

A DOLOMITLEN (*LINUM DOLOMITICUM*) GENETIKAI VÁLTOZATOSSÁGA ÉS POPULÁCIÓJÁNAK GENETIKAI SZERKEZETE

MAJOR ÁGNES¹ és DOBOLYI KONSTANTIN²

¹Magyar Természettudományi Múzeum, Molekuláris Taxonómiai Laboratórium

1431 Budapest, Pf. 137; E-mail: major@nhmus.hu

²Magyar Természettudományi Múzeum, Növénytár

1476 Budapest, Pf. 222; E-mail: dobolyi@bot.nhmus.hu

Vizsgálataink az endemikus *Linum dolomiticum* Borbás egyetlen, fragmentálódott populációja genetikai jellemzőinek megállapítására vonatkoztak. Százharminc egyed (16 alpopulációban) hagyományos populációgenetikai változatosságát írtuk le 16 izoenzimgénről kapott adatokkal, genotípusuk meghatározásával, mind egyedi, mind alpopulációs, illetve populációs szinten. Az alacsony szintű genetikai diverzitás tükrözte a faj endemikus voltát és viszonylagos genetikai beszűkültségét. Ugyancsak az izoenzimokről szerzett adatokat használtuk fel annak megállapítására, nyomon érhető-e a populáció közelmúltjában lezajlott genetikai palacknyak-hatás, amit az eredmények nem erősítettek meg. Egy 16 m²-es négyzet területén élő 160 egyed RAPD markereiről kapott térbeli autokorreláció-vizsgálat kimutatta, hogy finom léptékben matrilineáris csoportok jellemzik a fajt. Ugyanezek az adatok nem bizonyították az esetleges klonális növekedést. Mind az izoenzim, mind a RAPD eredmények leptokurtosisos terjedésre utaltak. Bizonyos alpopulációk differenciálódását tárta fel az exakt teszt, de nem találtunk korrelációt az alpopulációk differenciáltsága és térbeli távolsága között. A megvitatásban kitértünk lehetséges konzervációs és kezelési tevékenységekre is, amelyekkel a további genetikai elszegényedés kivédhető.

Kulcsszavak: endemizmus, finom léptékű térbeli genetikai szerkezet, genetikai változatosság, *Linum dolomiticum*, térbeli autokorreláció

BEVEZETÉS

Bennszülött növényfajunkat a *Linum dolomiticum*-ot Borbás Vince fedezte fel és írta le (BORBÁS 1897). Ma a faj Magyarországon fokozottan védett, veszélyeztetettnek minősített (FARKAS 1999, KVM 2001), szerepel a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) veszélyeztetett fajok vörös listáján (IUCN Species Survival Commission 2003), az Európai Unió Környezeti Információs Rendszere (CORINE) Biotop Projektjében (Commission of the European Communities 1995), a Berni Egyezményben (1979), a magyarországi Vörös Könyv-ben (RAKONCZAY 1989). A faj taxonómiai és ökológiai sajátosságait DOBOLYI (2008) foglalta össze.

A faj morfológiai változatossága csekély, elterjedési területe is rendkívül kicsiny: egyetlen, mintegy 1,5 km²-es élőhelye ismert a Budai-hegységben. A jelleg-

zetes élőhely nyílt vagy zárt dolomitsziklagyep. Az egyetlen populáció egyedei több, de igencsak korlátozott számú foltban élnek, amelyeket zárt erdős sávok és/vagy mély völgyek választanak el egymástól. Bár az élőhely a Budai Tájvédelmi Körzet szigorúan védett területén található, az intenzív turizmus és a területen terjedő feketefenyő (*Pinus nigra*) veszélyezteti a populációt. Kiemelt helyzete és a bizonyított antropogén fenyegetések – következésképpen nagyfokú növényzetpusztulás – ellenére a dolomitlen genetikai változatosságát, életmenet jellemzőit, szaporodási rendszerét, valamint a populáció tér- és időbeli dinamikáját eddig nem vizsgálták. Feltételezték, hogy idegen-termékenyülő, s az enyhén elfásodó, és bizonyos egyedeknek a természetéhez képest vastagnak tekinthető szára alapján hosszú élettartamú virágos növényként sorolták be. Felmerült a klonális növekedés lehetősége is, minthogy a növények foltokban találhatóak élőhelyükön. Nincs adat az egyedek lehetséges élettartamáról, a különböző korú egyedek térbeli eloszlásáról, a magbankról, a magoncok elhelyezkedéséről, az esetleges zoochoria előfordulásáról, a propagulumok megtelepedéséről vagy a környezeti tényezők iránti érzékenységről, míg a rovarok által történő beporzás ismert.

Ismeretes, hogy véletlen események (mint pl. genetikai sodródás, génáramlás) kis populációkban allélok elvesztését eredményezhetik, valamint helyi struktúra kialakulását, és a szelekció tekintetében neutrális allélokra mikrodifferenciálódást is okozhatnak. Így igen erőteljesen befolyásolják a populáció sorsát, kölcsönhatásban olyan jellemzőkkel és tényezőkkel, mint a szaporodási rendszer, az esetleges klonális növekedési képesség, az élőhelyként alkalmas foltok minimális száma, a környezet változatossága és a táj szerkezete. A *Linum dolomiticum* esetét tekinthetjük egy kis termetű faj, térben igen korlátozott, foltokból álló populációjának, amelyben a dinamikát erősen befolyásolják a környezeti hatások és azok fluktuációja: például az élőhely felszínének alakulása, az időjárás változásai, valamint jelentős emberi behatások. A feltételezhetően limitált pollen- és magterjedés, az egyedek foltjainak változatos egybeolvadása és szétszakadása, mind-mind érinti a lokális kipusztulás, majd újratelepülés folyamatait, a pánmiktikus egyensúlytól való eltéréseket, a genetikai szerkezet alakulását. A konzervációs célok eléréséhez elengedhetetlen a populáció genetikai szerveződésének, szerkezetének feltárása, mert ennek alapján lehetséges a fenntartás optimalizálása és a megőrzés.

Következésképpen az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- a) Milyen a *Linum dolomiticum* genetikai polimorfizmusa, tükröződik-e benne endemikus volta?
- b) Hogyan oszlik meg a genetikai változatosság a populáció egészében, a szubpopulációk ellenére pánmiktikusnak tekinthető-e, vagy az alpopulá-

ciók olyan foltok, amelyek között nincs, vagy korlátozott a genetikai információ áramlása (migráció stb.)?

- c) Ha van migráció a szubpopulációk között, az véletlenszerű, vagy a stepping stone modellt követi?
- d) Kaphatunk-e betekintést a szaporodási rendszerbe?
- e) Klonális növekedést ki tudunk-e mutatni, s ha igen, mekkora az egyes klónok átlagos mérete? (A nagyfokú klonális növekedés, vegetatív szaporodás növeli a genetikai sodródás valószínűségét, valamint a beltenyésztés esélyét, és jelentősen csökkentheti az effektív populációméretet.)
- f) A populáció dinamikájáról szerezhethetünk-e információt?

Mivel a dolomitsziklagyepek nagyon érzékenyek a fizikai megbontásra, és a védett területen a destruktív mintavétel szigorúan tiltott, nem tártuk fel dolomitlen egyedek gyökérzetét az esetleges klonális kapcsolatok kimutatására a szomszédos növények között. Nem-destruktív mintavétel (300 mg levélanyag) utáni tradicionális izoenzim-vizsgálatokat, és egy annál sokkal érzékenyebb molekuláris módszert, a RAPD-markerek vizsgálatát választottuk mind a klonalitás, mind a finom léptékű szerkezet feltárására. Ez utóbbi érdekében egy olyan szélső helyzetű foltban, ahol bőséges számban és nagy sűrűségben nőttek az egyedek, választottuk ki a megmintázandó területet, azt feltételezve, hogy elegendő nagy számú RAPD-marker esetén a módszer eléggé érzékeny ahhoz, hogy a várhatóan igen csekély izoenzim-polimorfizmus esetén is, annak nem elegendő feloldóképessége mellett is, kimutassa a klonalitást. Demográfiai adatok megszerzése érdekében az egyedek megjelenését és eltűnését vizsgáltuk egy kiválasztott 64 m²-nyi foltban, 6 éven keresztül. Ennek eredményeit egy másik cikkben foglaltuk össze, de felhasználhattuk a genetikai szerkezet kihatásainak megvitatásakor is (DOBOLYI 2006).

ANYAG ÉS MÓDSZER

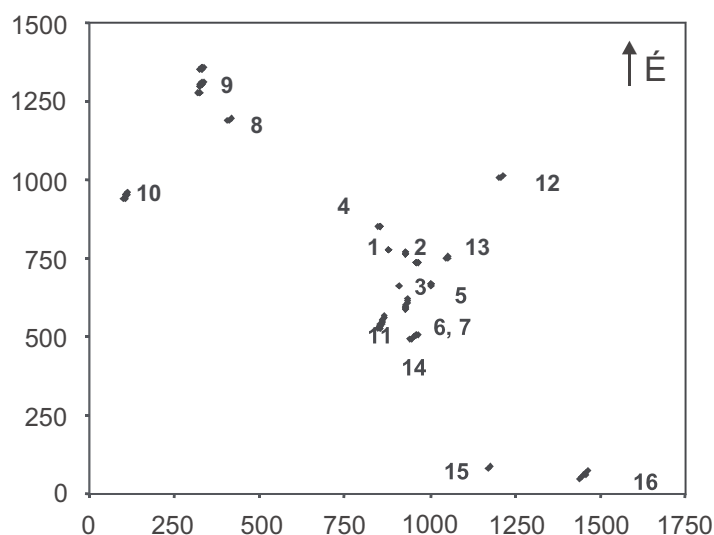
Mintavétel, növényi anyag

A populációban az elkülönülő területeket, amelyeken dolomitlen él, alpopulációknak tekintettük. Virágzó állapotban gyűjtöttünk leveleket (300 mg) 130 egyedről, a 16 elkülönülő foltból (1. ábra) úgy, hogy az alpopulációk megfelelően képviseltessék magukat. A megmintázandó növényeket az aktuális folt alakját követve, vagy egy transzekt mentén választottuk ki. A folton belül az egyedek helyét a foltra fektetett négyzethálón bejelöltük. A foltok középpontját GPS-szel határoztuk meg. Ily módon mindegyik minta relatív helyzetét azonosíthattuk.

Izoenzim-vizsgálatok

Az alábbi 11 izoenzimrendszert vizsgáltuk: alkohol dehidrogenáz (ADH, EC. 1.1.1.1), észteráz (EST, EC. 3.1.1.1, kolorimetrikus), glutamát-oxálacetát transzamináz (GOT, EC. 2.6.1.1), leucin aminopeptidáz (LAP, EC. 3.4.11.1), malát dehidrogenáz (MDH, EC. 1.1.1.37), menadion reduktáz (MNR, EC. 1.6.99.2), foszfoglukóz izomeráz (PGI, EC. 5.3.1.9), foszfoglukomutáz (PGM, EC. 2.7.5.1), 6-foszfoglukonsav dehidrogenáz (6PGDH, EC. 1.1.1.43), szuper-oxid dizmutáz (SOD, EC. 1.15.1.1, 2 gén), sikimisav dehidrogenáz (SKDH, EC. 1.1.1.25).

Az elválasztásokat keményítő és akrilamid gél-elektroforézissel végeztük: a 300 mg-nyi levelet folyékony N-nel porrá dörzsöltük, és az alábbi extraháló puffer 1 ml-ében olvasztottuk fel, maximum +4 °C-ig: 50 mM Tris(hidroxy-methyl)aminometán – HCl pH = 7.8, 0,15% citromsav, 0,1% L-cisztein, 0,1% L-aszkorbinsav, 5% polyvinylpirrolidone (Ms.: 40 000), 0,3% kálium-meta-biszulfit, 5% szacharóz (mindegyik w/v %), 100 µl 2-merkaptóetanol pro 100 ml extraháló puffer. A keletkezett sűrű keveréket centrifugáltuk (+4 °C, 8000 g) 10 percen át, majd a felülúszó kis mennyiségeit (20–40 µl) vittük fel az elektroforézis géljeire, vagy –80 °C-on tároltuk további felhasználásig. Az EST, GOT, LAP, PGI és PGM izoenzimek elválasztásához SOLTIS és mtsai (1983) 7-es pufferrendszerét alkalmaztuk 11%-os keményítő géllal, míg a 6PGDH és MNR



1. ábra. A terület vázlatos térképe: a *Linum dolomiticum* fragmentált populációja. A számok (1–16) az alpopulációkat (élőhelyfoltokat) jelölik. A térképen 1 koordináta-egység 50 m lineáris távolságnak felel meg.

esetében ARULSEKAR és PARFITT (1986) B-rendszerét és 11,5%-os keményítő gélt. Az ADH, MDH, SKDH és SOD izoenzimeit 10%-os Davis-féle akrilamid gélen szeparáltuk (DAVIS 1964). Az EST, GOT, LAP, ADH, MDH, SKDH és SOD festése oldattal, a PGI, PGM, 6PGDH és MNR izoenzimeké agar-felületregzéses módszerrel történt (CONKLE és mtsai 1982). Az elkülöníthető izoenzimgéneket az enzim neve után tett nagybetűvel jeleztük az ábécé sorrendjében, a leggyorsabb vándorlású lokusztól kezdve. Az egyes gének alléljait számokkal azonosítottuk, ahol is az 1-es a leggyorsabb változatot jelenti.

RAPD-markerek

A 9-es folt egyik, északnyugati részében lévő, legsűrűbb mikroareáját (4 m × 4 m) választottuk a RAPD-vizsgálatokhoz annak eldöntésére, hogy milyen lehet a szomszédos helyzetű egyedek genetikai viszonya, és az esetleges klonális foltok kimutatására. A területet egy 10 cm × 10 cm-es hálóval borítottuk le, majd 160 egyedet mintáztunk meg, a helyzetüket a négyzetháló szerint regisztrálva.

Genomi DNS-t vontunk ki 300 mg levélből DOYLE és DOYLE (1987) módszerével, amelyet kiegészítettünk egy magas sótartalom mellett végzett precipitációs tisztítási lépéssel (ALDRICH és CULLIS 1993). A fragmentumok PCR-es felszaporítását az Operon Technologies cég (Alameda, Kalifornia, USA) random dekamér primereivel végeztük. A PCR reakcióelegy összetétele: 50 ng genomi DNS, a Taq-polimeráz saját 1× PCR puffere, 0,4 μM primer (mindkettőre), 150 μM dNTP (mind a négyfelére), 0,8 U Taq DNS polimeráz enzim (Roche), 25 μl végtérfigatban. A PCR profilja: 3 perc 95 °C-os kezdeti denaturálás, 43 ciklusos felszaporítás, ahol 1 perc 94 °C, 1 perc 35 °C primerkötés, 2 perc 30 másodperc 72 °C szintézis szerepelt, és végső szálhosszabbítás 72 °C-on 10 percig, ABI 9700 PCR készülékben.

A felszaporított fragmentumokat 1,4%-os agaróz gélen választottuk el 0,5×-ös TBE pufferben 4V/cm feszültséggel, a jelzőfesték 16 cm-es futtatásáig. Ezután utólagos etidium-bromidos (1 μg/ml, 20 perc, 3 × 10 perc desztillált vízes mosás) festéssel jelenítettük meg, Kodak Polaroid GelCam kamerával dokumentáltuk.

ADATELEMZÉS

A következő hagyományos genetikai változatossági jellemzőket számítottuk ki: polimorf izoenzimlokuszok aránya (P_{\circ}), átlagos allélszám (N_a), effektív allélszám (N_e), allélgyakoriságok, Shannon-féle információs index $I = -\sum p_i \ln p_i$, ahol p_i az i -ik allél gyakorisága az egyes génekre (BROWN és WEIR 1983), meg-

figyelt heterozigócia (H_o), Hardy–Weinberg-féle várható heterozigócia (genetikai diverzitás) (H_e) a polimorf lokuszokra (kis mintaszámra korrigálva, LEVENE 1949, NEI 1978), és a Wright-féle beltenyészési koefficiens ($F = 1 - H_o/H_e$) (WRIGHT 1922), a heterozigóta-hiány vagy -túlsúly mértékeként. χ^2 -tesztet végeztünk a várható $F = 0$ értéktől való eltérés szignifikanciájának megállapítására, ahol $\chi^2 = NF^2(a-1)$, N a mintaszám, a az allélszám az aktuális génnél, a szabadsági fok pedig $df = a(a-1)/2$.

A multilokuszos pánmixtikus egyensúlytól való eltérést SMOUSE és mtsai (1983) soklokuszos analízismódszerével jellemeztük: r_e a gamétaegyensúlytól való eltérés effektív korrelációs mértéke egy populációra, a random gamétaegyesüléstől való eltérést pedig WHD értéke jelzi. Az első az egy lokuszpárra kapott standardizált disequilibrium, a második érték pedig a pánmixistól való eltérés jellemzője.

Az egyedek közötti páronkénti nem-súlyozott genetikai távolságot a PEAKALL és mtsai (1995), valamint SMOUSE és PEAKALL (1999) által sokalléles kodomináns génekre kifejlesztett additív genetikai távolsági metrikával adtuk meg. Egy kodomináns génnél az egyedpárookra genotípusuk szerint például az i -edik, j -edik, k -adik és l -edik allélokkal a következő súlyozatlan négyzetes távolsági értékkészlet adható meg: $d^2_{(ii, ii)} = 0$, $d^2_{(ij, ij)} = 0$, $d^2_{(ii, ij)} = 1$, $d^2_{(ij, ik)} = 1$, $d^2_{(ij, kl)} = 2$, $d^2_{(ii, jk)} = 3$, és $d^2_{(ii, jj)} = 4$. A soklokuszos távolsághoz az értékeket génenként összegezzük, mint $(d^2(L \text{ génre}) = \sum L_1 = I d^2_{ij})$, feltételezve, hogy a gének függetlenek egymástól. Mindegyik génre és az összes génre együttesen az $N \times N$ méretű távolsági mátrixot számítottuk ki. Ez szolgált alapjául az egyedek genetikai viszonyai megjelenítésének, klaszteranalízishez, UPGMA módszerrel. Kiszámítottuk az egyedek közötti távolságok kovariancia-mátrixát és a lineáris genotípusos távolságokat is, amelyeket térbeli autokorrelációs analízishez használtunk fel (SMOUSE és PEAKALL 1999, PEAKALL és mtsai 2003). A lineáris páronkénti távolsági mátrixok adták meg az egyedek, illetve az alpopulációk euklideszi távolságait a térbeli autokorreláció vizsgálatához, az egyedek, illetve a foltok középpontjának koordinátáiból számítva.

Az i -edik és j -edik egyed allélikus állapotának korrelációs koefficiensét (mint egy a több génre együttesen kombinált rokonsági koefficiens) LOISELLE és mtsai szerint (1995) számítottuk ki:

$$F_{ij} = \frac{\sum_l \sum_a (p_{ila} - p_{1a})(p_{jla} - p_{1a})}{\sum_l \sum_a (p_{1a}(1 - p_{1a})) + 1/(n_l - 1)}$$

ahol p_{ila} az a allél gyakorisága az l -edik génen az i -edik egyedben, és p_{jla} ugyanez a j -edik egyednél, n_l pedig az allélok száma az l -edik génnél (LOISELLE és mtsai 1995). Ez a koefficiens a homológ allélok alapján írja le a genetikai korrelációt. A térbeli autokorrelációt ezzel a rokonsági koefficienssel is megvizsgáltuk.

A legutóbbi néhány (1–20) generációban bekövetkező palacknyakhatás kimutatására egy grafikus módszert alkalmaztunk, amely a polimorf gének allélgyakoriságának eloszlásán alapul (LUIKART és mtsai 1998). Ezzel az egyszerű módszerrel nyomon követhető a szelekciósan neutrális gének kis gyakoriságú (< 0,1) alléljainak eloszlási eltorzulása (valószínűség 0,8).

A foltok (alpopulációk) közötti genetikai változatosságot több módon vizsgáltuk. NEI (1978) alapján becsültük az alpopulációk korrigált genetikai távolságát. WEIR és COCKERHAM (1984) „nested” ANOVA módszerével számítottuk ki a Wright-féle F -statisztikát (WRIGHT 1965), amelyben F_{IT} mutatja meg a Hardy–Weinberg-egyensúly esetén a teljes populációra várható beltenyésztési koefficiensből való eltérést, F_{IS} a foltokon belüli nem-véletlen párosodás következtében fellépő heterozigócia eltérés mértéke, F_{ST} pedig a teljes genetikai variabilitásnak az a része, amely az alpopulációk között oszlik meg, az allélgyakorisági különbségek miatt. A fixációs indexeket AMOVA eljárással (EXCOFFIER és mtsai 1992), a standard hibákat jackknife módszerrel számítottuk ki. A hierarchikus varianciaanalízishez az alpopulációkat nem csoportosítottuk, az analízis a teljes varianciát, mint az egyedi és az alpopulációk közötti különbségek miatt fellépő kovariancia komponenseket tartalmazza. Az alpopulációk differenciálódását elemző exakt teszt az alpopuláció-párok között vizsgálta az egyedek eloszlásának véletlenszerűségét (RAYMOND és ROUSSET 1995, GOUDET és mtsai 1996). A távolságok következtében fellépő izolálódás esetén azt várhattuk, hogy az alpopuláció-páronként számított $F_{ST}/(1-F_{ST})$ arányok lineárisan növekednek azok térbeli távolságának logaritmusával (ROUSSET 1997). Vizsgáltuk ezeknek az arányoknak a regresszióját a lineáris távolságok logaritmusával, majd a regressziós meredekség (slope) szignifikanciáját Mantel-teszttel állapítottuk meg.

Az egyedek páronkénti genotípusos távolságának mátrixát a PEAKALL és mtsai (1995) által kodomináns génekre kidolgozott AMOVA módszerrel vizsgáltuk, hogy a populáció differenciáltságát az egyedek tényleges genotípusos összetétele alapján láthassuk. Ezt a változatosságot a teljes variancia, valamint az ún. Φ -statisztika értelmében néztük. Ez utóbbinál a Φ_{PT} a folton belüli egyedek genotípusos korrelációja az egész populációra vonatkoztatott értékhez viszonyítva. A foltokra (alpopulációkra) értelmezett hasonló korrelációarányt is kiszámítottuk, annak szignifikanciáját 1000 random permutációval teszteltük. Az alpopulációk páronkénti Φ_{PT} értékeit is azok genetikai távolságának jellemzésére használtuk.

Ezenfelül klaszteranalízis (UPGMA), *neighbour joining* (NJ) eljárás, a minimális feszítőfa (MST) elkészítése és főkoordináta-analízis (PcoordA) segített az egyedi és az alpopulációs genetikai differenciálódás szemléltetésében. Hogy

a lehetséges térbeli genetikai differenciálódási trendet megláthatjuk, összehasonlítottuk a főkomponens-analízis eredményeit és a mátrixok korrespondenciájának Mantel-tesztjeit végeztük el, hogy a lineáris távolságok és a genetikai távolságok (a minták és az alpopulációk esetére is) korrelációját pontosabban kimutathassuk. Az eredmények szignifikanciáját a mátrixok elemeinek random permutációjával teszteltük. Emellett mindegyik génre, valamint a kombinált genetikai távolságokra is, a térbeli autokorrelációs koefficiens (r) számítottuk ki. Szignifikanciájának tesztje azon a hipotézisen alapult, hogy nincsen térbeli strukturáltság. Az egyedeket a térbeli pontok között random cserélgetve és r értékének újraszámolásával 999 random térbeli permutációt végeztünk, a tényleges megfigyelés adatait, mint az 1000. permutációt tekintettük, a 95%-os konfidenciahatárokat a rendszerezett 1000 korrelációs érték 25. és 975. értéke alapján vettük. Az r körüli konfidencia-intervallumot pedig *bootstrap* módszerrel határoztuk meg.

A RAPD-markerek mintázatait a fragmentumok/sávok jelenléte/hiánya alapján felvett bináris adatmátrixán alapulva hasonlítottuk össze. Hogy az esetleges klónok tagjait/rametjeit kimutathassuk, az egyes mintákra a páronkénti egyszerű egyezési (SM) koefficiens számítottuk ki, aminek alapján az $SM = 1$ értékkel rendelkezőket tekintettük egy klón rametjeinek. A páronkénti bináris genotípusos távolságot HUFF és mtsai (1993) alapján a $D = n[1 - (2n_{xy}/2n)]$, képlettel számítottuk, egy euklideszi távolsági mértékkel, amelyben $2n_{xy}$ a közös sávok számát, n pedig az összes sáv számát jelenti. Majd UPGMA és NJ alapján néztük a minták genetikai viszonyait a 16 m²-es foltban. A finom léptékű szerkezet tisztázásához a minták genotípusos távolságának mátrixán és lineáris térbeli távolsági mátrixán térbeli autokorrelációs analízist és Mantel-tesztet végeztünk.

Az adatok elemzéséhez a következő számítógépes programcsomagokat használtuk: ARLEQUIN ver. 2.00 (a software for population genetics data analysis) (SCHNEIDER és mtsai 2000), GenAlEx V5.1 (genetic analysis in Excel) (PEAKALL és SMOUSE 2001, PEAKALL és mtsai 2003), NTSYSpc 2.1 (numerical taxonomy and multivariate analysis system) (ROHLF 2001), POPGENE Version 1.32 (Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis) (YEH és mtsai 2000), SPAGeDi 1.1 (a program for spatial pattern analysis of genetic diversity) (HARDY és VEKEMANS 2002), SYN-TAX 2000 (computer program for data analysis in ecology and systematics) (PODANI 2001).

EREDMÉNYEK

Izoenzim-vizsgálatok

Genetikai diverzitás. Az izoenzimek génjei közül 5 bizonyult monomorfnek (EST-C, GOT-B, 6PGDH-A, SOD-A és SOD-B) a 130 minta alapján. A MNR mintázatában két aktivitási zóna, feltételezhetően 2 gén volt megfigyelhető. Annak ellenére, hogy a lassú mobilitású lokusz variábilis volt, 2 lehetséges alléllal, kihagytuk az analízisből, mert több mint az egyedek 40%-ánál igen gyenge, megbízhatatlan festődést mutatott. Hasonló módon a LAP esetében is volt egy második, gyenge, instabil festődésű gén is. A teljes populációra vonatkozó genetikai diverzitási értékeket az 1. táblázat mutatja be: A polimorf lokuszok aránya $P_0 = 66,6\%$ volt – polimorfnek véve egy gént, ha egynél több allélja jelent meg; a MNR gént kihagyva az érték $68,7\%$ lett; a 0,05 géngyakoriság kizárási szinttel pedig $P_0 = 43,8\%$ (7 polimorf gén 16 közül). A végső elemzést 11 gén 24 alléljával készítettük.

A génenkénti átlagos allélszám $N_a = 1,813$ volt; a polimorf génekre $2,182$; a 0,05 gyakorisági kizárási szinttel $1,563$. Az átlagos effektív allélszám $N_e = 1,204$, a polimorf génekre $1,297$. A Shannon-féle változatossági index $I = 0,224$, $0,052$ és $0,995$ között variálva (SKDH-A és EST-A génnél), a polimorf génekre $0,325$. A ritka allélok gyakorisága $0,009$ és $0,038$ között változott, és mindig heterozigóta genotípusban fordultak elő.

Megállapítható volt a pánmiktikus egyensúlytól való eltérés több génre. Az átlagos megfigyelt heterozigócia értéke $H_0 = 0,094$ volt, a Nei-féle genetikai diverzitás (várható heterozigócia) $H_e = 0,124$, ennek Levene szerinti korrigált értéke (LEVENE 1949) pedig $0,122$; a fenti értékek az egyes génekre nézve jelentősen változatosak voltak ($0,015$ – $0,392$, $0,018$ – $0,606$ és $0,018$ – $0,606$). Hasonlóan széles határok között változtak az F értékek is ($-0,070$ – $0,492$). Az ADH, a GOT-A és az SKDH-A esetében a megfigyelt heterozigócia túllépte a várható értéket, $-0,070$, $-0,028$ és $-0,009$ fixációs index-szel, de ezek egyike sem volt szignifikáns. Hét génnél (EST-A, LAP-A, MDH-B, PGI-A, PGI-B, 6PGDH-B, és 6PGDH-C) χ^2 -teszt szerint szignifikáns volt az eltérés $P = 0,05$ szinten, heterozigóta-hiánnyal.

SMOUSE és mtsai (1983) sokgénés analízis módszere szerint az átlagos effektív korreláció (a génpároknál az allélok szerint tapasztalható átlagos eltérés a gamétaegyensúlytól) $r_e = 0,1783$ volt $P = 0,00006$ szignifikanciával. Hasonlóképpen szignifikáns volt az eltérés a gamétaegyesülés véletlenszerűségét illetően, $WHD = 0,3631$ ($P = 0,00003$). A hagyományos becsült F_{IT} érték ($0,2299$; $P = 0,0001$) és az 1. táblázatbeli F fixációs index értékek, valamint a fenti mértékek beltenyésztésre, illetve rokon egyedek egymás közötti szaporodására utalnak.

1. táblázat. A *Linum dolomiticum* populációgenetikai változatosságának mérőszámai. Allélgakorosságok, heterozigócia, génszintű változatosság és *F*-statisztika az egész populációra (génnek száma = 16, mintaszám = 130, polimorf gének aránya = 0,687).

Allélgakorosság	ADH	EST-A	GOT-A	LAP-A	MDH-B	PGI-A	PGI-B	PGM-A	6PGDH-B	6PGDH-C	SKDH-A	EST-C	GOT-B	6PGDH-A	SOD-A	SOD-B	
1. Allél	0,935	0,388	0,027	0,832	0,055	0,015	0,935	0,150	0,962	0,888	0,991	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
2. Allél	0,065	0,138	0,973	0,168	0,894	0,985	0,065	0,850	0,038	0,112	0,009						
3. Allél	0,473			0,051													
Heterozigócia, génszintű változatosság és <i>F</i> -statisztika																	
<i>N_a</i> ^a	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
<i>N_e</i> ^b	1,138	2,539	1,055	1,402	1,254	1,039	1,139	1,342	1,08	1,257	1,018	1	1	1	1	1	1
<i>H_c</i> ^c	0,130	0,392	0,054	0,173	0,165	0,015	0,100	0,254	0,046	0,162	0,0182	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>H_d</i> ^d	0,122	0,606	0,052	0,280	0,196	0,030	0,122	0,255	0,074	0,198	0,0180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Nei</i> ^e	0,122	0,606	0,052	0,287	0,202	0,038	0,122	0,255	0,074	0,204	0,018	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>F</i> ^f	-0,070	0,353	-0,028	0,381	0,155	0,4921	0,182	0,005	0,376	0,185	-0,009	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,184	0,007
<i>F_s</i> ^g	0,241	0,995	0,124	0,461	0,423	0,095	0,242	0,423	0,163	0,358	0,052	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,066

Hardy–Weinberg-egyensúly χ^2 -tesztje

χ^2	0,444	60,46	0,085	13,232	22,341	24,697	4,707	0,009	20,606	4,067	0,0046						
df ^h	1	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Valószínűség	0,505	1 10 ⁻⁵	0,771	0,0003	6 10 ⁻⁵	1 10 ⁻⁶	0,03	0,923	6 10 ⁻⁶	0,044	0,946						

Smouse-féle sokgénese analízis egy populációra (SMOUSE és mtsai 1983)

Egyedszám	re ⁱ	df ^h	χ^2	Prob.	WHDj	df ^h	χ^2	Prob.
130	0,1783***	55	122,36	6 10 ⁻⁵	0,3631***	11	109,3	3 10 ⁻⁵

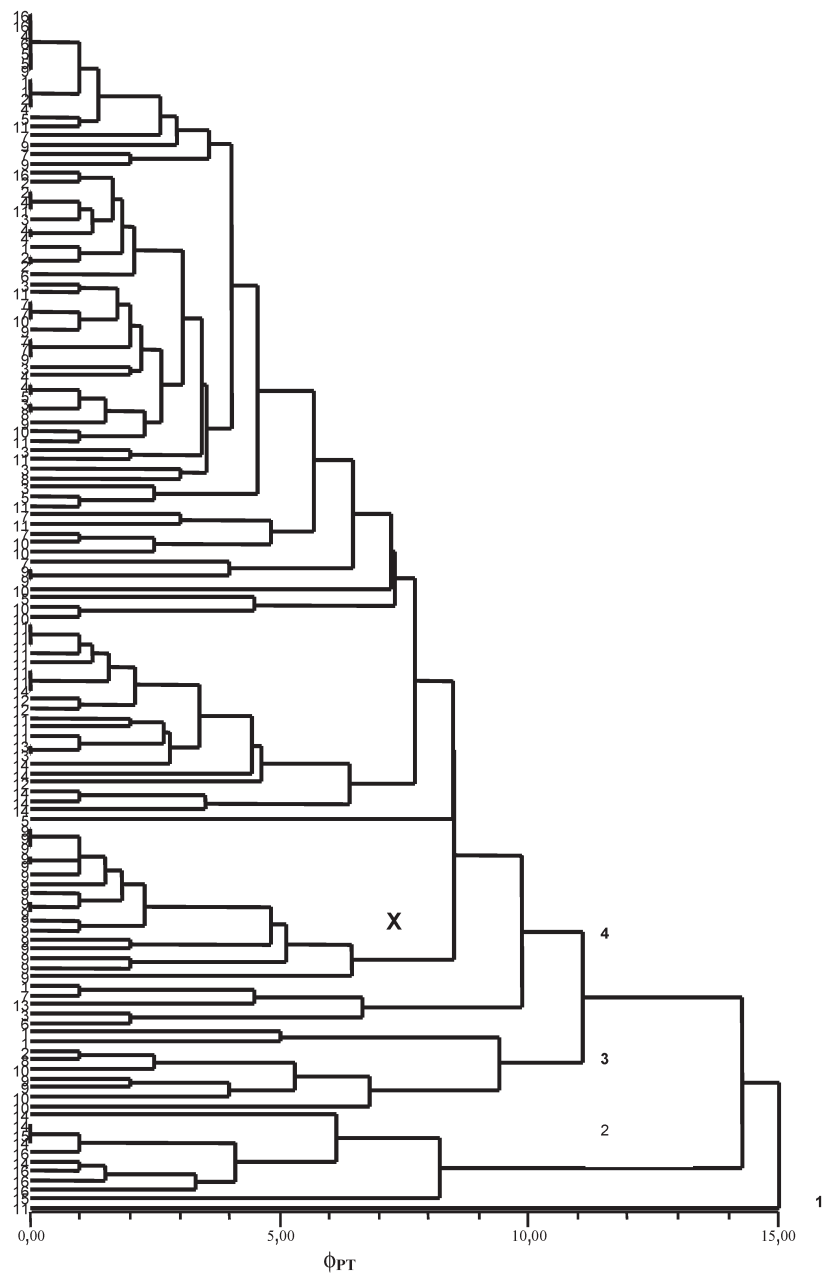
^a*N_a* = megfigyelt allélok száma, ^b*N_e* = effektív allélok száma (KIMURA és CROW 1964), ^c*H_c* = várható heterozigócia (LEVENE 1949), ^d*Nei* = *Nei*-féle korrigált várható heterozigócia (NEI 1978), ^e*F* = fixációs index (WRIGHT 1922), ^f*I* = Shannon-féle információs index (LEWONTIN 1972), ^gdf = szabadságfok, ^h*r_c* = a gamétaegyensúlytól való eltérés génpárok alléljai között, ⁱWHD = a véletlenszerű gamétaegyensúlytól való eltérés, #N/A = nem értelmezhető, * = *P* < 0,05, ** = *P* < 0,01, *** = *P* < 0,001, SE = standard hiba.

Az egyedek páronkénti négyzetes genetikai távolsága alapján kimutatott rokonsági viszonyokat mutatja be a 2. ábra UPGMA klaszterezéssel, a 3. ábra pedig főkoordináta-analízissel. Mind az UPGMA fa, mind a háromdimenziós főkoordináta-ábrázolás szerint látható az azonos folthoz tartozó egyedek enyhe csoportosulása.

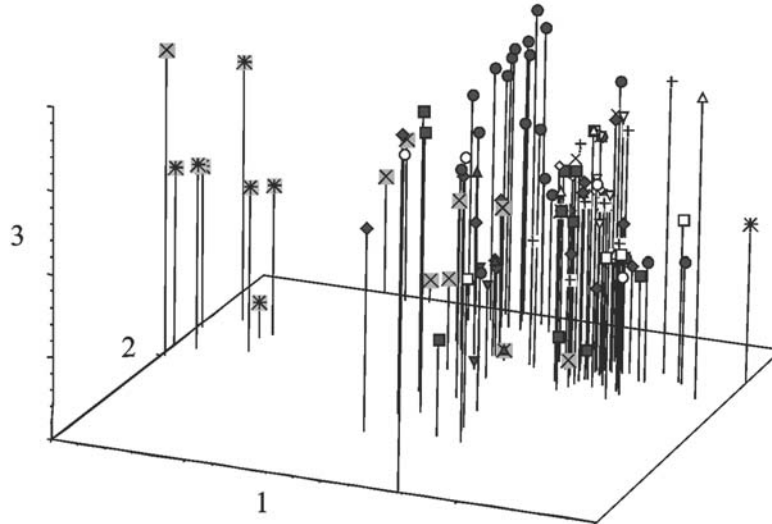
LUIKART és mtsai (1998) grafikus módszerével nem találtunk modális változást az allélgyakoriságok eloszlásában a várható eloszláshoz képest (4. ábra), így nem állíthatjuk, hogy a populáció közelmúltjában genetikai palacknyakhatás lépett volna fel.

A genetikai változatosság eloszlása. A térbeli autokorrelációs vizsgálatok első foka az egyedek szintjén, az egyes génekre külön-külön, illetve a sokgénés megközelítéssel készült. Légvonalban 1715 m volt a legnagyobb távolság megmért egyedek között, és ezt a távolságot 34 távolsági osztályra osztottuk. Így egy távolsági osztály egységnek 50,45 m felelt meg, ami összevethető a téren található lenes foltok átmérőjével. Az egyedek genetikai távolsága és lineáris térbeli távolsága között fennálló korreláció kimutatására végzett Mantel-teszt igazolta a korrelációt a teljes sokgénés genetikai távolság és az egyedek lokalizációja között, $r = 0,116$ ($P = 0,003$) random permutációs értékkel. Az egyes géneket külön tekintve az ADH, GOT-A, LAP-A, MDH-B, PGM-A és 6PGDH-C esetében a szomszédos minták rokonsága volt tapasztalható a térbeli autokorrelogramokon, de ezt az EST-A, PGI-A, PGI-B, 6PGDH-B és a SKDH-A géneknél nem tapasztaltuk. A sokgénés Φ_{PT} értékekkel a korrelogram és az abszcissa metszéspontja a 2,33 (1,996) távolsági osztálynál jelentkezett, s eszerint átlagosan 117,5 (99,8) m annak a négyzetnek az oldala, amelyen belül a genetikai rokonságot mutató egyedek találhatóak (5. ábra). A Loisel-féle rokonsági koefficiens esetében ugyanezt a trendet tapasztaltuk, az x tengely metszéspontja 2,0 távolsági osztálynál volt, ami 100,9 m oldalú négyzetnek feleltethető meg.

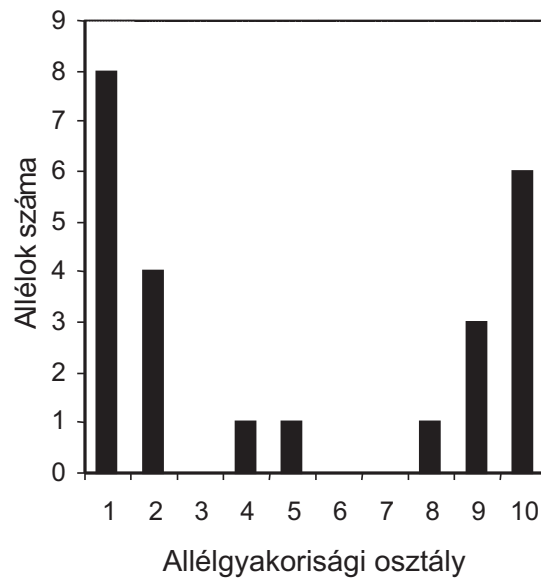
A 16 alpopulációra az allélikus mintázatok sorában (2. táblázat) az átlagos allélszám (N_a) 1,2 és 1,733 között volt, a legmagasabb érték a 3-as foltban. A legnagyobb effektív allélszám ($N_e = 1,265$) a 13-as alpopulációnál, a második legmagasabb érték (1,247) a 3-asnál adódott. Ugyancsak ennél a két alpopulációnál volt a legmagasabb a heterozigócia, $H_e = 0,139$ és 0,130, a legnagyobb Shannon-féle információs index (0,247) pedig ismét a 3-as foltnál. Ritka allélokot 5 alpopulációnál találtunk (3, 4, 5, 10 és 11), melyek közül a 10-es szélső helyzetű. Azoknak a közös alléloknak az átlagos száma, amelyek frekvenciája nem lépte túl a 0,25-öt, illetve 0,5-öt, ismét a 3-as foltnál volt a legmagasabb, 0,333, illetve 0,467. Az alpopulációkra számított polimorf lokuszok



2. ábra. A páronkénti négyzetes, sokgénés genotípusos távolságok (SMOUSE és PEAKALL 1999) szerint készült UPGMA dendrogram, a 130 *Linum dolomiticum* egyed izoenzimes adatai alapján. A jelölésekre szóló számok az egyed származását mutatják az alpopulációk (foltok) szerint (1–16).
 Φ_{PT} = négyzetes sokgénés genotípusos távolság.



3. ábra. Háromdimenziós főkoordináta-analízis eredményének ábrázolása a 130 *Linum dolomiticum* egyed sokgénés négyzetes genotípusos távolsága alapján (SMOUSE és PEAKALL 1999). A jelölések a kiemelt származási alpopulációt mutatják: ● – 9; ▼ – 13; × – 14; + – 15; * – 16. Az 1-es, 2-es és 3-as tengely a variabilitás 46,7, 22,7 és 20,1%-át magyarázza (kumulatív 89,5%).



4. ábra. A 11 polimorf izoenzimgén 24 alléljának gyakorisági eloszlása egyenletesen vett gyakorisági csoportokkal: 0,001–0,100, 0,101–0,200, 0,201–0,300 stb. A kis és a nagy gyakoriságú osztályok értékei: 0,001–0,100, illetve 0,901–0,999, közöttük 8 közepes gyakoriságú osztállyal.

2. táblázat. Allélikus mintázatok a *Linum dolomiticum* alpopulációiban az izoenzimek genotípusos adatai alapján.

Alpopu- lációk	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	Átlag
N_a	1,333 (0,159)	1,200 (0,107)	1,733 (0,182)	1,267 (0,118)	1,400 (0,163)	1,267 (0,118)	1,533 (0,165)	1,200 (0,107)	1,600 (0,190)	1,400 (0,163)	1,533 (0,165)	1,267 (0,118)	1,333 (0,159)	1,267 (0,153)	1,267 (0,153)	1,333 (0,159)	1,371 (0,154)
N_a Freq. >= 5%	1,333 (0,159)	1,200 (0,107)	1,733 (0,182)	1,267 (0,118)	1,400 (0,163)	1,267 (0,118)	1,533 (0,165)	1,200 (0,107)	1,533 (0,192)	1,400 (0,163)	1,467 (0,165)	1,267 (0,118)	1,333 (0,159)	1,267 (0,153)	1,267 (0,153)	1,333 (0,159)	1,363 (0,144)
N_c	1,237 (0,125)	1,119 (0,075)	1,247 (0,121)	1,142 (0,076)	1,145 (0,092)	1,144 (0,074)	1,194 (0,085)	1,077 (0,041)	1,194 (0,091)	1,180 (0,086)	1,153 (0,088)	1,199 (0,093)	1,265 (0,126)	1,159 (0,123)	1,191 (0,119)	1,131 (0,089)	1,173 (0,050)
I_d	0,175 (0,085)	0,103 (0,059)	0,247 (0,077)	0,130 (0,062)	0,144 (0,070)	0,136 (0,062)	0,199 (0,069)	0,090 (0,048)	0,203 (0,076)	0,174 (0,071)	0,165 (0,064)	0,161 (0,073)	0,195 (0,089)	0,118 (0,076)	0,144 (0,082)	0,125 (0,068)	0,167 (0,041)
H_c	0,114 (0,056)	0,069 (0,040)	0,139 (0,046)	0,085 (0,042)	0,082 (0,041)	0,089 (0,042)	0,120 (0,044)	0,056 (0,030)	0,116 (0,045)	0,108 (0,045)	0,092 (0,039)	0,111 (0,051)	0,130 (0,058)	0,071 (0,046)	0,092 (0,051)	0,072 (0,040)	0,106 (0,024)

N_a = átlagos megfigyelt allélszám, N_c Freq. >= 5% = átlagos allélszám a 0,05 gyakorisági határ fölött, N_c = átlagos effektív allélszám (KIMURA és CROW 1964), I_d = a Shannon-féle információs indexek átlaga (LEWONTIN 1972), H_c = átlagos várt heterozigótia (LEVENE 1949), zárójelben a standard hibák.

aránya 20% (2, 8, 14 és 15-ös foltok) és 60% (3-as folt) között volt, átlagosan 31,7%.

A foltok átlagos Nei-féle korrigált genetikai távolsága $D_{Nei} = 0,022$ (0,0134), a legkisebb érték $D_{Nei} = 0,003$, a legnagyobb $D_{Nei} = 0,072$ volt.

Az F -statisztika számításai a „nested” ANOVA módszerrel a következő értékeket adták: $F_{TT} = 0,2299$ (0,0893), $F_{IS} = 0,1939$ (0,1106), $F_{ST} = 0,0475$ (0,0259). A GOT-A, LAP-A, PGM-A és 6PGDH-C géneknél az F_{ST} szignifikánsan eltért az egyensúlytól (3. táblázat). A molekuláris varianciaanalízis (AMOVA) kimutatta, hogy a variancia mintegy 5,99%-a oszlott meg az alpopulációk között, 94%-a az alpopulációkon belül volt található (1023 permutáció alapján, $P = 0,0$). A genotípusos analízisek is enyhe strukturáltságot jeleztek, a $\Phi_{PT} = 0,182$ ($P = 0,01$) eredmény mutatta a foltok egyenetlen genotípusos összetételét. Genotípusos szinten a változatosság 15%-a az alpopulációk között, 85%-a az alpopulációkon belül oszlott meg.

Az alpopulációk differenciálódásának exakt tesztje 6 folt-párra szignifikáns volt ($P < 0,05$): 9–1, 9–2, 9–3, 9–10, 9–11 és 11–16 foltpárok. A főkoordináta-analízis háromdimenziós megjelenítése és a ráhelyezett mini-

3. táblázat. F -statisztika (WEIR és COCKERHAM 1984 szerint) becslések a polimorf izoenzimgéneknél a *Linum dolomiticum* populációjára, ANOVA segítségével.

Gén	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}
ALL	0,2093	0,1684	0,0492
ADH	-0,0597	-0,1057	0,0416
EST-A	0,3578	0,3389	0,0287
GOT-A	-0,0156	-0,1122	0,0868*
LAP-A	0,4590	0,1500	0,364*
MDH-B	0,1580	0,1647	-0,0079
PGI-A	0,4947	0,4990	-0,0086
PGI-B	0,1846	0,1948	-0,0128
PGM-A	0,0244	-0,1823	0,1748*
6PGDH-B	0,3814	0,3585	0,0357
6PGDH-C	0,1928	0,1455	0,0554*
SKDH-A	-0,0046	-0,0003	-0,0043
Jackknife-korrigált becslések (sokgénes)			
Átlag	0,2299	0,1939	0,0475
SE	0,0893	0,1106	0,0259

* = $P < 0,05$ szignifikancia, SE = standard hiba.

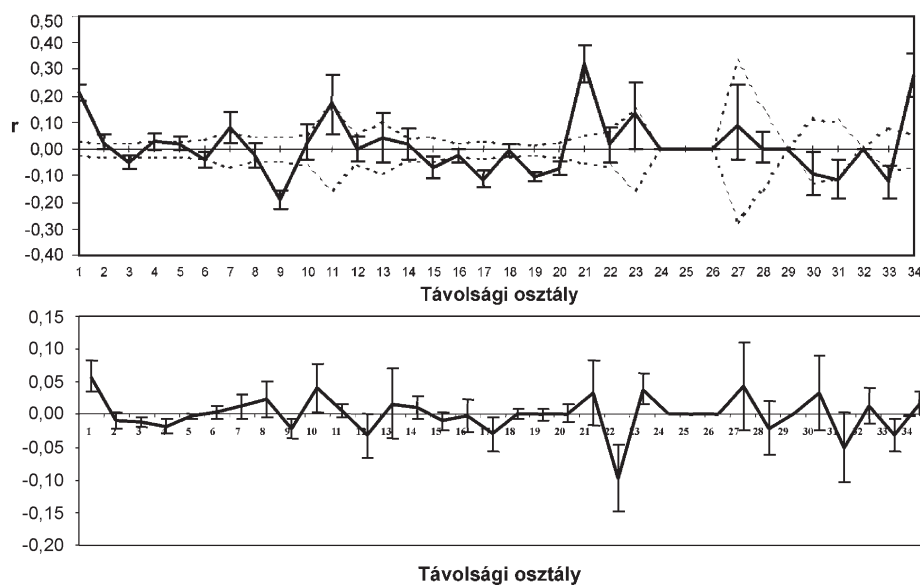
mális feszítőfa demonstrálja az alpopulációk genotípusos viszonyait: a 9., 14., 16., valamint a 13., 15. foltok enyhén elkülönülnek (6. ábra). A térbeli autokorrelációs eredmények a foltok F_{ST} , Φ_{PT} értékeire, és az $F_{ST}/(1-F_{ST})$ regressziója az alpopulációk távolságának logaritmusára Mantel-tesztje azonban nem mutatott szignifikáns távolság szerinti izolációt [$r = -0,004$ ($P = 0,4$)] (7a és 7b ábra).

RAPD-elemzések. Az előzetes vizsgálatok során 38 primer közül választottuk ki azt a 13-at és a velük amplifikált 62 RAPD fragmentumot, amelyeket bevontunk a végső kiértékelésbe (4. táblázat).

A RAPD-mintázatok/fenotípusok összehasonlításával, a 62 sáv mintázatának követésével finomabb feloldással volt feltárható az egyedek genetikai viszonylata, mint a 16 izoenzimgén genotípusai alapján. A 9-es alpopuláció, – amelynek az egyedei közül néhány a 2. ábra UPGMA fájának X-szel jelzett ágában látható, – egy kisebb foltjában mintáztuk meg a növényeket.

A 160 megmintázott egyed közül 157-re kapott SM koeficiens-mátrix alapján készült a 8. ábra UPGMA fája – 3 egyedet kihagytunk az értékelésből bizonytalan fragmentamplifikálás miatt. A 157 egyed közül 103-nál kaptunk 0,9-nél magasabb SM értéket, ami jelzi a nagyfokú genetikai hasonlóságot. De

csak 5 esetben kaptunk teljesen megegyező sokszávos fenotípust: a 12–13–14, a 19–22–36, a 44–51, a 80–82–84 és a 144–145 mintáknál. Ezeknek a növényeknek követtük az elhelyezkedését a foltban és megállapíthattuk, hogy csak a 12–13, 19–36, 82–84, és 144–145-ös párokra bizonyos, hogy azonos a sokgénes genotípusuk, azaz reális, hogy azonos klónba sorolhatók. A további 5 egyednél (14, 22, 44, 51 és 80), távoli térbeli helyzetük alapján nem valószínű, hogy azonos klóntagok lennének (9. ábra). Az azonos RAPD-mintázatot olyan extrém alacsony genetikai változatosság magyarázhatja, amely miatt még a 62 RAPD-lokuszt sem mutatott ki közöttük eltérést. (A 11 izoenzimgén 24 allélja még ennél is sokkal rosszabb feloldóképességgel rendelkezett volna). Ez utóbbi, azonos genotípust mutató mintáknál a magyarázat a növény felszín alatti elágazása lehet: a megmintázott ágak valószínűen azonos növényhez tartoztak, s a felszínre bukkanó elágazások közötti szakaszokat kicsiny, 10–20 cm átmérőjű dolomitdarabok fedhették.



5. ábra. Sokgénes térbeli autokorrelációs elemzés eredménye a 130 dolomitlen egyed genotípusai alapján. a) A korrelogram alátámasztja, hogy szignifikáns genetikai hasonlóság létezik 2,33 ($\pm 1,996$) távolsági osztályon belül, vagyis nem véletlenszerű a genetikai szerkezet átlagosan 117,5 ($\pm 99,8$) m oldalú négyzetnek megfelelő területen. r = korrelációs együttható, szaggatott vonal = felső és alsó konfidenciahatárt jelzi 999 permutáció alapján (SMOUSE és PEAKALL 1999). A vonalak a 95%-os konfidencia-intervallumot mutatják bootstrap becsléssel. b) A 130 dolomitlen egyed Loisel-féle (LOISELLE és mtsai 1995) rokonsági indexe alapján készített térbeli autokorrelációs elemzés eredménye. Az x tengely metszéspontja pozitív korrelációt jelez 2,0 távolsági osztályon, átlagosan 100,9 m oldalú négyzetben belül.

4. táblázat. A RAPD-polimorfizmus vizsgálatához felhasznált primerek és a figyelembe vett fragmentumok száma.

Primer	5' → 3' szekvencia	Fragmentumok száma
OPA-11	CAATCGCCGT	7
OPA-16	AGCCAGCGAA	7
OPA-17	GACCGCTTGT	6
OPB-03	CATCCCCCTG	6
OPB-07	GGTGACGCAG	5
OPB-08	GTCCACACGG	3
OPB-10	CTGCTGGGAC	7
OPB-12	CCTTGACGCA	4
OPB-16	TTTGCCCGGA	2
OPB-18	CCACAGCAGT	6
OPB-19	ACCCCGAAG	4
OPB-20	GGACCCTTAC	1
OPK-08	GAACACTGGG	4

A 10. ábra NJ fáján a 157 RAPD-mintázat közeli rokonsági csoportjai szembevetően láthatóak (4. táblázat). Részletesen követtük a NJ fa egyes ágain elhelyezkedő minták pozícióját a 4 m × 4 m-es mintaterületen. Az A, B, C és D-vel jelzett ágakon lévő minták fizikai elhelyezkedését mutatja be például a 11. ábra.

A 40 távolsági osztállyal végzett térbeli autokorrelációs analízis (12. ábra) szignifikáns genetikai korrelációt tárt fel a 17,44 távolsági osztály határon belül: vagyis egy átlagosan 244,1 cm-es oldalú négyzetes területen növekedő egyedek genetikai rokonsága szignifikánsan nagyobb annál, mint amit a genotípusok random eloszlása alapján várhattunk a 16 m²-en (Mantel-teszt, $r = 0,282$, $P = 0,001$).

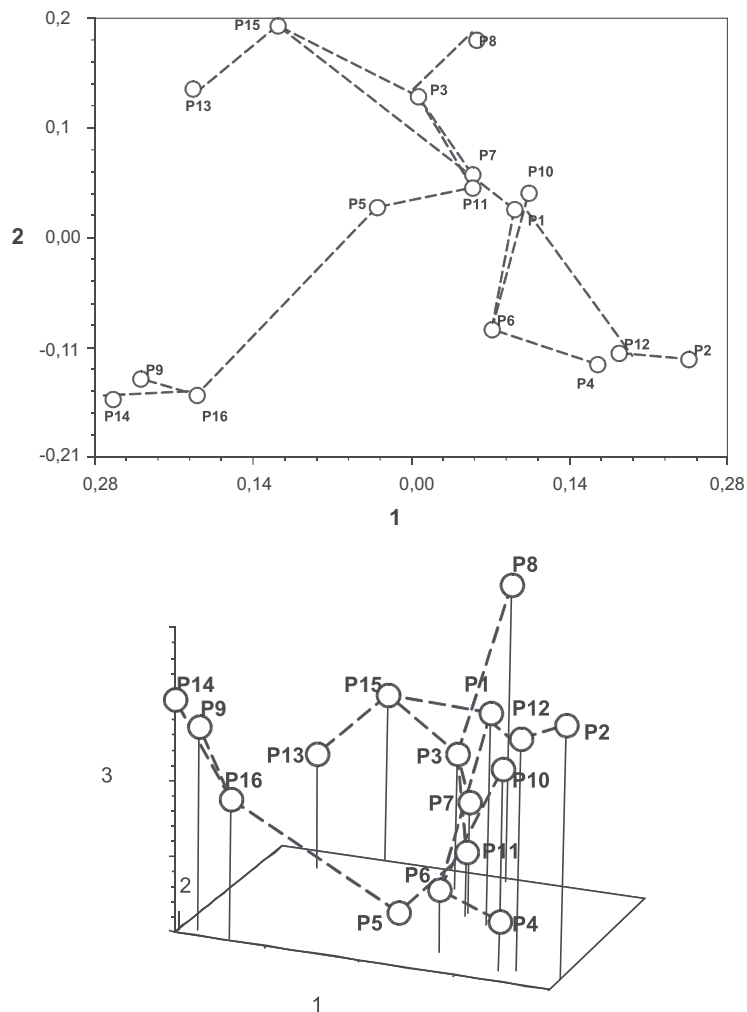
Az izoenzimes és a RAPD-vizsgálatok Mantel-tesztjeinek és térbeli autokorrelációs elemzésének összehasonlításakor bebizonyosodott, hogy a RAPD-módszer feltárta a kis léptékű szerkezetet még alacsony fokú polimorfizmus esetén is.

MEGVITATÁS

Genetikai diverzitás

A polimorf gének 43,8%-os aránya (0,05 kizárási küszöbvel) megfelelt a kétszikűekre átlagosan mért 44,8%-nak és a hosszú élettartamú, évelő virágos

növények 39,6%-os értékének. Ugyanakkor 66,6%-kal magasabb volt ez az endemikus fajoknál HAMRICK (1989) által talált átlagos 26,3 (2,1) %-nál. Az endemikus izolált állapotot viszont tükrözte az $N_a = 1,813$ átlagos allélszám, amely 8%-kal alacsonyabb, mint a növényfajoknál számított átlagos érték és az endemikus fajok 1,80 (0,08) értékének (HAMRICK és GODT 1990) megfelelő. Az átlagos effektív allélszám ($N_e = 1,204$) (0,095) nem kiugró, mert 473 fajra az

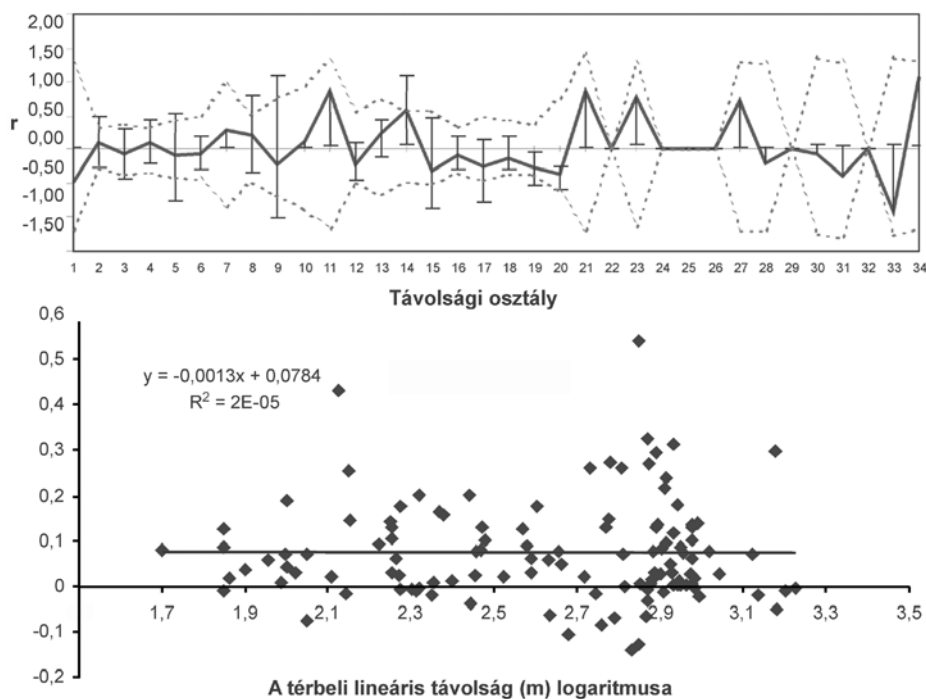


6. ábra. A *Linum dolomiticum* alpopulációk differenciálódása négyzetes genotípusos távolságok alapján. A főkoordináta-analízis ábrázolására vetített minimális feszítőfa (szaggatott vonallal) a csoportok legkifejezettebb differenciálódását az 5–16, 1–15 és 3–8 esetben mutatja. A három tengely a változatosság 45,6, 29,4, illetve 23,1%-át tartalmazza (kumulatív 98,2%).

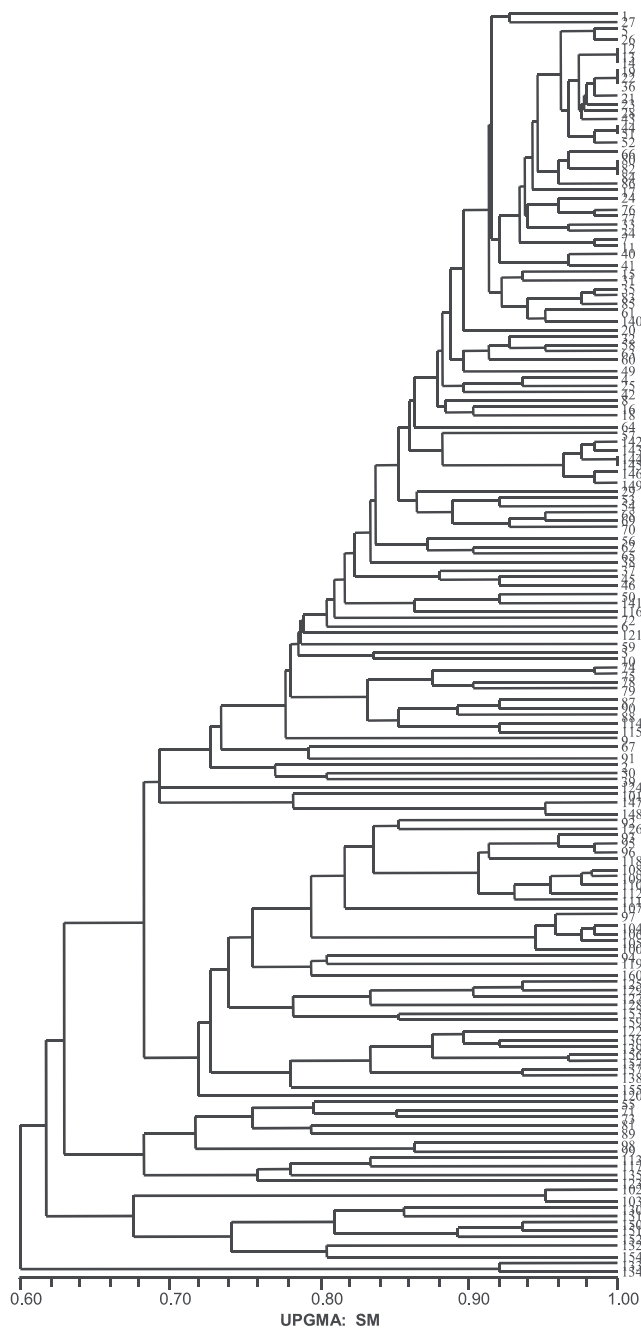
átlag $N_e = 1,21$ (0,01) volt, és csak 5%-kal magasabb a HAMRICK (1989) által 81 endemikus fajra számított $N_e = 1,15$ (0,04) értéknél.

A megfigyelt átlagos heterozigócia ($H_0 = 0,094$) (0,030) megközelítőleg 36%-kal kisebb volt, mint a növényfajokra számított átlagos 0,149 (0,006). Az értéket a *Linum dolomiticum* életformájának megfelelő hosszú élettartamú, évelő virágos növények (0,205) (0,084) adatához hasonlítva, kiugróan nagy az eltérés, mindössze 45%-a annak. Ugyancsak szignifikánsan alacsonyabb a kétszikűek átlagánál (0,136) (0,007), és 81 endemikus faj átlagának (0,096) (0,01) megfelelő.

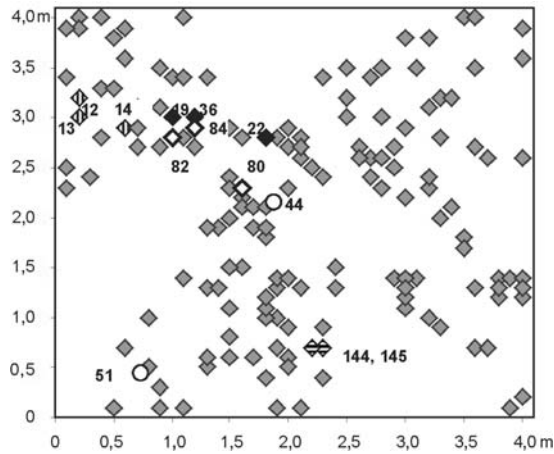
Az egyedi sokgénes genotípusok klaszteranalízisének UPGMA fáján (2. ábra) a 4-essel jelzett ágon látható a 130 egyed közül 110 – közelítőleg 85% – jelezve az egyedek genetikai közelségét.



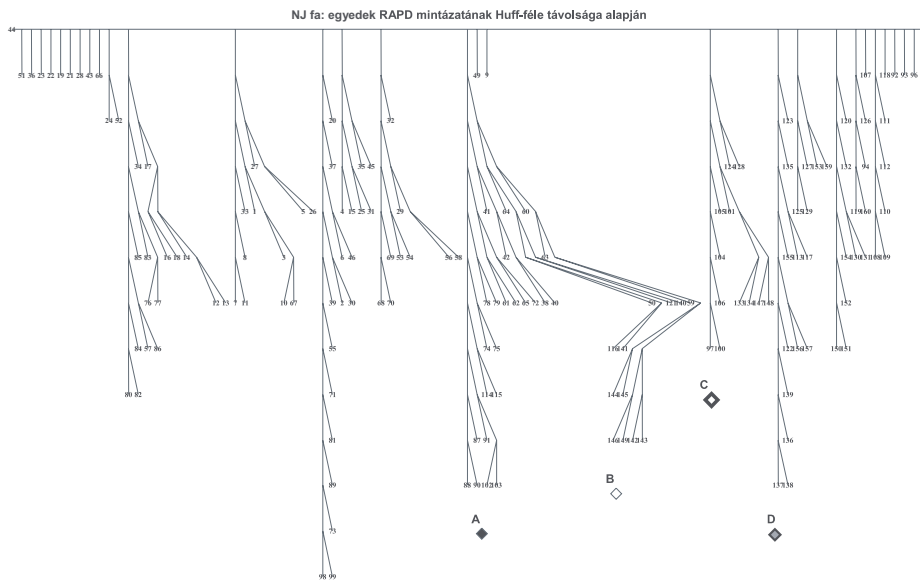
7. ábra. A genetikai differenciálódás és a térbeli helyzet összefüggésének ábrázolása a *Linum dolomiticum* alpopulációinál. a) A correlogram alátámasztja azt a nullhipotézist, mely szerint a sokgénes genotípusokra nincs kifejezett térbeli szerkezet az alpopulációk szintjén. r = korrelációs koefficiens, szaggatott vonal felső és alsó konfidenciahatárt jelzi 999 permutáció alapján (SMOUSE és PEAKALL 1999). A vonalak a 95%-os konfidencia-intervallumot mutatják bootstrap becsléssel. b) Az alpopulációk páronkénti $F_{ST}/(1-F_{ST})$ értékének regressziója lineáris távolságuk (m) logaritmusára nem mutat ki térbeli távolság szerinti differenciálódást. $R = -0,004$, $P = 0,4$; a permutációk száma = 999.



8. ábra. A 9-es alpopulációban vizsgált 157 dolomitlen minta DNS-alapú genetikai hasonlóságának finom léptékű elemzése: A RAPD-fragmentumok megléte/hiánya szerint számított páronkénti egyszerű egyezési koefficienssel készített UPGMA fa.



9. ábra. Az azonos sokszávos (62) RAPD fenotípust mutató minták elhelyezkedése a 4 m × 4 m-es mintaterületen, a finom léptékű vizsgálat 157 RAPD mintázatának összehasonlítása alapján. A 12–13, 19–36, 82–84, és 144–145 párok helyzete mutatja, hogy valószínűleg azonos egyed különböző ágairól származhatnak. A 14, 22, 80, 44, és 51-es minta az előzőektől független, de nagyon hasonló genotípusokról eredhet, amelyeket a 62 RAPD-fragmentum feloldóképessége sem tudott elkülöníteni.

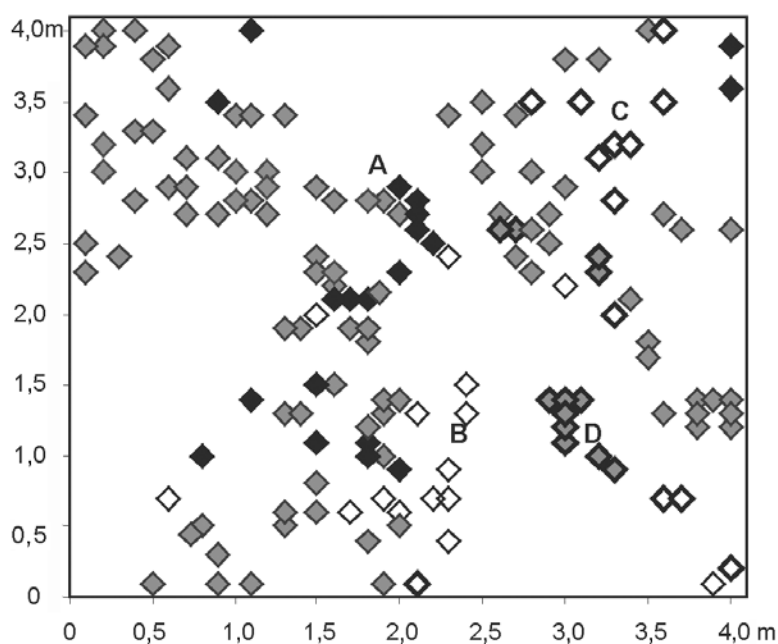


10. ábra. A 4 m × 4 m-es kijelölt területen megmintázott 157 dolomitlen molekuláris hasonlóságának neighbour joining fája, a HUFF és mtsai (1993) szerint számított euclidészi genetikai távolságok alapján. A távolságok a RAPD-fragmentumok megléte/hiánya szerinti bináris mátrixon alapulnak. Az A, B, C és D jel a 11. ábrán feltüntetett, vélhetően matrilineáris ágakat mutatja.

A genetikai diverzitás eloszlása

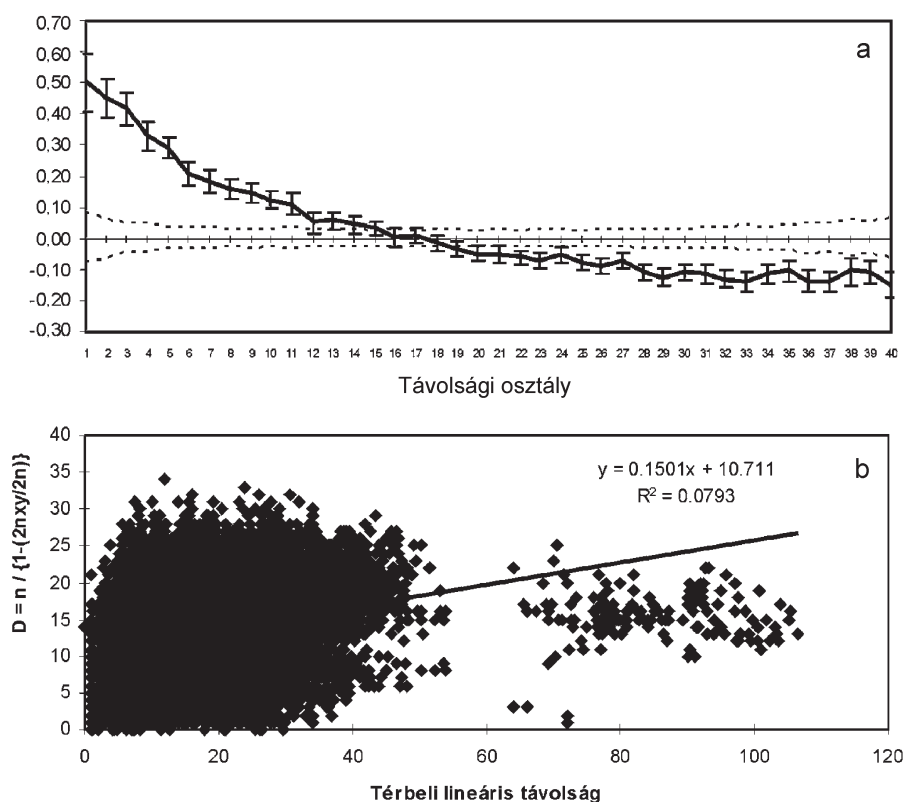
Mind a kiszámított beltenyésztési koeficiensek (F), a gamétaegyensúlytól való eltérés (r_c) és a random gamétaegyesüléstől való eltérés (WHD) mértéke bizonyítják, hogy a genetikai változatosság egyenlőtlenül oszlik el a populációban, jelzik, hogy a pollen és/vagy magterjedés korlátozott, valamint feltételezhető öntermékenyülés és/vagy rokon egyedek közötti szaporodás. A biparentális beltenyésztés és az esetleges öntermékenyülés relatív arányát a jelen kutatásból nem lehetett megállapítani, minthogy a pollen- és a magterjedésről részletes adatok nem álltak rendelkezésre.

Mind az izoenzim-, mind a RAPD-eredmények mutatták, hogy alacsony a faj genetikai változatossága, de kismértékű térbeli differenciálódást tártak fel az egész populációra vonatkozóan: klaszterezéssel kimutatható volt (2. ábra), hogy a marginális helyzetű 14-es, 15-ös és 16-os alpopulációk egyedei közül jó néhány külön ágra került. A főkoordináta-analízis (3. és 6. ábra) is egyértelműen megmutatta, hogy a 13-as és 15-ös, valamint a 9-es, 14-es és 16-os alpopulációk egyedei kissé elkülönülnek a többitől.



11. ábra. A 10. ábrán megjelölt 4, A, B, C és D csoportba tartozó, RAPD-mintázatuk alapján közeli hasonlóságot mutató dolomitlen minták terepi elhelyezkedése: a csoportok tagjai a lejtő irányának megfelelően elnyúló foltokban nőnek. A jelölések egyeznek a 10. ábráéval.

Az F -statisztika, a Φ -statisztika és az exakt teszt is bizonyította, hogy a genetikai variabilitás megoszlik az alpopulációk között (AMOVA $F_{ST} = 0,0599$, $P = 0.0$; $\Phi_{PT} = 0,182$, $P = 0.01$), ugyanakkor ez a megoszlás nem követte a foltok térbeli távolságát. Sőt, az F_{ST} (allélgyakoriságok szerint) és a Φ_{PT} (genotípusok alapján) kissé másként differenciálja az alpopulációkat. Az F_{ST} értékek összhangban vannak azzal a mértékkel, amely foltokból álló populációkban létező, idegen termékenyülő növényfajoknál jellegzetes (HAMRICK és GODT 1990), a Φ_{PT} szerint a genotípusos differenciálódás nagyobb mérvű. Hasonlóképpen



12. ábra. A megmintázott 157 dolomitlen (62 RAPD fragmentum) finom léptékű térbeli genetikai szerkezete a HUFF és mtsai (1993) szerint számított euklideszi genetikai távolságok szerint, amelyek a RAPD-fragmentumok megléte/hiánya szerinti bináris mátrixon alapulnak. a) A correlogram feltárja, hogy az x tengely metszetén, 17,44 távolsági osztályon, azaz átlagosan 244,1 cm-es élű négyzetnyi területen belül a genetikai szerkezet nem véletlenszerű. r = korrelációs koefficiens, szaggatott vonal felső és alsó konfidenciahatár 999 permutáció alapján (SMOUSE és PEAKALL 1999). A vonalak a 95%-os konfidencia-intervallumot mutatják bootstrap becsléssel. b) A Huff-féle genetikai távolságok és a lineáris térbeli távolságok mátrixainak Mantel-tesztje szignifikáns térbeli szerveződést bizonyít: $r = 0,282$, $P = 0,001$.

mind a klaszteranalízis, mind az ordinációs eredmények megmutatták az alpopulációk bizonyos eltérését, de azt is, hogy létezik közöttük génáramlás: a klaszterezés szerint például a 9-es és 16-os, térben legtávolabbi alpopulációk néhány egyede egymás mellé került.

A térbeli autokorrelációs eredmények szerint jellemző a genetikailag rokon egyedek kisebb szomszédsági köreinek megléte (átlagosan 117,5 m oldalú négyzetként megjeleníthetően), s ez a 11 izoenzimgén közül 6 esetében így volt kimutatható. A térbeli távolsággal megvalósuló izoláció modellje alapján WRIGHT megmagyarázta (1943, 1965), SOKAL és WARTENBERG (1983), majd EPPERSON (1993) demonstrálta, hogy a korlátozott génáramlás és a genetikai sodródás eredményezi, hogy a génjeik többségére genetikai korrelációt mutató egyedek csoportosulnak. A mikroarea szintjén fellépő szelekció pedig olyan egyedek térbeli csoportosulására vezet, amelyek csak néhány speciális génjükre, illetve néhány kapcsolt génjükre rokonok (SOKAL és WARTENBERG 1983, SOKAL és ODEN 1978*a, b*, 1991). Vizsgálataink szerint 11 gén közül 6 esetében valósult meg a rokon genotípusok térbeli csoportosulása, az olyan alacsony szintű genetikai polimorfizmus ellenére, amely mellett a statisztikai eljárások az érzékenységi küszöb határán lehetnek az adott mintaszámnál a térbeli szerveződés kimutatásának. A rokonsági körök kialakulása így a magszóródás kis távolságával értelmezhető, ami a faj jellemzője lehet. Feltételezhetően hangyák vagy más rovarok terjeszthetik a magokat korlátozott távolságokra, s a vizsgálatok idejéig nagyobb távra megvalósuló zoochoria nem vált ismertté. Elméletileg madarak és kisebb rágcsálók például megtehetik ezt. Megfigyeléseink szerint a pici, repítőkészülékkel nem rendelkező magvak az anyanövény körül szóródnak gravitációsan, közvetlenül a teljes beérést követően. Ezután viszont a csapadékkal lemosódhatnak a hegyoldalon (hidrochoria), s lejjebb kerülhetnek; ezt a folyamatot megerősíti, hogy jellegzetes a növények csoportos megjelenése a lejtők alsóbb részén, vagy a sziklás felszín barázdáiban, ahol is mintegy csapdába eshetnek a magvak. Ez a jelenség kétségkívül megfigyelhető volt például a 4-es, 9-es és 11-es foltoknál. Mindezek miatt egy anyanövény magvai kisebb távolságokon matrilineáris formációban megjelenő propagulumokként viselkedhetnek. A 9-es alpopuláció jó néhány egyedének nagyon közeli genetikai rokonsága is ilyen propagulum-forrásból és propagulum megtelepedésből származhat a folt speciális életszakaszában. A 2. ábra X-szel jelzett elkülönülő ágán található a 9-es folt 17 egyede, igen szoros rokonságukat bizonyítva. Abban a nagy kiterjedésű alpopulációban 27 mintát vettünk, és a megnevezett ágon lévő 17 minta a folt északnyugati kisebb lejtőjéről származott – így az alpopuláción belüli strukturáltságot is feltárta ez az eredmény. (Az alpopuláció egyéb mintái az UPGMA fán más, például a 4-, 5-, 6-, 7-, 10- és 16-os folt egyedeivel csoportosultak.) A

beporzást végző állatok (főként poszméhek és lepkék) könnyedén mozognak az élőhely középső részét jelentő nyílt sziklagyepes lejtők fölött. A rokonsági körök átlagos méretében – 117,5 m élű négyzet – tükröződik ez vissza. A pollinátorok igen gyakori kis távolságot lefedő mozgása és az erdős részekkel körülvett pozíció lehet a háttere a szélső helyzetű 8-, 9-, 14-, 15-, 16-os alpopulációk kimutatható elkülönülésének. Hasonlóképpen, a kicsiny távolságra eljutó allélok (pollen!) viszonylagos nagy száma fenntarthatta a változatosságot, és egyben a központi helyzetű foltokban megőrizhette a ritka allélokat, és egyben meg is akadályozhatta ott a legtöbb közeli alpopuláció differenciálódását. A központi helyzetű foltokban (pl. 3., 5., 13. stb.) talált nagyobb mérvű polimorfizmus is ezt tükrözi. A differenciálódás hiánya esetükben abból adódhat, hogy a közöttük meglévő génáramlási korlátot csupán a zigóta (mag) szinten jelentkező korlátozott terjedés jelenti. A bizonyos alpopulációkat elválasztó erdős sávok/völgyek ahhoz nem elég szélesek, hogy a pollinátorok mozgását teljesen meggátolják. Az eredmény az, hogy alkalmanként pollenmigráció lehetséges még a viszonylag távoli foltokra is, bár a pollinátorok legtöbbször egy folton belül szállnak növényről növényig, majd idővel átválnak a szomszédos foltra. A 16-os és az attól legtávolabbi 9-es alpopuláció legmesszebb lévő északi részéről származó néhány egyedének genetikai hasonlósága miatt látható a 34-es távolsági osztálynál pozitív térbeli autokorreláció, hasonlóképpen a 21-es távolsági osztálynál a 9-es és 14-es folt egyedeire – a pollinátorok hosszabb távú mozgásának bizonyítékai lehetnek. Az így keletkező hosszabb távú pollenmigráció megakadályozza a nagyfokú differenciálódást a populációban. Arra a következtetésre juthatunk, hogy a populáció élőhelyén az erdővel borított részek kisebb, természetes vagy mesterséges eredetű tisztásain élő, szélső helyzetű foltok enyhén differenciálódtak, de semmiképp sem izoláltak a középső helyzetű foltoktól, a génáramlás közöttük tetten érhető. A ritka allélok jelenléte is megerősíti ezt. Meg kell említeni, hogy a nyílt sziklagyepes és az erdővel körülvett kis tisztások mikroareáinak különbségei hozzájárulhatnak, és fenn is tarthatják a variabilitást.

A foltokon belüli igen kis léptékű differenciálódásra is sor kerülhet, amelyben szerepe lehet a folt részletes élettörténetének. A RAPD-mintázatok összehasonlítása fényt derített például a 9-es alpopuláció északnyugati részében az egymás szoros közelségében élő egyedek genetikai viszonyára, és egyben rámutatott a klonális szerkezet hiányára. A genetikailag hasonló egyedek egymás szoros szomszédságában voltak azonosíthatóak mind klaszteranalízissel, mind térbeli autokorrelációs módszerrel. A 9. ábra UPGMA fáján az $SM = 0,98$ hasonlósági érték egyetlen RAPD-sávnál különbséget jelent (62-ből) az egyedek között és 12 egyedpárnál tapasztaltuk. E 12 pár közül 10-nek a tagjai mintegy 0,5 m-re nőttek egymástól, s ezt magyarázhatja matrilineáris származás és jel-

legzetes megújulás a folton belül. A 10., 11. és 12. ábra egymást kiegészítve demonstrálja a rokon csoportok elhelyezkedését a 16 m²-en. Az is leolvasható a 11. ábráról, hogy a lejtő befolyásolja ezt, mert az ábra felső széle a lejtős mintaterület tetejének, az alsó széle pedig az aljának felel meg. Ez a finom léptékű vizsgálattal feltárt szerkezet szintén a matrilinearitás meglétét és a leptokurtosisos terjedést indikálja. Meg kell jegyezni azonban, hogy nem ismeretes sem a mintaegyedek kora, sem a korszerkezete, valamint az öntermékenyítés lehetőségét sem zárhatjuk ki teljesen.

A kismértékű heterozigócia és a ritka allélok valóban nagyon korlátozott elterjedése ellenére a palacknyakhatás grafikus tesztje nem tárta fel a rá jellemző allélgyakorisági eloszlást. Izoenzimes adatok szerint (CHAKRABORTY és mtsai 1980) a palacknyakhatáson át nem esett populációkban a kis gyakoriságú allélok száma jóval meghaladja a közepes gyakoriságúakét, amint azt jó néhány vizsgált populációnál ki is mutatták. Az általunk tapasztalt ilyen típusú eloszlásnak a magyarázatául szolgálhat: a) az alpopulációk enyhe differenciálódása és/vagy a véletlenszerű párosodás hiánya elfedheti a palacknyakhatást; b) a kisfokú változathoz való közelség miatt a megvizsgált gének alacsony száma nem volt elegendő ahhoz, hogy a palacknyakhatás eloszlását láthassuk; c) demográfiai palacknyakjelenség lépett fel és nem genetikai; d) a palacknyakjelenség nem a populáció közelmúltjában (1–10 generációs idő) lépett fel. Az élőhely történetébe betekintést nyerhetünk a közeli falvak történetének megismerésével, ami segíthet a kérdések megválaszolásában is. A környező településeket az 1700-as évek kezdetétől építették ki. A lakosság főként állattenyésztéssel (így legeltetéssel is) foglalkozott, amire a dolomitgyepek alkalmasak voltak. A kezdeti időszakból a 20. század elejéig az alsóbb fekvésű területeken az erdőt irtották is a legelésre alkalmas helyek biztosítására. Ezzel a nyílt gyepek területe növekedett, és betelepülésre új élőhelyeket is adhatott a dolomitlennek. A huszadik század elejétől azonban a legeltetés jelentősége csökkent, és erdősítésbe kezdtek a dolomitgyepek szélső részein. Az 1900-as évek közepére az északkeleti részeket ültetett feketefenyves borította, s emiatt csökkent a dolomitlen élőhelyének területe. Ez a csökkenés azonban nem lehetett elegendő ahhoz, hogy jelenleg kimutatható palacknyakhatást eredményezzen, de demográfiai palacknyakjelenség érthette a jégkorszakot túlélő populációt.

Megőrzési és kezelési vonatkozások

Változatos ökológiai és környezeti hatások mellett maradhatott fenn a kis populáció. A gyenge genetikai diverzitás az ősi szintnek a maradványát képviseli. Annak ellenére, hogy a polimorf lokuszok aránya a más endemikus fajoknál tapasztalható képest magas, a génenkénti allélok kicsi száma és a hetero-

zigóták általános hiánya erőteljesen figyelmeztet a genetikai elszegényedésre. A vonatkozó irodalomban fellelhető megfigyelések szerint a *Linum dolomiticum* olyan faj, amely csak speciális, alkalmas foltokon tud élni és szaporodni, ahol a környezeti fluktuáció súlyosan befolyásolja az ott lévő egyedek és az egész élőhelyfolt sorsát (feltételezhetően denzitástól független módon). A populáció élőhelyének területén több olyan alkalmas gyepes folt is található, amelyen a dolomitlen szabadon nőhetne, tökéletesen hasonlóak az általa elfoglalt gyepfoltokhoz – mégsem él rajta a faj egyetlen egyede sem. A legszembetűnőbb magyarázat a korlátozott lokális magiszóródás. Viszont a szabad, elméletileg elfoglalható élőhelyfoltok növelik a metapopuláció hosszabb távú túlélési kilátásait (LEVINS 1969).

A faj jellegzetességeinek és a fennmaradást biztosító tényezőknek a kellő mélységben történő megismeréséhez több kutatási vonatkozásban vannak tennivalók. Megismerendő: a szaporodási rendszer, a pollinátorok viselkedése és a pollen terjedése, a magtermelés, a propagulumok helyben maradása/terjedése és kifejlődése, az alpopulációk közötti pollennel, illetve maggal történő (ha van ilyen) génáramlás, a térbeli és időbeli foltdinamika a különböző mikroareakban a különböző környezeti tényezők fluktuációja mellett. A körbe tartozó vizsgálatok közül már elindultak a folt-dinamikai megfigyelések (DOBOLYI 2008), amelyek hozzájárulhatnak annak az alpopuláció/élőhelyfolt számnak a megállapításához, amely szükséges a populáció fennmaradásához. Szimulációs tanulmányok bebizonyították, hogy a súlyos emberi hatás által okozott mortalitást elszenvedő populációk, amelyeknél az egyedek eloszlása egyenlőtlen az élőhelyfoltok között, inkább fennmaradhatnak nagyobb számú kis élőhelyfolton – mert a foltok nagy száma növeli a geometriai átlagos fitnesszt (más paraméterek azonossága esetén) – ellentétben a néhány, de nagy kiterjedésű élőhelyfolt esetével (BASCOMPTE és mtsai 2002). Ezt az elvet hangsúlyozni kell a *Linum dolomiticum* esetében több okból. Először is a faj jellegzetességének tűnik, hogy a propagulumok nem szóródhatnak teljesen szabadon és véletlenszerűen a populáció területén. Másodsorban, a foltdinamikai vizsgálatok szerint igen széles határok között változhat az egyedek/lenfoltocskák eltűnésének és megjelenésének aránya az aktuális élőhelyfoltokban (DOBOLYI 2008), amely könnyen és véletlenszerűen okozhatja egyes foltokon az egyedek eltűnését. Így például a 64 m²-es területen az első vizsgálati szakaszban a lenfoltok 4,6%-a halt ki rövid idő alatt, ami megmagyarázható egyedül a 2003-as év extrém időjárásával is. Télen rendkívülien alacsony volt a hőmérséklet, a 30 éves átlagnál 2–5 °C-kal kevesebb napi középhőmérséklettel, a hidegrecord január–februárban –31,9 °C volt, éppen az adott régióban; a teljes csapadékmennyiség decembertől februárig csupán 80–100 mm volt; majd ismét rendkívüli, de hóhullám és szárazság következett

májustól augusztusig, amikor a napi középhőmérséklet 4–6 °C-kal magasabb volt a 30 éves átlagnál, a hőségrekord 40 °C, júniustól szeptemberig pedig 100 mm-nél kevesebb volt a teljes csapadékmennyiség (OMSZ, www.met.hu). A dolomitlen élőhelye, a sziklás nyílt dolomitgyep, igen gyorsan felveheti az extrém hőmérsékleteket, és a fent említett abiotikus stressz okozhatta akár önmagában is a gyors egyedszám változást. Az alkalmanként előforduló emberi zavarás még fokozhatja az abiotikus hatások miatt bekövetkező random kipusztulásokat, és a nagyon is kérdéses távolsági magszóródás miatt ilyenkor a növényanyag nem újulhat meg. Legelső szinten a megmaradt élőhelyfoltok hatékony védelme kulcsfontosságú a populáció hosszú távú túlélési esélyéhez, mind a vandalizmus, mind az invázió gyomok betelepülése kiküszöbölendő. A konzerváció következő fázisában megfontolandó a gondos tervezéssel kiválasztott alpopulációknál maggyűjtés, majd a gyűjtött mag keverékének mesterséges terjesztése előzetes felméréssel kiválasztott alkalmas, ma dolomitlenmentes foltokon – az élőhelyfoltok számának növelése. Jó néhány hasonló ökológiai tulajdonságokkal bíró, lehetséges ilyen gyepfolt létezik. Feltételezhető, hogy ezeken is élt egykor *Linum dolomiticum* a populáció drasztikus pusztulása előtt, ami főként emberi hatásra léphetett fel. Az ilyen mesterséges terjesztéshez az ígéretes élőhelyfoltokon a környezeti tényezőket és a cönológiai jellegzetességeket előzetesen meg kell vizsgálni. Ez a javaslat csupán demográfiai gyógymódot jelenthet, hogy ily módon a drasztikus egyedszámcsökkenés megelőzésével védekezni lehessen a további genetikai beszűkülés ellen, megőrizhető legyen az a természetes betegségekkel és stresszel szembeni ellenálló képességgel kapcsolatos génkészlet, ami kiemelten fontos a konzerváció folyamatában. Fontos lenne ez azért, mert a rokonságban lévő egyedekből álló csoportokat tartalmazó genetikai szerkezet erősen befolyásolja a viabilitási szelekciót, és mikrokörnyezeti feltételekhez való adaptációt eredményezhet. Az ex situ konzerváció kivihetetlennek látszik a faj specifikus élőhelyi igényei miatt.

*

Köszönetnyilvánítás – Köszönetet mondunk Tuschek Máriának és Kapusi Eszternek nélkülözhetetlen részvételükért a terepi és laboratóriumi munkákban. Köszönjük a Duna–Ipoly Nemzeti Park Igazgatóságának a munka engedélyezését, dr. Kézdy Pál tájegységvezetőnek a munka messzemenő támogatását. A vizsgálatokat az OTKA T032912 számú kutatási programja keretében és az Európai Unió Life Nature Alapjának támogatásával (Life 03 Nat/H/000167) végeztük.

IRODALOMJEGYZÉK

- ALDRICH, J. & CULLIS, C. A. (1993): RAPD analysis in flax: Optimization of yield and reproducibility using KlenTaq 1 DNA polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA. – *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 128–141.
- ARULSEKAR, S. & PARFITT, D. E. (1986): Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. – *Hort Science* **21**: 928–933.
- BASCOMPTE, J., POSSINGHAM, H. & ROUGHGARDEN, J. (2002): Patchy populations in stochastic environments: Critical number of patches for persistence. – *American Naturalist* **159**: 128–137.
- BERN CONVENTION (1979): *Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats*. – European Treaty Series No. 104, Council of Europe, European Centre for Nature Conservation, Strasbourg, 19 September 1979.
- BORBÁS, V. (1897): Bemutatja a *Linum dolomiticum*-ot. – *Természettudományi Közlemények* **34**: 208–209.
- BROWN, A. H. D. & WEIR, B. S. (1983): *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. – Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- CHAKRABORTY, R., FUERST, P. A. & NEI, M. (1980): Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. III. Distribution of allele frequencies and the number of alleles per locus. – *Genetics* **94**: 1039–1063.
- Commission of the European Communities (1995): *CORINE biotopes. The design, compilation and use of an inventory of sites of major importance for nature conservation in the European Community*. – OPOCE Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg; <http://reports.eea.eu.int/COR0-biotopes/en>.
- CONKLE, M. T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B. és HUNTER, S. C. (1982): *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. – USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep. PSW-64, Berkeley, CA: Pacific Southwest Forest and Range Experimental Station.
- DAVIS, B. J. (1964): Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. – *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**: 404–427.
- DOBOLYI, K. (2006): Study of the population dynamics of *Linum dolomiticum* Borbás (*Linaceae*). – *Studia botanica hungarica* **37**: 35–39.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- EPPERSON, B. K. (1993): Spatial and space-time correlations in systems of subpopulations with genetic drift and migration. – *Genetics* **133**: 711–727.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. – *Genetics* **131**: 479–491.
- FARKAS, S. (szerk.) (1999): *Magyarország védett növényei*. – Mezőgazda Kiadó, Budapest, 425 pp.
- GOUDET, J., RAYMOND, M., DE MEEÛS, T. és ROUSSET, F. (1996): Testing differentiation in diploid populations. – *Genetics* **144**: 1933–1940.
- HAMRICK, J. L. (1989): *Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations*. – In: SOLTIS, E. D. és SOLTIS, P. S. (szerk.): *Isozymes in plant biology*. Dioscorides, Portland, Oregon, pp. 87–105.
- HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. W. (1990): *Allozyme diversity in plant species*. – In: BROWN, A. H. D., CLEGG, M. T., KAHLER, A. L. & WEIR, B. S. (szerk.): *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 43–63.

- HARDY, O. & VEKEMANS, J. (2002): SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. – *Molecular Ecological Notes* **2**: 618–620.
- HUFF, D. R., PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. (1993): RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). – *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 927–937.
- IUCN Species Survival Commission (2003): *2003 IUCN red list of threatened species*. – <http://www.redlist.org>.
- KIMURA, M. & CROW, J. F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. – *Genetics* **49**: 725–738.
- KVM (Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium) (2001): 13/2001. (V.9.) KöM. r. A védett és fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben a természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről. – *Magyar Közlöny* **53**: 3446–3511.
- LEVENE, H. (1949): On a matching problem arising in genetics. – *Annals of Mathematical Statistics* **20**: 91–94.
- LEVINS, R. (1969): Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. – *Bulletin of the Entomological Society of America* **15**: 237–240.
- LEWONTIN, R. C. (1972): The apportionment of human diversity. – *Evolutionary Biology* **6**: 381–398.
- LOISELLE B. A., SORK, V. L., NASON, J. & GRAHAM, C. (1995): Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). – *American Journal of Botany* **82**: 1420–1425.
- LUIKART, G., ALLENDORF, F. W., CORNUET, J.-M. & SHERWIN, W. B. (1998): Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. – *Journal of Heredity* **89**: 238–247.
- NEI, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. – *Genetics* **89**: 583–590.
- OMSZ (Országos Meteorológiai Szolgálat). – <http://www.met.hu>.
- PEAKALL, R. és SMOUSE, P. E. (2001): *GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research*. – Australian National University, Canberra, Australia; <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.
- PEAKALL, R., RUIBAL, M. & LINDENMAYER, D. B. (2003): Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. – *Evolution* **57**: 1182–1195.
- PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. & HUFF, D. R. (1995): Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of Buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). – *Molecular Ecology* **4**: 135–147.
- PODANI, J. (2001): *SYN-TAX 2000. Computer program for data analysis in ecology and systematics*. – Scientia Publishing, Budapest.
- RAKONCZAY, Z. (szerk.) (1989): *Vörös könyv. A Magyarországon kipusztult és veszélyeztetett növény- és állatfajok*. – Akadémiai Kiadó, Budapest, 360 pp.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. (1995): An exact test for population differentiation. – *Evolution* **49**: 608–615.
- ROHLF, F. J. (2001): *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1*. – Exeter Software, East Setauket, New York.
- ROUSSET, F. (1997): Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. – *Genetics* **145**: 1219–1228.

- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. (2000): *ARLEQUIN ver. 2.00. A Software for population genetics data analysis.* – Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SMOUSE, P. E. & PEAKALL, R. (1999): Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. – *Heredity* **82**: 561–573.
- SMOUSE, P. E., NEEL, J. V. & LIU, W. (1983): Multiple-locus departures from panmictic equilibrium within and between village gene pools of Amerindian tribes at different stages of agglomeration. – *Genetics* **104**: 133–153.
- SOKAL, R. R. & ODEN, N. L. (1978a): Spatial autocorrelation in biology 1. Methodology. – *Biological Journal of the Linnean Society* **10**: 199–228.
- SOKAL, R. R. & ODEN, N. L. (1978b): Spatial autocorrelation in biology 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interests. – *Biological Journal of the Linnean Society* **10**: 229–249.
- SOKAL, R. R. & ODEN, N. L. (1991): Spatial autocorrelation analysis as an inferential tool in population genetics. – *American Naturalist* **138**: 518–521.
- SOKAL, R. R. & WARTENBERG, D. E. (1983): A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. – *Genetics* **105**: 219–237.
- SOLTIS, D. E., HAUFLE, C. H., DARROW, D. C. & GASTONY, G. J. (1983): Starch gel electrophoresis of fern isoenzymes: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. – *American Fern Journal* **73**: 9–27.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. – *Evolution* **38**: 1358–1370.
- WRIGHT, S. (1922): Coefficients of inbreeding and relationship. – *American Naturalist* **56**: 330–338.
- WRIGHT, S. (1943): Isolation by distance. – *Genetics* **28**: 114–138.
- WRIGHT, S. (1965): The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. – *Evolution* **19**: 395–420.
- YEH, F. C., YANG, R. & BOYLE, T. (2000): *POPGENE Version 1.32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis.* – <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.html>.

GENETIC VARIATION AND POPULATION STRUCTURE
IN THE ENDANGERED NARROW ENDEMIC
LINUM DOLOMITICUM IN HUNGARY

MAJOR, Á.¹ and DOBOLYI, K.²

¹Laboratory for Molecular Taxonomy, Hungarian Natural History Museum
H-1431 Budapest, Pf. 137, Hungary; E-mail: major@nhmus.hu

²Department of Botany, Hungarian Natural History Museum
H-1476 Budapest, Pf. 222, Hungary; E-mail: dobolyi@bot.nhmus.hu

This study investigated the genetic variation of the fragmented only population of endemic *Linum dolomiticum* Borbás in Hungary. Based on the data of 16 isoenzyme loci, it was characterised by the traditional genetic variability measures of 130 individuals (16 subpopulations) and by genotype analyses both at individual and subpopulation levels. The genetic diversity reflected endemic state and genetic depauperation. The isoenzyme data were used to test whether a recent severe genetic bottleneck could be detected. The fine scale structure with matrilineal groups was revealed

by spatial autocorrelation analysis of the RAPD dataset from 160 individuals growing in a 16 m² plot which at the same time excluded putative clonal growth. Both isoenzyme and RAPD analyses gave information on leptokurtic dispersal. Differentiation of some subpopulations was proved by exact test, however, no correlation was found between the significant differentiation and the spatial distance of the subpopulations. No significant recent bottleneck was revealed, however, nearly 5% of the individuals got extinct in a 64 m² sample plot during the four years observation period. Potential conservation and management actions are discussed to minimise further genetic erosion.

Key words: endemism, fine scale spatial genetic structure, genetic variability, *Linum dolomiticum*, spatial autocorrelation