarendszerben PC2 és PC3 értékeik alapján
5. melléklet: Az egyes főkomponensek átlaga csoportonként
6. melléklet: Az elliptikus Fourier leírók főkomponens értékei alapján végzett diszkriminancia analízis során számított egyedbesorolási táblázat
7. melléklet: A vizsgált egyedek kanonikus változó értékei
8. melléklet: Az SSR vizsgálat során számított egyedbesorolási értékek
9. melléklet: Mikroszatellit vizsgálatok során kimutatott egyedi allélszám populációnként
10. melléklet: Mikroszatellit vizsgálatok során számított populációk közötti Nei-féle genetikai távolságok