

DNS-alapú módszer alkalmazásának bemutatása a mezőgazdaságban *Poa* fajok molekuláris taxonómiai vizsgálata alapján

Zubor Ákos¹ – K. Szabó Zsuzsa² –
Nyakas Antónia² – Papp Mária³ –
Györi Zoltán¹ – Prokisch József¹

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

¹Élelmiszertudományi és Minőségbiztosítási Tanszék, Debrecen
²Mezőgazdasági Növénytan és Növényélettani Tanszék, Debrecen
³Debreceni Egyetem,
Természettudományi Kar,
Növénytan Tanszék, Debrecen
a.zubor@freemail.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink modern mezőgazdaságában megkerülhetetlen szerepet játszanak a molekuláris biológiai módszerek, ezek közül is a molekuláris taxonómiában kiválóan alkalmazható AFLP. E módszer tökéletesítésével perje fajokat vizsgáltunk, melyek fontos állományalkotó rét-, legelőfajok és minél sokrétűbb ismeretük szükségszerű a biodiverzitás fenntartásában.

A *Poa pratensis* L. (réti perje) fajcsoport tagjainak taxonómiai viszonyai nemzetközileg is vitatottak. Célunk az volt, hogy az AFLP módszer továbbfejlesztett változatával a Debrecen környéki gyepekben állományalkotó *Poa* fajok példányainak molekuláris taxonómiai vizsgálatán keresztül megkezdjük a rokonsági kör tagjainak azonosítását, genetikai távolságuk feltárását. Vizsgálataink alapján a fajcsoport fajai genetikailag nagy variabilitást mutatnak, genetikai közelségük igazolja a fajcsoport taxon használatát. Eredményeink megalapozták a fajcsoport három fajának minél szélesebb földrajzi léptékben történő vizsgálatát, a habitusuk és morfológiai bélyegeik alapján meghatározott *Poa* példányok különállóságát genetikai alapon is igazoltuk. A módszer alkalmasnak bizonyult a *Poa* fajok, ezen belül a réti perje rokonsági kör molekuláris taxonómiai vizsgálatához.

Kulcsszavak: DNS polimorfizmus, AFLP, molekuláris taxonómia, *Poa pratensis* aggregáció

SUMMARY

Modern days agriculture requires modern molecular biological methods, one among them is AFLP that is well applicable for taxonomic research. Bluegrass species, that are important components of meadow associations, thus their thorough knowledge is necessary in maintaining biodiversity, were examined with bringing this method to perfection.

Taxonomic relationship of the members of *Poa pratensis* aggregation is a controversial issue. Present study aims to identify the members of this group, with a developed AFLP method through molecular taxonomic examination of *Poa* species in meadows nearby Debrecen, revealing their genetical distances. Species of the aggregation show a great genetic variability, but

their genetic proximity approves the use of the term aggregation. Results established wider geographical investigation of three species of the aggregation. The distinctness of the species based on their morphological features was confirmed according to their genetical basis as well. The method overall turned out to be appropriate for the taxonomic research of bluegrass species like *Poa pratensis* and its aggregation.

Keywords: DNA polymorphism, AFLP, molecular taxonomy, *Poa pratensis* aggregation

BEVEZETÉS

A perje fajok intenzív és természetes legelőink, réteink társulásalkotó fajai, élőhelyeik megfelelő kezelése, a biodiverzitás fenntartása aktuális kihívása napjaink rét-, legelő gazdálkodásának. Ehhez elengedhetetlen ezen fajok rokonsági viszonyainak és ebből adódóan az egyes taxonok ökológiai igényeinek tisztázása.

A *Poa pratensis* L. (réti perje) fajcsoport fajainak taxonómiai helyzete Európa-szerte tisztázatlan. Fajsztintú elkülönültségük hazánkban is vitatott több szerzőnél (Jávorka, 1925; Soó és Jávorka, 1951; Soó és Kárpáti, 1968; Soó, 1973; Hubbard, 1984; Hayward, 1988; Simon, 1992, 2000; Turcsányi, 1995; Grau et al., 1998; Priszter, 1986, 1998; Barcsák et al., 1978; Penksza, 1999; Papp et al., 1999; Penksza és Böcker, 2000). E fajok egyedei fenotípusosan igen változatosak, adaptációs folyamatok révén élőhelyi variációik alakulhatnak ki. Európa flóraműveit áttekintve a *Poa pratensis* L. fajcsoport tagjainak számos közel rokon fajára, alfajára, változatára, alakjára akadunk (1. táblázat). Mivel ezeknek a taxonoknak az elterjedése sajnos ez idáig tisztázatlan, nem kizárt, hogy egy részük szinonim neveket takar. Ezért szükséges a fajcsoport taxonómiai felülvizsgálata. Első lépésként a fő genetikai vonalakat igyekeztünk körvonalazni kis földrajzi léptékben.

A *Poa pratensis* L. fajcsoport összetétele néhány európai szerző szerint

Forrás(1)	Az aggregáció fajai(2)	Szinonimák és faj alatti taxonok(3)
Soó (1973)	<i>P. pratensis</i> , <i>P. angustifolia</i> L., <i>P. subcaerulea</i> , <i>P. rigens</i> , <i>P. stiriaca</i>	ssp. <i>vulgaris</i> Gaud., <i>P. eupratisensis</i> Hay., <i>P. latifolia</i> Schwarz, <i>P. complanata</i> Schur, L. var. <i>pratensis</i> (<i>vulgaris</i> Gaud), var <i>macrostachya</i> Schur., var. <i>latifolia</i> Weiche, Koch, Schur., f. <i>pratensis</i> , f. <i>glauca</i> Lej. et Court, f. <i>colorata</i> Weiche ex Lej. et Court., subf. <i>arenaria</i> Capal., f. <i>flavescens</i> A. et G., f. <i>pubescens</i> Lej. (p. sp. <i>pilifera</i> Beck), f. <i>depauperata</i> Hack. Ex Hay., f. <i>brevifolia</i> KTZE., f. <i>macrostachya</i> , f. <i>brizoides</i> (Vill p. sp. A. et G.), f. <i>racemosa</i> Borb. Emend. Soó, f. <i>aspera</i> Podp., f. <i>trichopsis</i> Podp.
Tutin et al. (1980)	<i>P. alpigena</i> , <i>P. subcaerulea</i> , <i>P. pratensis</i> , <i>P. angustifolia</i>	<i>P. alpigena</i> ssp. <i>alpigena</i> , <i>P. irrigata</i> Lindman, <i>P. pratensis</i> L. ssp. <i>irrigata</i> (Lind.) Lindb., <i>P. athroostachya</i> Oett., <i>P.</i> <i>pinagensis</i> Roshev., <i>P. turfosa</i> Litv., <i>P. pratensis</i> ssp. <i>angustifolia</i>
Wisskirchen és Haupler (1998)	<i>P. pratensis</i> , <i>P. angustifolia</i> , <i>P. humilis</i>	<i>P. humilis</i> ssp. <i>lejeunii</i> Dumart., var. <i>lejeunii</i> (Dumart.), ssp. <i>angustifolia</i> (L.) Gaudin, var. <i>angustifolia</i> (L.) SM., ssp. <i>irrigata</i> (Lindm.) Lind. F., var. <i>strigosa</i> (Hoffm.) Gaudin, ssp. <i>pratensis</i> , var. <i>minor</i> (Wahlenb.), ssp. <i>latifolia</i> , var. <i>latifolia</i>

 Table 1: Composition of *Poa pratensis* aggregation according to some European authors

Source(1), Species(2), Synonyms and sub species taxa of the aggregation(3)

A modern mezőgazdaság az évezredek tapasztalatok mellett mindig is megkövetelte a kor szintjének megfelelő tudományos kutatások eredményeinek gyakorlati alkalmazását. A mai mezőgazdaságban egyre fontosabb szerepet játszanak a molekuláris biológia eredményei és ezek mind szélesebb körű alkalmazása. Az Agrártudományi Centrum Élelmiszertudományi és Minőségbiztosítási Tanszékének DNS laborja igyekszik lépést tartani az egyre megújuló technikákkal (Zubor et al., 2003). Laboratóriumunk két éve alkalmazza növényi és állati minták genetikai összehasonlítására a felerősített fragment hossz polimorfizmus (AFLP) módszert (Vos et al., 1995), mely eredményeinek megjelenítéséhez eddig poliakrilamid géles elektroforézist és ezüst festést használtunk (Sammons et al., 1981; Zubor et al., 2004). 2004-ben egy sokkal modernebb megjelenítési módra, a kapilláris elektroforézisre tértünk át, mely sokkal nagyobb felbontású, ezáltal részletesebb, pontosabb eredményeket szolgáltat. Az új módszert először a Mezőgazdasági Növénytan és Növényélettani Tanszékkel közösen végeztük, bekapcsolódva az ott folyó pázsitfű taxonómiai és ökomorfológiai kutatásokba (Nyakas és Molnár, 1999; K. Szabó et al., 2004a, 2005).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Különböző, Debrecen környéki legelőgyepek *Poa pratensis* (réti perje), *Poa angustifolia* (karsú perje), *Poa humilis* (kékly perje) mellékszár leveleiből vettünk mintákat. A fajcsoporton kívüli *Poa compressa* (laposszárú perje) és *Poa alpina* (havasi perje) példányok összehasonlításul szolgáltak, mint egyértelmű fajszintű elkülönülést mutató *Poa* fajok.

A mintavételi helyek és a minták jelölése:

Pallag (*P. humilis*-P.HUM1),
Mikepércs (*P. humilis*-P.HUM2),
Martinka (*P. angustifolia*-P.ANG3, *P. humilis*-
P.HUM3),
Józsa (*P. humilis*-P.HUM4),
Újfehértó (*P. compressa*-P.COMP1),
Bátorliget (*P. compressa*-P.COMP2),
Zsáka (*P. angustifolia*-P.ANG1),
Hajdúbágyos (*P. angustifolia*-P.ANG2),
Bagamér (*P. angustifolia*-P.ANG4, *P. pratensis*-
P.PRAT1),
Szarvas (*P. pratensis* Szarvas 59, termesztett
fajta-P.PRAT2),
Hochtor, Alpok, Ausztria (*P. alpina*-P.ALP).

A növényi mintákat begyűjtés után azonnal feldolgoztuk. A DNS kivonást ZenoGene DNS kivonó kittel végeztük, a DNS extraktumokat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Az AFLP módszert a következő lépésekben alkalmaztuk. A genomiális DNS-t 10 U EcoRI restriktív enzimmel 1 órán keresztül 37 °C-on emésztettük, majd 1 U TruII enzimmel 67 °C-on inkubáltuk. Az így feldarabolt genomiális DNS darabjaihoz AFLP adaptereket illesztettünk. A ligálás a következők szerint történt: 10 µl kettősen emésztett DNS-hez 1-1 µl (100 pmol) EcoRI és TruII adaptert, 2 µl ligációs puffert, 1 µl T4 ligázt és 8 µl H₂O-t adtunk. Az elegyet 2 órán keresztül 20 °C-on inkubáltuk.

Az AFLP PCR reakcióelegy összetevői: 2 µl emésztett és ligált DNS templát, 1 µl (10 pmol) EcoRI (ACC szelektív bázis kiterjesztésű, NED lézerindukciós festékkel jelölt) primer, 1 µl (100 pmol) TruII (CAG szelektív bázis kiterjesztésű) primer, 12,5 µl PCR MasterMix, 8,5 µl H₂O. A PCR ciklusok a következők szerint alakultak:

kezdeti denaturáció 94 °C 120 s,
 minden ciklus elején 94 °C 30 s,
 12 cikluson keresztül 65 °C 30 s,
 ciklusonként 0,7 °C-kal csökkenve,
 további 23 cikluson keresztül 56 °C 30 s,
 minden ciklus végén 72 °C 60 s,
 utolsó ciklusnál 72 °C 120 s.

A PCR-rel felszaporított és szelektált DNS fragmentumok megjelenítése kapilláris elektroforézissel történt (1. ábra) a Gödöllői Mezőgazdasági Kutatóintézetben.

1. ábra: *Poa* fajok AFLP mintázatának kapilláris elektroforézises megjelenítése

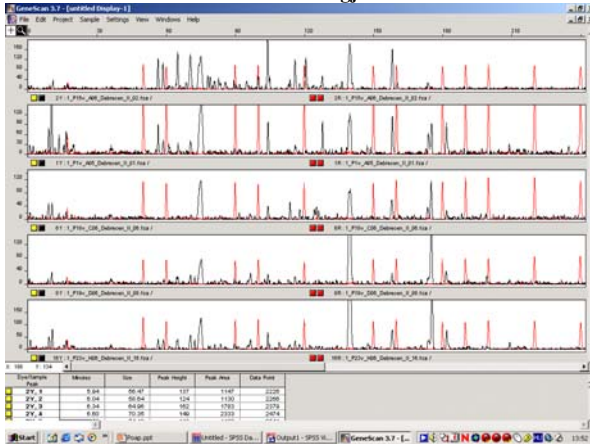


Figure 1: Capillary electrophoretic display of AFLP patterns of *Poa* species

Az eredményeket SPSS statisztikai programmal értékeltük ki. Hierarchikus kapcsolatokat kerestünk Jaccard féle hasonlósági index alapján (Podani, 1997), majd a hasonlósági mátrixba rendezett adatokat dendrogramon ábrázoltuk (2. ábra).

2. ábra: 5 *Poa* faj genetikai távolságának Jaccard indexszel végzett cluster analízise

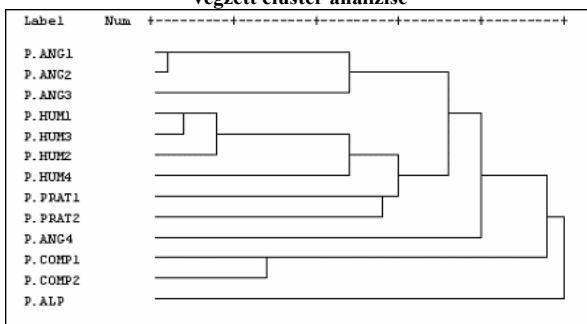


Figure 2: Jaccard index clusters of genetical distances of 5 *Poa* species

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A 2. ábrán lévő dendrogram alapján látható, hogy a módszer az összes vizsgált fajt elkülönítette. A *P. pratensis* fajcsoportba tartozó minták váltak szét a legmagasabb szinten a többi *Poa* fajtól, azaz a *P. compressa*-tól és a *P. alpina*-tól. Ez az eredmény az eddigi kutatásokkal megegyezően (K. Szabó et al., 2004a, 2005) megerősítette a *P. pratensis* fajcsoportba tartozó fajok taxonómiai közelségét, ezáltal igazolja a fajcsoport taxonómiai egység használatát ebben az esetben. Ezt az is alátámasztja, hogy a fajcsoporton belül a fajok elkülönülése a többi, nem a fajcsoportba tartozó fajokhoz képest alacsonyabb szinten történik, ugyanakkor a csoporton belüli genetikai változatosság igen nagy. A fajcsoportba tartozó, általunk vizsgált három faj közül a *P. angustifolia* elkülönülése a legnyilvánvalóbb. A 4. számú *P. angustifolia* minta látványos, igen magas szintű elkülönülését tekintve nem kizárt a hiba lehetősége. Ám megjegyezzük, hogy ez a példány morfológiai és anatómiai tekintetben is mutatott az általános faji jellemzőkön kívüli megkülönböztető bélyegeket (K. Szabó et al., 2004b). Megállapítható, hogy a fajcsoporton belül, a három faj közül a *P. pratensis* és a *P. humilis* genetikai hasonlósága a legnagyobb.

Eredményeinket összegezve:

- A *Poa pratensis* L. fajcsoport fajainak különböző élőhelyeken megtalálható populációi nemcsak fenotípusosan, hanem genetikailag is nagy variabilitást mutatnak.
- A fajcsoport fajainak genetikai közelsége igazolja a fajcsoport taxon használatát.
- A 4. számú *P. angustifolia*, valamint további mintapéldányok összehasonlítása választ adhat arra, hogy a kérdéses minta különálló taxonként értékelhető-e.
- Eredményeink megalapozták a fajcsoport három fajának minél szélesebb földrajzi léptékben történő vizsgálatát azzal, hogy Debrecen környéki gyepekben a habitusuk és morfológiai bélyegeik alapján határozott *Poa* példányok különállóságát genetikai alapon is igazoltuk.
- A módszer alkalmasnak bizonyult a *Poa* fajok, ezen belül a réti perje rokonsági kör molekuláris taxonómiai vizsgálatához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők szeretnének köszönetet mondani Dr. Borbély Györgynek és Dr. Surányi Gyulának (DE-TTK Növénytani Tanszék).

IRODALOM

Barcsák Z.-Tóth B.-Prieger K. (1978): Gyeptermesztés és -hasznosítás. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 74-77, 39.
 Grau, J.-Kremer, B. P.-Rambold, G.-Mösel, B. M.-Triebel, D. (1998): Füvek. Gunter Steinbach sor., München, 58-60.
 Hayward, J. (1988): A new key to wild flowers. Cambridge University Press, Cambridge, 247-250.
 Hubbard, C. E. (1984): Grasses. A guide to their structure, identification, uses, and distribution in the British Isles. London, 186-189.
 Jávorka S. (1925): Magyar Flóra. Magyarország virágos és edényes virágtalan növényeinek meghatározó kézikönyve. Akadémiai Kiadó, Budapest

- K Szabó Zs.-Papp M.-Penksza K.-Nyakas A. (2004a): Eltérő vízellátottságú homoki élőhelyek *Poa* taxonjainak összehasonlító morfológiai vizsgálata. Tájékológiai lapok, 2. 2. 259-265.
- K Szabó, Zs.-Nyakas, A.-Tanyi, P. (2004b): Habitat dependant morphological features of two *Poa* species. The 2004 Scientific Session of Oradea University, Oradea
- K. Szabó Zs.-Papp M.-Nyakas A. (2005): Öt *Poa* faj ligula anatómiája és morfológiája. Botanikai Közlemények (in press)
- Nyakas A.-Molnár E. (1999): Ökoanatómiai vizsgálatok egy natív/invázió faj (*Cleistogenes serotina* /L./ Keng.) levelén. X. Magyar Növényanatómiai Szimpózium programja és előadásainak, posztereinek összefoglalói, Debrecen, 116-117.
- Papp M.-K. Szabó Zs.-M. Hamvas M. (1999): Összehasonlító alaktani és anatómiai vizsgálatok a *Poa pratensis* L. és a *Poa angustifolia* L. hajtásain. Kanitzia, Szombathely, 7. 67-74.
- Penksza K. (1999): A magyar pázsitfű flóra új természetes tagja a hajsál perje (*Poa stiriaca* Fritsch & Hayek ex Dörfler). Kanitzia, Szombathely, 7. 51-58.
- Penksza, K.-Böcker, R. (2000): Zur Verbreitung von *Poa humilis* Ehrh. ex Hoffm. in Ungarn. Botanikai Közlemények, 86-87. 89-93.
- Podani J. (1997): Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeldtárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest
- Priszter Sz. (1986): Növényneveink. Magyar-latin szógyűjtemény. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 134.
- Priszter Sz. (1998): Növényneveink. A magyar és a tudományos növénynevek szótára. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 460.
- Sammons, D. W.-Adams, L. P.-Nishazawa, E. E. (1981): Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 2. 135-41.
- Simon T. (1992): A magyarországi edényes flóra határozója. Harasztok – Virágos növények, Tankönyvkiadó, Budapest, 746.
- Simon T. (2000): A magyarországi edényes flóra határozója. Harasztok – Virágos növények, Tankönyvkiadó, Budapest, 779.
- Soó R. (1973): A Magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve V. Akadémiai Kiadó, Budapest, 313-316.
- Soó R.-Jávorka S. (1951): A magyar növényvilág kézikönyve II. Akadémiai Kiadó, Budapest, 928-929.
- Soó R.-Kárpáti Z. (1968): Növényhatározó II. Tankönyvkiadó, Budapest, 757.
- Turcsányi G. (1995): Mezőgazdasági növénytan. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest, 362.
- Tutin, T. G.-Heywood, V. H.-Burgess, N. A.-Moore, D. M.-Valentine, D. H.-Walters, S. M.-Webb, D. A. (1980): Flora Europaea. Cambridge University Press, 5. 159-162.
- Vos, P.-Hogers, R.-Bleeker, M.-Reijans, M.-van de Lee, Th.-Hornes, M.-Frijters, A.-Pot, J.-Peleman, J.-Kuiper, M.-Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23. 21. 4407-4414.
- Wisskirchen, P.-Haupler, H. (1998): Standardliste der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. Ulmer, Stuttgart
- Zubor Á.-Surányi Gy.-Prokisch J.-Győri Z.-Borbély Gy. (2003): AFLP módszer alkalmazása növényi minták azonosításához. Agrártudományi Közlemények, 10. 207-213.
- Zubor, Á. A.-Surányi, Gy.-Győri, Z.-Borbély, G.-Prokisch, J. (2004): Molecular Biological Approach of the Systematics of *Crocus sativus* L. and its Allies. Acta Horticulturae, 650. 85-93.