

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A NÁD (*PHRAGMITES AUSTRALIS*) GENETIKAI
DIVERZITÁSÁNAK VIZSGÁLATA PCR-RAPD TECHNIKÁVAL**

Lukács Viktória

Témavezető: Dr. Herodek Sándor, DSc

a biológiai tudományok doktora

MTA BLKI

Egyetemi témavezető: Dr. Bisztray György Dénes,

PhD habil, egyetemi docens



**Készült: A Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai
Kutatóintézetében és a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi
Kar Genetika és növénynevelés Tanszékén**

2009

A doktori iskola

- megnevezése:** Kertészettudományi Doktori Iskola
- tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok
- vezetője:** Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi
Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék
- témavezető:** Dr. Bisztray György PhD habil.
tanszékvezető, egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi
Kar,
Szőlészeti Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. Bevezetés

A nád a pázsitfűfélék (*Poaceae*) családjába tartozó, de több méter magasságot is elérő növény. Tavasszal az új hajtások növekedését nem csak a fotoszintézis, de a rizómákban tárolt sok, nem strukturális szénhidrát is segíti, így más fajokat megelőzve hamar kialakul a magas, sűrű, dús levélzetű nádas, amely annyira leárnyékolja a talajt, hogy más növények számára kevés fény marad. A nád így rendszerint egyedül uralkodik a társulásaiban.

A víz a növények alapvető szükséglete, mégis a virágos növények alig 1-2 %-a él vízben. Ennek az oka, hogy a vízzel borított talaj anaerob. A nád azok közé a növények közé tartozik, amelyek speciális szellőztető rendszert fejlesztettek ki, és így tudják megfelelően oxigenálni a rizoszférát (Armstrong and Armstrong 1991, Brix et al. 1992, Armstrong et al. 1966, Beckett et al. 2001). A nád így korlátlanul jut vízhez, az iszapos talajon bőségesen kap tápsókat, míg a széndioxidot a levegőből veheti fel, egyesítve a vízi és szárazföldi életmód előnyeit. Ivaros szaporodásában azonban annyira szárazföldi növény maradt, hogy magjai a víz alatt nem tudnak kicsírázni, és a szárazon kicsírázott magoncok sem viselnek el tartós vízborítást (Hürlimann 1951, Haslam 1971, Weisner et al. 1993, Coops et al. 1995). A vízzel borított területeken ezért kizárólag rizómáival terjed. A kifejlett állományban a szárazföldön is kicsiny a magról való megújulás gyakorisága, hiszen a mag rendszerint el sem éri a talajt az avar takaró miatt, ha pedig mégis kicsírázna a mag, maga a nádas vonja el előle a fényt.

A nád mindkét féltekén a trópusoktól a 70. szélességi fokig, a tengerszinttől a Tibeti-fennsík magasságáig megtalálható. Főként a sekély vizeket, tavak, folyók, csatornák partját, és a különböző vizes élőhelyeket kedveli, de szárazföldön is megnő, ha gyökere eléri a talajvizet. A kifejlett növény sem a klimatikus, sem a talajviszonyokban nem különösen válogatós, és jelentős a sótűrő képessége is (Rosewald-Rudescu 1974, Clevering and Lissner, 1999). Az alapvető kérdés, hogy a faj igen különböző élőhelyeken való széles elterjedését a klónok nagy ökológiai rugalmassága, vagy a specialista klónok sokasága okozza-e?

A nádasok klonális szerkezetének vizsgálatát a molekuláris módszerek elterjedése tette lehetővé. A korai vizsgálatoknál a RAPD módszerrel mindjárt nagy

monoklonális állományokat találtak (Kühl and Neuhaus 1993, Neuhaus et al. 1993). A további vizsgálatok során egyes vizekben a nádas vízfelőli szélén többszáz méter hosszú, míg a part felőli szélén sokkal rövidebb klónokat észleltek. Más vizeknél a sekély vízben is találtak jelentős klonális diverzitást.

Ezek a megfigyelések nagyon használható hipotézishez vezettek (Kühl and Neuhaus 1993, Koppitz et al. 1997). Eszerint a nádasok kialakulásában három fázis különböztethető meg. Az elsőben a szárazföldön magoncokról nagy diverzitású nádas alakul ki, amelynek nagy a klonális diverzitása, így könnyen tud alkalmazkodni a külső körülmények változásához. A másodikban a szárazföldi állományból kiinduló rizómák egyre mélyebbre hatolnak a vízben, ahol erős versengés folyik köztük, így idővel egyre csökken az állomány diverzitása, és ezzel alkalmazkodóképessége is. A harmadik stádiumban már csak egyetlen klón marad, az, amelyik a legjobban megfelel a külső körülményeknek, a genetikai diverzitás elvesztése miatt azonban ez a stabilizálódott állomány már nem tud alkalmazkodni a külső körülmények változásához. Felmerült az a gondolat is, hogy a klonális diverzitás elvesztése jelentős mértékben hozzájárulhat az európai nádpusztuláshoz (Kühl and Neuhaus 1993, Koppitz and Kühl 2000). A feltevés azonban viszonylag kevés tó nádasainak vizsgálatán alapszik, és ezekben sem ismert a nádasok kora. Vitatott az is, hogy a nádklónok ökológiai tűrőképessége szűk lenne.

A genetikai diverzitás egy tavon belül kisebbnek mutatkozott, mint különböző tavak esetében, több európai ország nádasából vett egy-egy mintát elemezve pedig úgy látszott, mintha azok genetikai távolsága a földrajzi távolsággal nőne (Koppitz 1999). Az utóbbi megállapítás azonban nem látszott egyértelműnek, hiszen a magyar és román minták az észak-európaiakkal kerültek egy klaszterba.

2. Célkitűzések

1. A Balatonban pusztult a nád. Első célunk tehát az volt, hogy képet kapjunk a balatoni nádasok klonális diverzitásáról, így megtudjuk, csökkent-e ez annyira, hogy az közrejátszhatott a nádpusztulásban.

2. Miután a balatoni nádas viszonylag öreg, és mégis poliklonálisnak találtuk, azoknak az állományoknak viszont, amelyre az elméletet alapozták, nem ismerték a korát, második célunk az volt, hogy ismert korú nádasok (Bódeni-tó, Osterseen, Fertő-tó, Kis-Balaton) klonális diverzitásának vizsgálatával ellenőrizzük a feltevést a monoklonalitás kialakulásáról.
3. Korábbi vizsgálatoknál vagy csak azt adták meg, hogy egy vagy több klónt találtak az egyes állományokban, vagy megtudtuk a mintavételi távolságot is, de az rendszerint 50 m körüli volt. Mivel 15 méteres mintavételi távolságot alkalmazva a Balatonnál azt találtuk, hogy a klónok zöme ennél kisebb, bevezettük a sűrű, mintázást, hogy képet kapjunk a klónok tényleges méretéről.
4. A külföldi vizsgálatoknál a klonális diverzitásra helyezték a hangsúlyt. Célul tűztük ki, hogy azt is megtudjuk, mekkora a gén diverzitás, milyen genetikai távolságra vannak az egyes klónok egymástól egy-egy állományon belül, illetve milyen különbségek mutatkoznak ebben a tekintetben a különböző tavak állományai között.
5. A nád terjedésének megismeréséhez fontos tudni, hogyan változik a populációk genetikai távolsága a földrajzi távolsággal. Az Eured program keretében erre nem kaptak egyértelmű választ. Mi a kérdés megközelítéséhez az öt tóban azonos módszerrel vizsgált 12 populáció genetikai távolságait összehasonlítjuk a földrajzi távolságukkal, majd 21 közép európai tóból vett egy-egy mintát elemezve nagyobb területre terjesztettük ki a vizsgálatokat.
6. Az eredményeink és újabb irodalmi adatok segítségével képet próbálunk alkotni arról, hogyan terjed nagy távolságokon a nád, hogyan telepszik meg, és hogyan függhet az állományok diverzitása kialakulásuk módjától.

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálati helyek és mintavételezés

A Bódeni-tó Németország, Svájc és Ausztria határán fekvő szubalpin tó. Felülete 536 km², legnagyobb mélysége 254 m, átlagos mélysége 90 m. A nagyobb

Obersee-ből és a kisebb Untersee-ből áll. A Rajna az Obersee-be ömlik, és innen folyik át az Untersee-be. Az Überlinger-see az Obersee kiágazását képezi. A Bódeni-tó a legrégebben tanulmányozott tavak közé tartozik. Vízállásáról 1917 óta van folyamatos adatsorunk. A Bódeni tó nádasainak vízfelőli része legalább kétszáz éves, de valószínűleg még sokkal korábban kicsírázott magokból származik. A most sekély vízben álló, partfelőli nád ennél lényegesen fiatalabb lehet.

Az Osterseen tórendszer Felső-bajorországban található. A 20 egymással összekötött tavacska együttes területe $2,25 \text{ km}^2$, átlagos mélységük 9 m. A tórendszeren az Osterseen-Ach folyik keresztül, melynek vízgyűjtője $5,7 \text{ km}^2$, és amely végül a Starnberger tóba torkollik. A tavak a Würm jégkorszak végén keletkeztek a jég által kivájt medrekben. Vízállásukról nincsenek adatsorok, de azt eléggé állandónak tartják, mert a tavakat főként a talajvíz táplálja. Valószínű, hogy a nádasok öregek, akár több száz évesek is lehetnek.

A Fertő (Neusiedlersee) Ausztria és Magyarország határán lévő nagy, szikes tó, területe 309 km^2 , legnagyobb mélysége 1,8 m, átlagos mélysége 0,7 m. Területének nagy részét nádas borítja, mely a Duna-delta után Európa második legnagyobb nádasa. A Fertő vízállásáról a 17. század óta vannak feljegyzések. Ezek szerint a 17. században kétszer, a 18. században egyszer majdnem teljesen kiszáradt a tó. A legnagyobb aszály a 19. században volt, és 1866-1870 között a tó teljesen kiszáradt. A nádasnak a korát tehát 140 évre tehetjük.

A Balaton Magyarországon fekszik, 594 km^2 felületével Közép-Európa legnagyobb tava. Legnagyobb mélysége 11 m, átlagos mélysége 3,4 m. A tó négy medencéből áll. Az elsőbe ömlik a Zala folyó, a negyedikből a Sió csatorna vezeti le a vizet a Dunába. A tó 240 km partvonalából 110 km-t övez nádas, melynek összes területe 12 km^2 . Ennek zöme a szélvédett északi parton van, ahol 1,5 m mélységig hatol a nádas a tóba. A hullám verte, homokos déli parton 1 m-nél nem jut mélyebbre a nád. A Sió-zsilip 1863 évi megnyitása előtt a Balaton vízszintje olyan magas volt, hogy a nádasok jelenlegi területét mindenütt 1,5 méternél mélyebb víz borította. A zsilip megnyitása után viszont rendkívül erős és tartós aszály következett, amitől a mostaninál is 1,5 méterrel lejjebb szállt a vízszint, jó lehetőséget teremtve a szárazra került tófenéken a magról való megtelepedésre. Ezeket a területeket azután újra

elárasztotta a víz úgy, hogy az állományok vízfelőli részén azóta is folyamatos a vízborítás. A balatoni nádasok korát így 140 évre becsüljük.

Kis-Balatonnak a Zala torkolata fölötti medencét nevezik, amely valaha a tó nyíltvízi öble volt, jelenleg pedig az egyik része szárazra került, más részét sekély víz borítja. Az 52 km² területből kb. 20 km² a nádas. Az általunk vizsgált nádasok közül a Kis-Balatoné tekinthető a legfiatalabbnak.

Gyűjtési helyeink a Bódeni-tóban az Unterseeben lévő Reicheneu-félsziget partján és az Oberseehez tartozó Überlinger-see partján, az Osterseen esetében a nagyobb, oligo-mezotróf Ostersee és a kisebb, eutróf Waschsee partján, a Fertőben a Nemzeti-park területén lévő községek (Fertőrákos, Hidegség, Hegykő) közelében lévő három területen, a Balatonnál az északi part öbleiben (Kerekedi-öböl, Bozsai-öböl) és a déli parton (Balatonmáriafürdő), a Kis-Balatonban annak az elárasztott, Ingói-berek nevű részén található kis, nyíltvízű terület (Zalavári-víz) körül voltak. Minden helyen a nyíltvíz felőli és a part felőli sávból 10-10 mintát gyűjtöttünk. A minták közötti távolság a Bódeni-tó, az Osterseen és a Fertő esetében 20 méter, a Balaton és a Kis-Balaton esetében 15 méter volt.

Hogy a klónok méretéről pontosabb képet kaphassunk, a Balatonban a Bozsai-öbölben és a Kis-Balatonban a Zalavári-víznél lévő szakaszon 5 méterenként is vettünk mintákat. Ezen felül a Balaton partján Alsóörsnél a nádas sekély vízben álló belsejében kijelöltünk egy 40 m × 40 m nagyságú területet, amelyen 4 m × 4 m sűrűségű rács szerint vettünk mintákat.

Hogy a genetikai és földrajzi távolságokat összevethessük, a fenti 11 nádason kívül Magyarországon még a Tatai-tóból, a tamási halastóból, a Vadása-tóból, a Velencei-tóból és egy hortobágyi szikes pocsolyából, Ukrajnában a Szolyva melletti nádasból, Romániában az erdélyi Medve-tóból és a Csikrákosi-tóból gyűjtöttünk nádat, a Duna-deltából pedig egy teraploid és egy oktoploid mintát kaptunk. Ezekből a populációkból azonban csak egy-egy klónt vizsgáltunk meg.

A terepen a nádszál csúcsát vágtuk le, majd azt nedves papírba csomagolva a laboratóriumba szállítottuk. Itt a hajtáscsúcs belsejéből kb. 0,1 g nedves súlyú anyagot kivágtunk, és azt feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

3.2. RAPD elemzés

A DNS-t Qiagen DNA Plant Mini Kit-tel nyertük ki a növényekből a protokoll szerint eljárva.

A PCR reakciót 25 µl térfogatú oldatban végeztük, amely 10 ng DNA-t, 10x reakció puffert, 1,5 mM MgCl₂-ot, 0,75 mM Sigma dNTP-t, 0,4 mM primert és 0,8 egység Sigma Taq DNA polimerázt tartalmazott. A dNTP-ben azonos volt a dATP, dCTP, dGTP és dTTP mennyisége. A korábbi nádas vizsgálatoknál (Koppitz 1999) alkalmazott (GACA)₄, M13 és (GATA)₄ mellett az Operon B01 (GTTTCGCTCC) és Operon B11 (GTAGACCCGT) primereket is használtuk. Az amplifikálást PCR Applied Biosystems 2720 Thermocycler készülékkel végeztük. A Koppitz (1999) által használt primereknél az általa leírt hőmérsékleti programot alkalmaztuk. Az OPB01-nél és OPB11-nél a mintákat először 3,75 percig 94 °C-on tartottuk, majd 40 cikluson át az 1 perc 94 °C-on, 1 perc 36 °C-on, 2,5 perc 72 °C-on programot használtuk, befejezésül pedig 10 percig 72 °C-n tartottuk majd 4 °C-ra hűtöttük.

A DNS töredékeket 1,8 %-os agaróz gélen Tris-phosphate-EDTA (TPE) puffer rendszerben elektroforetizálva választottuk szét. Minden gélen futtattunk egy 123 bp-os létrát, és egy nádból izolált, standardként szolgáló mintát is a reprodukálhatóság ellenőrzésére. A gélt ethidium bromiddal festettük. A fragmentum mintázatot UV fényvel megvilágítva lefényképeztük. A csíkok jelenlétét szabad szemmel állapítottuk meg. A meglétet 1-el, a hiányt 0-val jelölve bináris mátrixot kaptunk. Minden mintánál 5 primerrel dolgozva ugyanazt a 43 megbízható variábilis markert vizsgáltuk. A mintákon az öt primerrel kétszer végeztük el az amplifikálást és az elektroforézist.

3.3. Adatelemzés

Az adatok elemzésére a Popgene 1.32 programot (Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Canada T6G 2H1) használtuk. Ezzel kiszámítottuk a populációkon belüli genetikai hasonlósági együtthatókat, a klónok közötti gén diverzitást, az átlagos Shannon diverzitást és a genetikai távolságokat, valamint a populációk közötti hasonlósági együtthatókat és genetikai távolságokat. Az

UPGMS dendrogramot a PhyloDraw 0,82 programmal rajzoltattuk meg. A Mantel-tesztet a zt version 1.0 programmal számítottuk ki (Eric Bonnet 2001-2002).

A klón térképek elkészítésénél azokat a mintákat tekintettük egy klónhoz tartozónak, amelyek hasonlósági együtthatója 0,95 fölött volt.

4. Eredmények

4.1. Nádasok klonális diverzitásának összehasonlítása

A Bódeni-tó nádasainak klóntérképe szerint az Untersee nádasának vízfelőli oldalán a tíz mintából hat egy klónhoz tartozott. A klónba két helyen más klónok tagjai is benyomultak, így a nagy klón két szélső tagja egymástól 160 m távolságra van. A valóságban a klón ennél nagyobb is lehet, hiszen folytatódhat a vizsgált szakasz határán kívül is. Ebben a nagyon öreg nádasban tehát valóban van egy nagyon hosszú klón, ugyanakkor az egész állomány poliklonális, a tíz minta öt klónhoz tartozik. A parti sávban nagyobb diverzitást, nyolc klónt találtunk. Az Überlinger-see nádasában négy klónt mutattunk ki a vízi oldalon, a legnagyobb négytagú, és öt klónt a parti sávban, a két sáv között tehát itt kisebb a különbség.

Az Osterseen állományaiban a Grosser Ostersee nádasának vízfelőli oldalán egy négytagú és hat egytagú, a parti oldalon egy négytagú, két kéttagú és két egytagú klónt találtunk, azaz a vízfelőli oldalon hét, a part felőlin csak öt klónt mutattunk ki. Ez az egyetlen állomány, ahol a parti oldalon volt kisebb a diverzitás. A Waschsee esetében a vízi oldalon hat, a partin nyolc klónt tudtunk megkülönböztetni.

A Fertő-tóban Fertőrákosnál a vízfelőli oldalon egy háromtagú klónt találtunk, a tíz minta így nyolc klónt alkotott. A parti oldalon mind a tíz nád külön genotípust mutatott. Hidegségnél a víz felől egy négytagú, két kéttagú és két egytagú, összesen tehát öt klónt találtunk, a parti sávban viszont itt is minden minta különbözött. Hegykőnél a vízfelőli sávban két kéttagú, a part felőliben egy háromtagú klónt észleltünk, azaz mindkét sávban nyolc klón volt.

A Balatonban mind a Kerekedi-öbölnél, mind Máriafürdőnél a vízi oldalon három minta tartozott azonos klónhoz és a tíz minta mindkét helyen hét klónt alkotott. A parti oldalon viszont mindkét helyen mind a tíz minta különbözött. A Bozsai-

öbölben a vízi oldalon egy nagyon hosszú, 5 tagú klón látszik, így ebben a sávban a 15 méterenként vett tíz minta hat klónt alkotott, a parti oldalon viszont nyolc klón mutatkozott.

A Kis-Balatonban a Zalavári-víz körül mind a nyíltvíz felőli, mind a parti sávban a 15 méterenként vett minták mind külön klónt alkottak.

4.2. A klonális diverzitás vizsgálata sűrű mintavételezéssel

Mennél sűrűbben vesszük a mintákat, adott szakaszon annál több klónt találhatunk, és annál nagyobb a valószínűsége, hogy két egymás melletti minta azonos genotípust mutasson. Hogy a klónok tényleges méretét jobban megközelíthessük, a Bozsai-öbölben és a Zalavári-víz körül 5 méterenként vettünk mintákat a 150 méteres szakaszokon, amelyekből feljebb csak a 15 méterenként vettek mutatunk be a többi hellyel való összehasonlíthatóság kedvéért. A sűrű mintavétellel készített klóntérkép szerint a bozsai nádas vízfelőli élén van egy tizenöt tagú, tehát 75 méteres klón, egy négytagú, tehát 20 méteres, két kéttagú, tehát 10 méteres és hét egytagú, azaz 5 méteres klón. A parti oldalon egy 25 méteres, két 15 méteres, két tíz méteres és tizenöt 5 méteres klón találtunk. A 30 minta tehát a vízfelőli sávban 11, a part felőliben 20 különböző genotípust mutatott. A Kis-Balatonban a vízfelőli oldalon 17, a part felőlin 23 klónhoz tartozott az ilyen sűrűn vett 30-30 nádszál. Ezekből a vízi oldalon három négytagú klónt, öt kéttagú klónt, kilenc egytagú klónt, a part felőlin hat kéttagú klónt mutatunk ki, a többiek egytagút alkotottak. A vízfelőli oldalon három olyan klónt is találunk, amelyikbe más klónok nyomultak be, így pl. egy kéttagú klón nádszála egymástól 35 méterre esnek.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a víz felőli oldalon kisebb a diverzitás, mint a part felőli szélén. Hogy a nádas belsejében mekkora, azt a Balaton északi partján Alsóórsnél egy 40 m × 40 m-es területen vizsgáltuk, ahol a 95 minta összesen 74 klónhoz tartozott. Volt egy klón, amelyik 5 mintát, két klón, amelyik 3 mintát, tíz klón, amelyik 2 mintát és 64 klón, amelyik egy mintát tartalmazott. A legnagyobb klón 30 méternél is hosszabb, a nádas zömét azonban a 4 méter átmérőnél kisebb klónok foglalták el. A klónok száma még sűrűbb mintázással bizonyára még tovább fokozható.

4.3. A nádasokon belüli gén diverzitás és genetikai távolság

A gén diverzitás, Shannon diverzitás és genetikai távolság számításánál az egy klónhoz tartozó mintákat egy egységként vettük figyelembe.

A Bodeni-tó és az Osterseen állományaiban nemcsak a klónok száma, de a gén diverzitás is kisebb volt, mint a sekély magyar tavakban. A négy németországi állományban a gén diverzitás 0,15-0,16, a Fertőben 0,22-0,28, a Balatonban 0,24-0,29 tartományban mozgott, míg a Kis-Balatonban 0,48 volt. A Shannon diverzitás nagyon hasonló változást mutatott. Értéke a német tavaknál 0,22-0,26, a Fertőnél 0,32-0,41, a Balatonnál 0,36-0,43 tartományban mozgott, a Kis-Balatonnál 0,48 volt.

Az egyes állományokon belül páronként kiszámítottuk a klónok közötti genetikai távolságokat. Az átlagos genetikai távolság a német tavakban 0,18-0,22, a Fertőben 0,26-0,37, a Balatonban 0,32-0,36 között változott, míg a Kis-Balatonban 0,47 volt. Az állományokon belüli genetikai távolságok maximuma a német tavakban 0,33-0,47 a Fertőben 0,49-0,72, a Balatonban 0,72-0,89 között változott, a Kis-Balatonban 0,93 volt.

Mind a gén diverzitások, mind az állományon belüli genetikai távolságok a német tavakban voltak a legalacsonyabbak, és ebben a tekintetben a Bodeni-tó és az Osterseen négy állománya között alig volt különbség. A Fertő és a Balaton nádasainak adatai eléggé hasonlítanak egymáshoz, és a Kis-Balatoné megint a legmagasabb.

4.4. A genetikai és földrajzi távolságok összehasonlítása

A populációk genetikai szimilaritási együtthatói alapján szerkesztett UPGMA dendrogram szerint a Fertő-tó három állománya a leghasonlóbb. Ezekhez kapcsolódik nagyon hamar a Kis-Balaton nádasa. A Balatonban a Kerekedi-öböl és Máriafürdő kapcsolódnak először össze, majd csatlakoznak a Fertő-Kis-Balaton klaszterhez, és csak később kapcsolódik hozzájuk a Bozsai-öböl nádasa. Az Osterseen két nádasa kb. annyira különbözött egymástól, mint a máriafürdői a Kerekedi öbölétől. Az Osterseen ezután a magyarországi sekély tavakhoz kapcsolódik, és nem a sokkal közelebbi

Bódeni-tóhoz. A Bódeni-tó két nádas viszonylag kis szimilaritásnál kapcsolódik össze, hogy még kisebb szimilaritásnál csatlakozzék a többi tóhoz.

A 11 állományra páronként meghatároztuk a genetikai és a földrajzi távolságokat. A Fertő három állománya 10 km-nél közelebb van egymáshoz, és genetikai távolságuk 0,02-0,03. A Kis-Balaton a Fertő állományaitól 115-125 km-re esik, genetikai távolsága pedig ezektől csak 0,07-0,08, míg Márafürdőtől a távolsága mindössze 18 km, genetikai távolsága viszont 0,18. A három balatoni nádas a három fertő-tavától 106-129 km-re esik, genetikai távolságaik pedig 0,11-0,19 tartományban változnak. Az Osterseen nádasai 402-412 km-re vannak a három Fertő tavi állománytól, genetikai távolságuk 0,23-0,29. Ez valóban nagyobb földrajzi és genetikai távolság, mint a Fertő és Balaton közötti. Az Osterseen és a Bódeni tó állományai közötti távolság azonban csak 159-168 km, a genetikai távolság mégis 0,33-0,52. A Bódeni tó két állománya között is 0,26 a genetikai távolság, és feltűnően messze esnek ezek a nádasok genetikailag a többi tavakétól. Az Untersee még a Waschseehez van genetikailag a legközelebb (0,33), az összes többi nádastól azonban 0,44-0,52 távolságokat találtunk. Az Überlinger-see nádasának a genetikai távolsága a többi tavakétól 0,34-0,53 tartományban változik. A Mantel teszt kapcsolatot mutat a 11 állomány földrajzi és genetikai távolsága között ($r=0,729$, $p=0,0001$), ami a 2 német tónak a magyar tavaktól eltérő genetikai jellegéből adódik. A kérdés, hogy az eltérő jelleg mennyire a földrajzi távolság következménye, és mennyire adódhat más okokból, pl. a két tó izoláltságából vagy nádasaik eltérő korából. Utóbbi okokra látszik utalni az, hogy a két tóban nagyon alacsonyak a populáción belüli gén diverzitások.

Következő lépésben minden állományból véletlenszerűen kiragadtuk egy-egy nádszál adatait, és ehhez hozzávettük a Magyarországon a Dunántúlon, Tiszántúlon, Ukrajnában a Kárpátalján, Romániában az Erdélyben és a Duna-deltában összesen még 10 másik nádasból gyűjtött egy-egy klón adatait, majd páronként kiszámítottuk a így kapott 21 minta genetikai és földrajzi távolságait. A két minta közötti legkisebb genetikai távolság így 0,21, a legnagyobb 1,0 volt, a genetikai távolságok átlaga 0,5-nek adódott. A genetikai távolságokat a földrajzi távolságok függvényében ábrázolva nem látszik összefüggés, és ilyet a Mantel teszt sem mutat ($r=0,104$, $p=0,129$).

5. Eredmények megvitatása

5.1. A klonális diverzitást befolyásoló tényezők

A vegetatív szaporodás a növényvilágban nagyon elterjedt. Angliában pl. a virágos növények közel fele klonális. A klonális fajok nagyobbik részénél a magoncokból egy diverz kiinduló populáció alakul ki, a már kialakult állományban azonban ritka a magról való további szaporodás. Az ilyen állományoknál azt várnánk, hogy csökkenjen a klonális diverzitás, de rendszerint jelentős diverzitást észleltek, és kivételes a monoklonális állomány (Ellstrand and Rose 1987). Bengtsson (2003) modellje szerint az olyan populációk, amelyek sok ivaros eredetű propagulumból indultak ki, nagyon hosszú ideig megtarthatják kezdeti genotípusos változatosságukat akkor is, ha majdnem kizárólagosan ivartalanul szaporodnak. A szárazföldön álló, kialakult nádas majdnem kizárólag ivartalanul szaporodik, a vízben álló viszont teljesen kizárólag.

A várakozásnak megfelelően valóban azt találtuk, hogy a nádasok parti oldalán, ahol időnként lehetséges a magoncoktól való megújulás, nagyobb a diverzitás, mint a nyíltvíz felőli részen. A mély vízben valóban a legfiatalabb állományban, a Kis-Balatonban volt a legnagyobb a diverzitás, ahol a legnagyobb klón is csak 15 méter volt, és a legöregebben, a bódeni-taviban a legkisebb, ahol 100 méter hosszú klónt is találtunk. A Fertő és a Balaton nádasai, melyeknek korát egyaránt 140 év körülire tettük, egymáshoz eléggé hasonló diverzitást mutattak. Ez a diverzitás azonban magas, és még a Bódeni-tó nádasai is poliklonálisnak bizonyultak, ami azt mutatja, hogy a diverzitás csak lassan csökkenhet, és a klónok közötti verseny nem lehet erős. Minthogy a Balatonban a magas diverzitás mellett is nagy nádpusztulás volt, nem valószínű, hogy a genetikai diverzitás csökkenésének jelentős szerepe lehetne a pusztulási folyamatban.

Újabban Curn és munkatársai (2007) két ismert korú tavacska nádasait hasonlították össze. Az egyik az Opatovicky halastó, amely 1510 és 1514 között készült, a másik az 1970 és 1994 között létesült Hlámky bányató. A halastó 9 állományából vettek egyenként 200 m-es szakaszokon 5-5 mintát, a bányatóban pedig 7 állományból egyenként 100 m-es szakaszokon ugyancsak 5-5 mintát. A halastóban a

9-ből 5, a bányatóban a 7-ből 4 állomány bizonyult monoklonálisnak. A halastó esetében feltehető, hogy a monoklonális állományok valóban úgy keletkeztek, hogy fél évezred alatt a legmegfelelőbb klón kiszorította a többit, de a bányatóban a 40 év ehhez aligha elegendő. Kisegítő magyarázatként az szolgál, hogy a bányató esetében egyes helyeken kevés magonc lehetett a parton a kiinduló állományban, és így jöttek létre monoklonális állományok. Ez lehetséges, de az is, hogy odasodródott rizómákból indultak ki a nádasok olyan helyeken, ahová a partról egyébként nem kerülhettek. Kérdésesnek látszik az is, hogy nem alakulhattak-e ki a halastóban és másutt is úgy a monoklonális állományok, mint a bányató fiatal nádasában, és miért vannak az ötszáz éves halastóban poliklonális állományok is?

Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a nádasok klonális szerkezetének kialakításában azok korán kívül a megtelepedés módjának is nagy szerepe lehet. Utóbbiban három alaptípust különböztetünk meg. Az elsőben egy nádcsomó kivetődik a partra, ahol egyébként nem nő nád, ott megtelepszik, és monoklonális állomány alakul ki belőle minden versengés nélkül. A másodikban valóban a parton szaporodik el magról az állomány, és ennek rizómái hatolnak azután egyre mélyebben a tóba. A klónok közötti verseny két részből állhat, ki tud a még szabad területből mennél többet gyorsan elfoglalni, és azután ki tudja a másikat a már elfoglalt területről kiszorítani? Hogy az állomány mennyire lesz sokszínű, az a kiinduló parti nádas diverzitásától is függhet. Hullhat sok vagy kevés, termékeny vagy kevésbé termékeny mag az adott területre, ahol kedvezőek vagy kedvezőtlenebbek a csírázási viszonyok és a magoncok túlélési lehetőségei. Így azután többen vagy kevesebben indulnak a versenyen. A harmadik mód az, ahogyan a sekély vizeink nádasai keletkeztek. Az ideiglenesen kiszáradt tófenékre hullott magokból nagyon sokszínű állomány nő fel, amelyet utólag áraszt el a víz. Később ezek az állományok is beljebb terjeszkedhetnek a tóban. Az, hogy a Balatonban a másfél évszázados állomány is változatos, nemcsak annak a következménye, hogy ha sok klón el is tűnt, még így is sok maradt, hanem annak is, hogy sok klón között bizonyára többen vannak, amelyek a külső körülményeknek hasonlóan felelnek meg.

Sekély tavakban a diverzitáshoz az is hozzájárulhat, hogy aszályok idején a nádas egy része szárazra kerül. Bár zárt állományokban nincs sok esélye a magoncról való fejlődésnek, azt teljesen kizárni nem lehet. Ha azonban elő is fordul ilyen gén

beáramlás, annak intenzitása nagyon korlátolt lehet, tehát a klónoknak a versengésből vagy egyéb okból való mortalitása a kifejlett állományokban kicsiny.

5.2. A nád populációk genetikai diverzitása és a populációk földrajzi és genetikai távolsága

Nybom és Bartish (2000) 41 növényfaj RAPD elemzésének adatait összegyűjtve azt találta, hogy a szélporozta növények populációiban a genetikai diverzitás átlag 0,29, ami sokkal magasabb, mint a rovar beporzásúaké, és a hosszú életű évelő növényeknél az átlag 0,24, ami a duplája az egynyáriakénak. A nád hosszú életű, szélporozta növény. A Balaton és a Fertő nádasaiban a gén diverzitás jól megfelel a Nybom és Bartish (2000) által megadott értékeknek, annak ellenére, hogy klonális növény, és régen vízben álló, tehát ivaroson nem szaporodó állományokról van szó. A Kis-Balatonban észlelt 0,33-as érték viszont rendkívül nagy. Talán ez a legfiatalabb állomány hasonlíthat a legjobban szárazföldiekhez. Ez a nagyon magas, még a nyitvatermőkét is meghaladó érték a nagy távolságról történő szélporzásra utal. Talán hasonló lehetett a balatoni és fertő-tavi populációk kiinduló értéke is. A kérdés vizsgálatára jó lenne szárazföldi nádas állományokat vizsgálni. A Bódeni-tó és az Osterseen nádasainak a szélbeporzású növényekéhez képest alacsony gén diverzitása a beltenyészet, genetikai sodródás és természetes szelekció következménye lehet, és a populációk öregségét és izoláltságát jelzi.

A populációkon belüli genetikai távolságok és a populációk közötti genetikai távolságok között könnyen értelmezhető kapcsolat mutatkozik. A három magyarországi víz állományaiban nagy a gén diverzitás, és az állományok genetikailag közel vannak egymáshoz. Ez arra utal, hogy kialakulásukkor intenzív lehetett a szél okozta génáramlás viszonylag nagy területen belül. A két német tóban kicsiny a gén diverzitás és a vele szorosan összefüggő állományon belüli genetikai távolság, ezek tehát izolált állományok lehetnek. Erre utal az is, hogy a közöttük lévő genetikai távolság sokkal nagyobb, mint amekkorát a földrajzi indokolna. Valószínűnek látszik ezért, hogy a magyarországi sekély tavaktól való különbözőségüket sem csupán a nagyobb földrajzi távolság okozza, hanem más elkülönítő tényezők is, mint például a domborzati viszonyok és a széljárás.

Gondolnunk kell arra is, hogy az egyes tavakban egészen más korban alakulhattak ki a nádasok.

A genetikai és földrajzi távolságok kapcsolatát különböző stratégiákkal lehet vizsgálni. A korlátozó tényező rendszerint a megvizsgálható minták száma. A korai vizsgálatoknál nagy területről számos tóból vettek egy-egy mintát (Koppitz, 1999). Az eredmények arra látszottak utalni, mintha nőne a genetikai távolság a földrajzival, de az eredmények nem voltak egyértelműek. Újabban (Lambertini et al., 2006) részletesen vizsgálták a Pó-síkság gazdag nádas állományát, és az itt gyűjtött sok nádszál adatait vetették össze páronként Európa számos nádasának egy-egy klónjával. Azt találták, hogy 500 km-ig nem nőtt a genetikai távolság a földrajzival, 500 és 1500 km között is csak 10 %-ot, majd afölött további 10 %-t emelkedett. Ebből arra lehetett következtetni, hogy az Európa nagy területén a nádas egyetlen metapopulációt alkot.

Mi, ha 21 populációból 1-1 klónt választottunk ki, és páronként számoltuk a távolságukat, nem találtunk kapcsolatot a földrajzi és genetikai adatok között, ami arra utal, hogy általában valóban nagy a genetikai keveredés a térségen belül. Ha viszont populációkat hasonlítottunk össze, kitűnt, hogy a magyar vizek nádasai között nagyon intenzív lehet a génáramlás, a két német tórendszer viszont izolált. Ezt a munkát nagy távolságra lévő populációk vizsgálatával lenne érdemes folytatni. Az eddigi irodalmi és saját adatok alapján úgy látszik, hogy nagyon nagy területen intenzív a gén áramlás, de léteznek elszigetelt területek is. Mivel nagy az állományokon belüli variabilitás, a sajátos populációkat csak több minta vizsgálatával lehet megkülönböztetni.

A génáramlást a szél által szállított pollen és mag okozza, de hozzájárulhatnak a víz vagy emberi tevékenység által terjesztett magvak és rizóma darabok is. A nád ivaros szaporodásáról viszonylag kevés az adat (Haslam, 1973, McKee and Richards, 1996, Ishii and Kadono, 2002). A virágok nagyon változó, de rendszerint kis hányada érlel csak magot. Másrészt viszont egy virágzatban több ezer virág van, egy m²-en pedig kb. 100 nádszál, ezért ha a nádszálak egy része hoz is csak virágzatot, és a virágok kis része terem csírázó képes magot, ez akkor is hatalmas terjedési potenciált jelent. Ha valahol, pl. útépitéshez feltörik a földet és eltávolítják az eredeti növénytakarót, vagy szárazra kerül egy vízmeder, ott nagyon gyorsan jelenik meg a nád. Ezt láthattuk a Balatonban az 2000-2003 évi aszály során kibukkanó homokzátanyokon is.

Észak-Amerikát az Európából behurcolt M haplotípus egy évszázad alatt előzönlötte (Saltonstall, 2002), ami mutatja, mennyire invazív a nálunk uralkodó nád. A nádat talán azok közé a klonális növények közé sorolhatjuk, amelyek a nagy távolságú terjeszkedést szolgáló sok apró magvat termelnek, és a helyi terjeszkedést szinte kizárólag vegetatív úton oldják meg (Eriksson, 1992).

A kivételes ökofiziológiai tulajdonságok, a nagy klonális és gén diverzitás, a klónok ökológiai tűrőképessége és a magok hosszútávú terjedése együttesen segíthetik a nád rendkívüli nagy elterjedését.

6. Új tudományos eredmények

1. A Balaton összes megvizsgált nádasa poliklonálisnak mutatkozott, a nádpusztulást tehát nem okozhatta a klonális diverzitás csökkenése.
2. A Bódeni tó nádasainak korát 200 évnél hosszabbra tehetjük. Nagyon öregek az Osterseen nádasai is. A Fertő és a Balaton vízfelőli állományai 140-150 évesek. A legfiatalabbak a Kis-Balaton nádasai. Mindegyik nádasból a víz felőli és partfelőli szélen 150 vagy 200 méteres szakaszon 10-10 nádmintát vettünk. A víz felőli oldalon a Bódeni-tó két nádasában 4 és 5, az Osterseen nádasában 6 és 7, a Fertőében 5, 8 és 8, a Balatonéban 6, 6, 7 és 8, A Kis-Balatonéban 10 klónt találtunk. A partfelőli sávban ennél is nagyobb volt a diverzitás. Az állandóan vízzel borított területeken a klonális diverzitás az idővel csökken, ez a csökkenés azonban lassú, azaz a klónok közötti versengés nem lehet túlságosan erős, hiszen a legöregebb nádasok is poliklonálisak.
3. Az 5 méterenként vett 30-30 minta a vízfelőli oldalon az alsóörsi nádasnál 13, a bozsainál 11, a zalavárinál 17 klónhoz a part felőli oldalon az alsóörsinél 30, a bozsainál 20, a zalavárinál 23 klónhoz tartozott.. Az alsóörsi nádas belsejében 40 m x 40 m területről 4 m x 4 m rács szerint vett 95 nádszál 74 különböző klónt mutatott. A terület zömét tehát 4 m-nél kisebb átmérőjű klónok borították. A rametek mérete ennél csak kisebb lehet.
4. A gén diverzitás a négy német állományban 0,15-0,16, a hat magyarban 0,22-0,36 tartományban mozgott. Nagyon hasonló tendenciát mutatott a Shannon diverzitás is. Az állományokon belüli átlagos genetikai távolság a német tavakban 0,18-0,22, a magyarokban 0,26-0,51 volt. A Bódeni-tó és az Osterseen állományainak alacsonyabb értékei a nádasok öregségére és elszigeteltségére utalnak, míg a hazai nádasok magasabb értékei intenzív hosszú távú génáramlást valószínűsítene.
5. Genetikailag a Kis-Balaton, a Balaton és a Fertő-tó nádasai nagyon közel vannak egymáshoz, de a Kis-Balaton nádasa közelebb esik a Fertő-tavi állományokhoz, mint a földrajzilag sokkal közelebbi balatoniakhoz. Az Osterseen nádasai is közelebb vannak a Fertő állományaihoz, mint a

földrajzilag sokkal közelebb lévő Bódeni-tóéhoz. A nádasok genetikai távolságában nagy szerepe lehet azok izoláltságának és kialakulásuk idejének, amiben több száz éves különbségek is lehetnek. A Bódeni-tótól a Duna-deltáig öt ország 21 nádasából vizsgáltunk meg egy-egy nádszálat, és páronként összehasonlítva azok genetikai és földrajzi távolságát. A genetikai távolság nem nőtt a földrajzival. Ez egy nagy meta-populációt jelez az 1600 km-es távolságon belüli erős génáramlással.

6. A nád azok közé a növények közé tartozik, amelyeknek apró magvai a hosszú távú terjedést szolgálják, míg a kialakult állományok vegetatív úton oldják meg a terjeszkedést. Az állományok klonális szerkezete alapvetően függhet a kialakulásuk módjától. Partra vetődött rizóma kötegből könnyen alakulhat ki monoklonális állomány. Ha a parton szaporodik el magról a nád, és ennek rizómái hatolnak egyre mélyebben a tóba, közepesen diverz állomány várható. Sekély vizeinkben viszont az ideiglenesen kiszáradt fenékre hullott magból nagyon sokszínű kiinduló állomány nőhet fel, melyet utólag áraszt el a víz.

Az értekezés témakörében megjelent közlemények:

Nemzetközi folyóiratcikk

V. LUKÁCS, A. MÁNDY, S. HERODEK, GY. BISZTRAY, (2009): Genetic diversity and plasticity of the reed and ornamental value types, International Journal of Horticultural Science (in press)

Magyar nyelvű folyóiratcikkek

LUKÁCS V., MAJOR Á., HERODEK S., (2007.): Balatoni nádasok klonális diverzitásának vizsgálata RAPD-PCR módszerrel. Bot. Közlem. 94 (1-2), 133-140.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2007): Balatoni nádasok genetikai diverzitása. Hidrológiai Közlöny, 87 (6), 99-101.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2008): Változik e a nád klonális diverzitása a vízmélységgel a Balatonban? Hidrológiai Közlöny, 88 (6), 125-126.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2009): Fertő-tavi és kis-balatoni nádasok genetikai diverzitása. Hidrológiai Közlöny, 89 (6), 36-38.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2009): A Bódeni-tó, az Osterseen és a Mondsee nádasainak genetikai diverzitása. Kertgazdaság, 41 (1): 59-64.

HERODEK S., TÓTH V., LUKÁCS V., (2005): Ép és pusztuló balatoni nádasok összehasonlító kutatása II.: A 2004. évi eredmények. – In: A Balaton kutatásának 2004. évi eredményei. (Szerk.: Mahunka S., Banczerowski J.), Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, ISSN 1419-1075, p. 65-74.

Ismeretterjesztő könyv részlet:

HERODEK S., TÓTH V., ZLINSZKY A., LUKÁCS V., (2009): Mitől pusztulnak a nádasok? A Balaton kutatásról mindenkinek, BLKI Kiadó, VSP Nyomda, Várpalota p: 155-168.

Konferencia kiadványok

Magyar nyelvű teljes cikk

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2006): A nád genetikai diverzitásának vizsgálata PCR-RAPD módszerrel a Balaton térségében. - *In: Tavaszi Szél*, 2006, Kaposvár: DOSZ, ISBN 9632297733, p. 92-95.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2007): A nád klonális diverzitásának vizsgálata PCR- RAPD módszerrel a Balaton három nádasában. - *In: Tavaszi Szél*, 2007. május 17-20: Bp. Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem: Budapest: DOSZ, ISBN 9638756916, p. 258-263.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2008): Németországi és ausztriai mély tavak nádasainak genetikai diverzitása, *In: Tavaszi Szél*, 2008. május 23-25: Bp. Károli Gáspár Református Egyetem: Budapest, DOSZ, ISBN: 978-963-87569-2-3, p. 658-664.

LUKÁCS V., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2008): Külföldi és hazai nádasok genetikai diverzitásának vizsgálata, *In: Georgikon Napok*, 2008. szeptember 25-26.:Keszthely: Keszthely, CD Kiadvány, ISBN: 978-963-9639-32-4.

Magyar nyelvű absztrakt

LUKÁCS V., MAJOR Á., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2005): A balatoni nád citogenetikai vizsgálata, 2005. október 5-7. Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany, XLVII. Hidrobiológus Napok (Programfüzet: 25.)

LUKÁCS V., MAJOR Á., BISZTRAY GY., HERODEK S., (2005): A balatoni nád citogenetikai vizsgálata, Lippay-Ormos-Vas Tudományos Ülésszak (2005. október 19-21.) Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar, Összefoglalók (76-77.)

HERODEK S., TÓTH V., ZLINSZKY A., LUKÁCS V., (2007): A balatoni nádasok kutatásának újabb eredményei. – *MHT Közép-dunántúli Szekciójának ülése, Székesfehérvár, 2007. július 5.*

Nemzetközi absztrakt

S. HERODEK, V. LUKÁCS, GY. BISZTRAY, (2007): Genetic diversity of the reeds of Lake Balaton, 30th Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology SIL (2007. augusztus 12-18. Montreal) (Final Programme, 44.)