

Doktori (PhD) értekezés

**KAJSZIFAJTÁK GENETIKAI ANALÍZISE DNS-ALAPÚ
MARKEREKKEL**

Ruthner Szabolcs

Témavezető: Dr. Pedryc Andrzej, CSc
egyetemi tanár

Budapesti Corvinus Egyetem
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest
2010

A doktori iskola

megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
vezetője:	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszék
Témavezető:	Dr. Pedryc Andrzej egyetemi tanár, CSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés 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, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Dr. Tóth Magdolna
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Pedryc Andrzej
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. december 9-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Hrotkó Károly, DSc

Tagjai

Höhn Mária, CSc

Szabó Zoltán, DSc

Szalay László, PhD

Zámboriné Németh Éva, DSc

Opponensek

Kiss Erzsébet, CSc

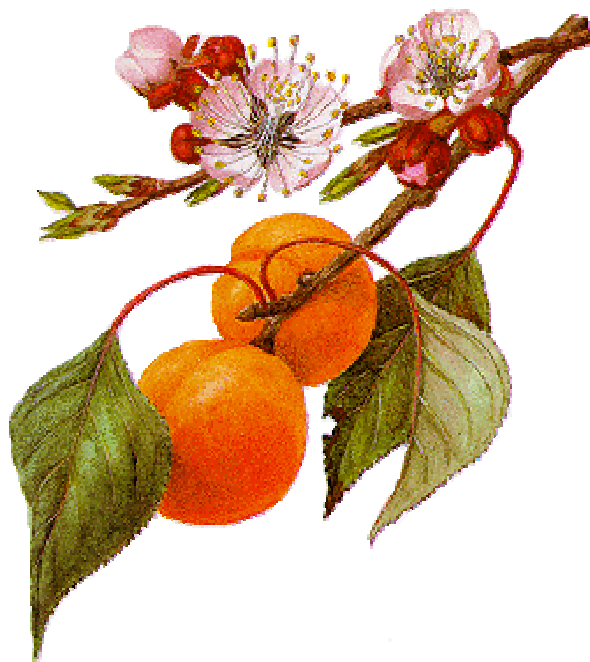
Palkovics László, DSc

Titkár

Höhn Mária, CSc

*„A kajszi is leszedve rég, folyékony
arannyá főtt. Langy körte és dicső
őszibarack pompáz a törpe fákon,
roncs férj karján virágzó húsú nő.,,*

/Babits Mihály/



TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	5
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1	Kajszfajták általános jellemzése, ökoföldrajzi csoportosítása	6
2.2	Molekuláris markerezés	8
2.2.1	A molekuláris markerek fogalma, típusai, általános jellemzői.....	9
2.3	Izoenzim markerek	11
2.3.1	Izoenzimek a <i>Prunus</i> nemzetségben.....	12
2.3.1.1	Izoenzimek alkalmazása a kajszi esetében	13
2.4	Az RFLP markerek	14
2.4.1	RFLP markerek alkalmazása a <i>Prunus</i> fajokban.....	15
2.5	PCR – polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction).....	17
2.6	RAPD-polimorfizmus.....	18
2.6.1	RAPD-polimorfizmus kimutatása a <i>Prunus</i> nemzetségben.....	19
2.6.1.1	Őszibarack	19
2.6.1.2	Mandula	20
2.6.1.3	Szilva	20
2.6.1.4	Cseresznye	21
2.6.1.5	RAPD-polimorfizmus vizsgálata kajsziaracknál	22
2.7	Az AFLP markerek.....	25
2.7.1	AFLP markerek alkalmazása a <i>Prunus</i> fajoknál.....	25
2.8	Mikroszatellit markerek.....	28
2.8.1	A mikroszatellit markerek jellemzői, funkciója és evolúciója	28
2.8.2	A mikroszatellit markerek alkalmazhatósága a növényekben.....	30
2.9	Mikroszatellit markerek használata a <i>Prunus</i> nemzetségben	31
2.9.1	Mikroszatellit régiók azonosítása és primerfejlesztés.....	31
2.9.2	Mikroszatellit markerek alkalmazása a fontosabb <i>Prunus</i> fajokban.	33
2.9.2.1	Őszibarack	33
2.9.2.2	Cseresznye és meggy.....	35
2.9.2.3	Mandula	35
2.9.2.4	Szilva	36
2.9.2.5	Kajszi	37

3	A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLJAI	43
4	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	45
4.1	Növényanyag	45
4.2	DNS-izolálás	45
4.3	RAPD analízis.....	45
4.4	SSR analízis fajtaazonosítási céllal.....	52
4.5	SSR analízis őszibarack mikroszatellit primerekkel.....	53
4.6	SSR analízis kajszi mikroszatellit primerekkel	55
5	EREDMÉNYEK	57
5.1	DNS kivonási eljárás adaptálása kajszira	57
5.2	Magyarországon termesztett fő kajszifajták analízise RAPD markerekkel....	58
5.3	Magyarországon termesztett fő kajszifajták analízise SSR markerekkel	59
5.4	Az őszibarackra tervezett SSR primerkészlet alkalmasságának vizsgálata kajszi mikroszatellit régiók variabilitásának kimutatására	63
5.5	Kajszi genomokra tervezett SSR régiók variabilitásának elemzése egy széles genetikai bázisú kajszifajta csoporton	66
5.5.1	A fajták közötti genetikai kapcsolatok vizsgálata.....	69
5.5.2	Ökoföldrajzi csoportok és a rokon fajok közötti genetikai kapcsolat....	69
6	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	72
6.1	DNS-kivonási eljárás adaptálása kajszira	72
6.2	A Magyarországon legnagyobb területen termesztett fajták azonosítása és egyedi DNS-ujlenyomat készítése RAPD és SSR markerekkel.....	74
6.2.1	Jellemzés RAPD markerekkel	74
6.2.2	Jellemzés SSR markerekkel.....	76
6.3	Őszibarack SSR primerek használata 45 kajszigenotípus jellemzésére	77
6.3.1	A felhasznált primerek alkalmassága és a polimorfizmus jellemzői.....	77
6.3.2	A vizsgált fajták genetikai kapcsolatának elemzése	78
6.3.3	A felhasznált elválasztási technika jellemzői	79
6.4	Kajszi SSR markerekkel vizsgált 136 genotípus azonosítása és genetikai kapcsolatuk, származásuk elemzése	80
6.4.1	A felhasznált primerek alkalmassága és a polimorfizmus jellemzői.....	80

6.4.2	A kajszi genetikai változékonysága és fajták közötti genetikai kapcsolatok	82
6.4.3	A kajszi és néhány rokon faj genetikai kapcsolatának elemzése klaszteranalízissel	86
6.4.4	Ökoföldrajzi csoportok közötti genetikai viszony	86
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	88
8	ÖSSZEFOGLALÁS.....	89
9	SUMMARY	91
10	MELLÉKLET	93
M1.	Irodalomjegyzék	93
M2.	DNS-kivonási protokollok.....	112

1 BEVEZETÉS

Magyarországon több évszázados hagyománya van a kajszii termesztésének. A magyar kajszii kiváló tulajdonságait külföldön is elismerik, és hungarikumként tartják számon. Tradícióból és hírnévből azonban sokáig megélni nem lehet, a piaci lehetőségeket ezért csak úgy lehet kihasználni bel- és külföldön egyaránt, ha kiváló minőségű gyümölcsöt termesztünk. Ehhez megvannak a megfelelő termőhelyeink, kiváló beltartalmi értékekkel rendelkező hagyományos fajtáink és a szakmai tudás. A változó fogyasztói szokásokkal és piaci igényekkel azonban csak úgy tudunk lépést tartani, ha a termesztést folyamatosan fejlesztjük. Az innovációs tevékenységnek minden részletre ki kell terjednie a termőhelyi alkalmasság meghatározásától a technológia kidolgozásán keresztül az értékesítésig. Ezen belül meghatározó jelentősége van a fajtahasználatnak. A magyar termesztők rendelkezésére álló fajtaválaszték sajnos csak lassan bővül, pedig nagy szükség lenne a sarkavírussal szemben rezisztens és a kereskedelmi céloknak megfelelő új fajtákra, ami a világon már több helyen elérhető.

Jelenleg két helyen folyik kajszii nemesítés Magyarországon: Cegléden a Gyümölcsstermesztési Kutató-Fejlesztő Intézetben, ahol nemes fajták és alanyok előállításával is foglalkoznak, illetve Budapesten a Corvinus Egyetem Kertészettudományi Karának Genetika és Növény nemesítés Tanszékén. Az Egyetemen korszerű biotechnológiai módszereket is alkalmazunk a nemesítésben. A génforrások tulajdonságainak elemzésében és molekuláris markerekkel történő megkülönböztetésében jelentős eredményeket értünk el, amelyek hozzájárulhatnak a nemesítőmunka sikeréhez.

A nemesítési folyamatok felgyorsításának egyik eszköze a DNS-markerekre alapozott szelekció. Viszonylag egyszerűen és egyértelműen azonosítható, változatos allélösszetételű, ismert szabályok szerint öröklődő markerlókuszok segítségével megvalósítható a fajtákban rejlő genetikai polimorfizmus kutatása, a fajták eredetének és rokonsági kapcsolatainak vizsgálata, fajták azonosítása. A nemesítői szellemi tulajdon védelmében, a fajtaazonosítási céllal használt molekuláris markerek szerepe fokozatosan felértékelődik. Így a technika nagymértékben könnyítheti a nemesítőket illető fajtahasználati díj begyűjtését, ami alapját képezheti a későbbi nemesítési programoknak.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Kajszi fajták általános jellemzése, ökoföldrajzi csoportosítása

A kajszi a *Rosaceae* család, *Prunoideae* alcsalád *Prunus* L. nemzetségébe tartozik. A legtöbb termesztett kajszi fajtát a *Prunus armeniaca* L. faj adja. Vavilov (1926; 1951) a kajszi származási központjaként Kína északi, észak-keleti hegységeit jelölte meg. A vad kajszi formákban gazdag Tien-san, valamint Dzsungária hegységei másodlagos géncentrumnak tekinthetők (1. táblázat) (Mehlenbacher és mts., 1991).

A kajszi fajták négy különböző földrajzi csoportba sorolhatók: ázsiai, kaukázusi, európai és a dzsungár-altáji (Kosztina, 1969), melyeket később a kínai és a kelet-kínai csoportokkal egészítettek ki (Bailey és Hough, 1975). Az Európában, Észak-Amerikában, Dél-Afrikában és Ausztráliában termesztett fajták túlnyomó része egyaránt az európai csoportba sorolható. Ez a csoport számít a termesztési szempontból jelentős négy csoport közül a legfiatalabbnak és a legkevésbé változékonyak.

1. táblázat: A kajszi ökoföldrajzi csoportjai (Mehlenbacher és mts., 1991)

Csoport	Alcsoport	Fajták
1. Dzsungár-Zaili	Dzsungári	helyi fajták
	Zailij	helyi fajták
2. Közép-ázsiai	Fergani	Boban, Kec-psar, Khurmai, Kandak, Suphani, Isfarak, Mirsandshali
	Zerevsani	Badami, Ahrori, Arzami, Sadifak, Iska-dari, Tuliaki, Khosravshai
	Szamarkandi	Kok-psar, Szamarkandszkij szamji rannij
	Sahrisyabzi	
	Horezmi	Kizil-nukul, Ak-nukul, Kizil-Palvan
	Kopet-dagi	Ashkhabad
3. Irano-kaukázusi	Íráni-kaukázusi	Salah, Spitak, Malayer, Damavand, Hacıhalioglu
	Dagesztáni	Hekobrash, Honobah
	Észak-afrikai	Hamidi, Bedri, Baour, Amor Leuch, Laribi
4. Európai	Nyugat-európai	Canino, Montedoro, Vecot, Royal, Moniqui
	Kelet-európai	Magyar kajszi
	Észak-európai	Zserdeli magoncok
5. Észak-kínai		<i>P. armeniaca</i>
6. Tibeti		<i>P. armeniaca</i> var. <i>holosericea</i>
7. Észak-kelet kínai		<i>P. armeniaca</i> , <i>P. sibirica</i> , <i>P. mandshurica</i>
8. Kelet kínai		<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>

Amíg a kajszii elsődleges géncentrumában található kínai és közép-ázsiai fajták nagy része (Mehlenbacher és mts., 1991), a török fajták 60%-a (Paydas és mts., 2006), a magyar származású fajták közel 20%-a önmeddő, addig a nyugat-európai tradicionális fajták között alig fordul elő önmeddő genotípus (Mehlenbacher és mts., 1991). Ezek alapján az öntermékenyülő jelleget kialakító mutáció valószínűleg a kajszii elterjedésének útvonalán, a Kína és Törökország közötti földrajzi térségben következhetett be. Mind a kajszii, mind az őszibarack kultúrevolúciója során kiemelik a Tien-san vidékét, a Fergánai-medencét és Dzsungária környékét, melyek a magashegyi környezet, erős UV-sugárzás, szélsőséges hőingadozás és csapadékeloszlás révén jelentősen növelhették a mutációs rátát (Timon, 2000; Surányi, 2003).

Magyarországon a kajszit hagyományosan öntermékenyülőnek ismerik. Elsőként a hazai fajták közül az 1971-ben előzetesen állami elismerésben részesített 'Szegedi mammut'-ról derült ki, hogy önmeddő (Brózik és Nyéki, 1975), amit néhány év elteltével az Óriás fajtacsoport többi tagjáról is igazoltak (Szabó és Nyéki, 1991).

A világ kajszitermesztésének jelentős részét az európai ökoföldrajzi csoportba tartozó kajszifajták adják. E csoport tagjainak túlnyomó többsége öntermékenyülő, de éppen ebből kifolyólag e csoport genetikai variabilitása igen korlátozott. A piaci igényeknek megfelelő, egyre újabb fajták előállításának kényszere megköveteli, hogy a nemesítő egyre szélesebb genetikai bázisú alapanyagokat használjon fel nemesítési programjában. Az Egyesült Államokban, illetve Kanadában létrehozott fajtákat gyümölcstömögük, színük miatt nem lehet kihagyni a nemesítési programokból. A közép-ázsiai fajták esetében a magas cukortartalom, aszalványkészítésre való alkalmasság, hosszú mélynyugalmi állapot azok a tényezők, amelyek miatt a különböző nemesítő műhelyekben ezek a fajták is potenciális szülőpartnernek számítanak. Ezen nemesítési programok hatására Európában is egyre több, széles körben elterjedt, önmeddő fajtát hoztak forgalomba az utóbbi 15 év során (Burgos és mts., 1993; Pedryc, 2003).

2.2 Molekuláris markerezés

„Az első mai értelemben vett és tudományosan megalapozott növénygenetikai vizsgálatok több mint egy évszázadra, Mendel (1886) borsóval végzett kísérletéig nyúlnak vissza. Az első kapcsoltsági vizsgálat Sturtevant (1913) nevéhez fűződik, aki az ecetmuslica X kromoszómájának kapcsoltsági térképét készítette el 5 morfológiai marker alapján. A '60-as évek végéig morfológiai, agronómiai és élettani tulajdonságokat meghatározó alléleket használtak genetikai markerként” (Törjék, 2001).

„A '70-es évek elejétől kezdődően a biokémiai markerek csoportjába tartozó izoenzim (Markert és Moller, 1959) és tartalékfehérje markerek terjedtek el, majd a '80-as évektől jelentek meg a DNS-alapú markerek, és váltak általánossá a genomanalízisben. A DNS-markerek közül korábban a hasítási elven működő RFLP, az utóbbi két évtizedben pedig a PCR-alapú technikák terjedtek el” (Törjék, 2001). A morfológiai, izoenzim és DNS-alapú markerek összehasonlítását a 2. táblázat tartalmazza.

A fehérje-, illetve DNS-alapú genetikai markereken alapuló technikák használata napjainkra rutinszerűvé vált az ökológiai, evolúciós, taxonómiai, filogenetikai és a növényi genomokat érintő gyakorlati felhasználású tanulmányokban. Ezeknek az eljárásoknak az alapprotokolljai már precízen kidolgozottak, az alkalmazásuk előnyei és hátrányai, felhasználásuk potenciális területei jól ismertek. A folyamatosan megjelenő új markerezési módszerek a fenti alaptéchnológiák kombinálásán, illetve az adott kutatási célnak megfelelő finomításokon alapulnak.

A legújabban kifejlesztett markerek kihasználják az olyan növényi genomkomponenseket, mint például a retrotranszpozonokat, mitokondriumokat, kloroplasztiszokat. A következő években a teljes növényi genomokra kiterjedő ismeret gyors ütemű bővülésével, a markerezési technikák fejlődésében és a markerek alkalmazásában további jelentős előrelépések várhatók.

2.2.1 A molekuláris markerek fogalma, típusai, általános jellemzői

„A molekuláris markerek a DNS meghatározott szakaszai, amelyek azonosítható kromoszomális lokalizációval rendelkeznek, öröklődésük a mendeli szabályok alapján követhető. A marker lehet gén is, de általában ismeretlen funkciójú DNS-szakasz, olyan lókuszt a kromoszómán, amely a különböző genotípusokban eltérő szekvenciákat, a fenotípus kialakításában részt nem vevő, semleges allélokot hordoz. A morfológiai és biokémiai markerektől eltérően számuk csak matematikai értelemben nem végtelen, fenotípusos vagy élettani hatásuk általában nincsen” (Kiss, 2005). A markerek jelenlétét nem befolyásolják a környezeti tényezők, pleiotróp és episztatikus hatások.

„Az ideális DNS-markerek a következő tulajdonságokkal rendelkeznek:

- nagyfokú polimorfizmus, amely egyenletesen oszlik el a genomban,
- kodomináns öröklődés,
- könnyű hozzáférhetőség, nem igényel előzetes információt a vizsgált genomról,
- könnyű és gyors vizsgálat,
- reprodukálhatóság,
- az adatok egyszerű cserélhetősége a laboratóriumok között.

E követelményeknek egy-egy marker csak részben felel meg. A cél és a feladat határozza meg, hogy mikor melyik marker típust választjuk” (Kiss, 2005). A kertészeti növényeknél leggyakrabban a következő módszereket alkalmazzák: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS, SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) szekvencia alapján jellemzett marker, SSR (*Simple Sequence Repeats*) amplifikált mikroszatellit régió, CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) vagy PCR-RFLP hasított és felszaporított fragmentumok polimorfizmusa, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus. A felhasználhatóság szempontjából értékelt, a leggyakrabban használt DNS-alapú markertípusokat a 3. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Morfológiai, izoenzim és DNS alapú markerek összehasonlítása főbb jellemzőik alapján (Moissy-Cramayel, 1994)

Jellemzők	Morfológiai markerek	Izoenzimek	DNS-alapú markerek
Kölcsönhatás a környezettel	erős	gyenge	nincs
Analizálható növény kora	fiataltól idősig	fiatal	fiatal
Növényi alapanyag	teljes növény	minden friss szövet	minden friss vagy liofilizált szövet
Alkalmazható markerek száma	kevés	kevés	sok
A markerek polimorfizmus foka	gyenge	gyenge	jó
A tanulmányozott genom zónái	kódoló	Kódoló	kódoló és nem kódoló
Az analízis gyorsasága	a fejlődési fázistól függ	elég gyors	elég gyors
Az eredmények ismételtetősége	változó	jó	többnyire jó

3. táblázat: A DNS-alapú molekuláris markerek összehasonlítása főbb jellemzőik alapján (Agarwal és mts., 2008)

	Gyakoriság	Reprodukálhatóság mértéke	Polimorfizmus mértéke	Lókuszs specificitás	Műszaki feltételek (költség-igény)	Szükséges DNS-mennyiség	Fő alkalmazási területek
RFLP	nagymértékű	nagy	közepes	van	nagy	nagy	fizikai térképezés
RAPD	nagymértékű	kismértékű	közepes	nincs	kicsi	kevés	géntérképezés
SSR	közepes mértékű	közepes	közepes	nincs	közepes	kevés	genetikai változékonyság kutatása
CAPS	kismértékű	nagy	kismértékű	van	nagy	kevés	allél változékonyság kimutatása
SCAR	kismértékű	nagy	közepes	van	közepes	kevés	géntérképezés és fizikai térképezés
AFLP	nagymértékű	nagy	közepes	nincs	közepes	közepes	géntérképezés

2.3 Izoenzim markerek

Annak ellenére, hogy saját kísérleteimben nem használtam izoenzim, RFLP, AFLP markereket, e módszerek ismertetése nélkül nem lehet teljes képet adni a molekuláris markerezésről. Ez különösen igaz a *Prunus* nemzetségben, így a kajszinál is, ahol az előbbieken említett technikák szerves részét képezik akár RAPD vagy SSR markerekkel végzett kutatásoknak. Nem egyszer egymás kiegészítői, főként a nemzetség fizikai és genetikai térképeinek elkészítésekor. Természetesen ezeknél az általam nem használt technikáknál a teljesség igénye nélkül igyekeztem röviden összefoglalni az elmúlt évek legfontosabb eredményeit.

Az izoenzimek az első olyan molekuláris markerek, amelyet széles körben alkalmaznak a gyakorlati növénynemesítésben, valamint az elméleti kutatásokban egyaránt. Érdemes megjegyezni, hogy eddig ez az egyetlen molekuláris markerezési módszer, amelyet a Vetőmag Vizsgálók Nemzetközi Szövetsége (ISTA) hivatalos szabályzata elfogad mint a vetőmagtétel fajtaazonosságát bizonyító módszert.

Definíció szerint az izoenzimek egy faj olyan multiplex molekuláris enzim formái, amelyeknek a genomban több mint egy enzimstruktúrgén felel meg (Markert és Moller, 1959). Ezek több lókuszt jelölhetnek, vagy egy lókuszt több allélfarmáját képviselhetik.

Az izoenzimek genetikai háttere háromféle lehet:

- Hasonló (azonos) működést végző enzimet kódolhat több különböző gén (lókuszt).
- Mutáció eredményeként azonos lókuszt több allélikus formája jöhet létre egy genomban.
- Az egyedfejlődés során egy-egy sejtvonalban szomatikus mutáció eredményeként is keletkeznek fehérjeszerkezeti változások, amelyek egyedi eltérést eredményeznek, és ivaros úton nem adódnak tovább (Hajósné, 1999).

Az izoenzimek, mivel különböző méretűek és töltésűek, elektroforetikus úton keményítő- vagy poliakrilamidgélben elválaszthatók. Az izoenzimeket számos célra alkalmazhatjuk, mint például fajtaazonosság ellenőrzésére, biokémiai géntérképek készítésére, génexpresszió tanulmányozására. Az izoenzimeknek széleskörű felhasználhatóságuk ellenére vannak hiányosságaik: kevés a térképezett izoenzim lókuszt, szűk genetikai bázisú beltenyésztett anyagokban kevés a polimorf lókuszt,

valamint a legfontosabb, hogy nem minden DNS szinten bekövetkező változás detektálható fehérjeszinten is.

A növényi enzimkutatás már a '60-as években elindult. Elsőként Schwartz (1960) közölte a hibridkukorica egyes enzimjeivel kapcsolatos tapasztalatait. A technikát azonban igazából csak a '70-es évek végétől kezdték el intenzívebben alkalmazni, miután felfedezték, hogy az izoenzim-variabilitás nemcsak egyedszinten, hanem a populációkon belül is kimutatható. Fás növényekben először Adams (1983) használt izoenzimeket fenyőfajták nemesítési célú azonosítására. Ugyanebben az évben Torres (1983) az izoenzimeket különböző gyümölcsfajokon a fajták azonosítására és a hibridek eredetének alátámasztására használta.

2.3.1 Izoenzimek a *Prunus* nemzetségben

A csonthéjas gyümölcsű fajokon Arulsekar és mts. (1986) közölték az első izoenzimekkel végzett kutatást. A technika alacsony költsége és viszonylag egyszerű kivitelezhetősége miatt alkalmazása ebben a fajkörben is viszonylag gyorsan elterjedt. Ugyanakkor a kisszámú vizsgálható lókuszt és a korlátozott mértékű allélvariabilitást viszonylag hamar kijelölte a technika korlátait. A nemzetségen belül jelentős eltérés tapasztalható az izoenzim markerek polimorfizmusa tekintetében az öntermékenyülő és az idegentermékenyülő fajok között. Az idegentermékenyülő fajok nagyobb allélváltozatossággal rendelkeznek, így jelentős mértékű polimorfizmust sikerült kimutatni őszibarack és mandula hibridek (Byrne és Littleton, 1988) és mandula esetében (Arulsekar és mts., 1986). Az öntermékenyülő, ebből kifolyólag jelentős mértékben beltenyésztett őszibarack fajtáknál jóval kisebb mértékű polimorfizmust lehetett találni (Durham és mts., 1987). Egy konkrét összehasonlító vizsgálatban Arulsekar és mts. (1986) ezt megfelelően demonstrálták, amikor mandula- és őszibarackfajtákat jellemeztek 12 különböző enzimlokusz segítségével. A mandulánál a tizenkét enzimből kilenc enzim polimorf mintázatot mutatott, az őszibaracknál csupán egy esetben fordult ez elő.

Az izoenzimek megjelenése egy új eszközt adott a genetikusok kezébe az egyes allélok öröklődésmenetének meghatározására. Tulajdonképpen ezek a kutatások a MAS (Marker Assisted Selection) előfutárainak is tekinthetők. A *Prunus* nemzetségben ilyen célú vizsgálatokat először Mowrey és Werner (1990) végeztek, amikor egy őszibarack ×

mandula hibridpopulációban három lókuszos izoenzimjeinek öröklődését figyelték meg. Goffreda és mts. (1991) az előző vizsgálathoz hasonlóan 5 izoenzim lókuszos öröklődését vizsgálták meg interspecifikus hibrideken.

Az izoenzim, mint az egy-egy tulajdonságot meghatározó lókuszos változatának vizsgálata, jelentős módon hozzájárult a *Prunus* fajok genetikai ismereteinek bővítéséhez, illetve ezt követően konkrét nemesítési célokhoz történő felhasználásukhoz. Több vizsgálat is fényt derített arra, hogy rokon *Prunus* fajokon ugyanazt a tulajdonságot egyik esetben egy multi-lókuszos bonyolult enzimrendszer határozza meg, míg a másik fajnál ugyanezért egy egyszerű rendszer felel. Byrne és Littleton (1989a) kajszialmasav-dehidrogenáz (MDH) enzimrendszerét vizsgálta ilyen szempontok szerint.

A hibridkukorica vetőmagelőállításokban ma már rutinszerűen használják az izoenzimeket az F1 vetőmagok tisztaságának ellenőrzésére, a szülői típusok kiszűrésére. Ez ma már elengedhetetlen eszköz, mivel a szántóföldi posztkontroll vizsgálatok eredményének ismeretében az adott vetőmagtétel már elvetésre került, visszahívására nincsen mód. A *Prunus* fajoknál eltérő célból, de hasonló elvek szerint használtak izoenzimeket az interspecifikus hibrid eredetének meghatározására. Két ilyen típusú vizsgálatra is sor került. Elsőként őszibarack és mandula hibrideket, majd japánszilva és kajszialmasav-dehidrogenáz (MDH) enzimrendszerét vizsgálta ilyen szempontok szerint. Byrne és Littleton (1988; Byrne és Littleton, 1989b).

Érdekes kuriózumként még megemlíteni azt a cseresznye hibridpopuláció alapján szerkesztett géntérképet, amely csak izoenzimmarkereket tartalmaz (Bošković és mts., 1997).

2.3.1.1 Izoenzim alkalmazása a kajszialmasav-dehidrogenáz esetében

Az izoenzimrendszerek vizsgálatának eredményeit a kajszialmasav-dehidrogenáz esetében Byrne és Littleton (1989a) tették közzé. Hatvankilenc különböző eredetű – európai, közép-ázsiai és észak-kínai – fajtát és hibridet vizsgáltak. A hét enzimlókusz közül három bizonyult polimorfnak. Néhány fajta egyedi izoenzim-mintázatot mutatott. A kajszialmasav-dehidrogenáz polimorfizmusának mértéke elmaradt a szilvára és mandulára jellemző értékektől, meghaladta viszont az őszibarackra jellemző értéket (Byrne és Littleton, 1989a; Byrne, 1989). Battistini és Sansavini (1991) négy polimorf enzimlókusz elemzésével 50

kajszifajtat 16 egyedi mintázatú csoportba sorolt. Badenes és mts. (1998) tíz enzim izoenzim mintázatát vizsgálva eredet szerint három földrajzi csoportba – észak-amerikai, iráni-kaukázusi és európai – tudtak besorolni 94 fajtát. Manganaris és mts. (1999a) lényegesen nagyobb mértékű polimorfizmusról számoltak be, bár ennek oka abban is keresendő, hogy 17 kajszifajta mellett 56 interspecifikus keresztezésekből származó hibridet is bevontak kísérleteikbe. A 20 enzimlókusz közül 17 bizonyult polimorfnak. Ezeknek a vizsgálatoknak alapvető hiányossága - ami miatt eredményeik nem használhatók az egész fajra jellemző polimorfizmus vagy heterozigótáság jellemzésére - a kutatók rendelkezésére álló viszonylag szűk genetikai hátteret reprezentáló genotípusokban keresendő (Badenes és mts., 1998; Manganaris és mts., 1999b). Sikeresnek ítéhető az izoenzimmintázat elemzésének alkalmazása az interspecifikus hibridek és a szülői genotípusok elkülönítésére. Az előző fejezetben említettekén kívül sikerült még azonosítani pluot és aprium hibrideket (Byrne és Littleton, 1989b; Manganaris és mts., 1999a).

A DNS alapú markeres kutatásokat megelőzően a Genetika és Növénynevelés tanszéken is folytak izoenzim markerekkel végzett kutatások. Janke (1996) különböző izoenzimik változékonyságát vizsgálta hagyományos kajszifajtáknál.

2.4 Az RFLP markerek

Az első DNS-markerek enzimatis hasítás útján létrehozott fragmentumok voltak. A hasítási fragmentumhossz polimorfizmusokat (RFLP) markerként lehet felhasználni genetikai kapcsoltsági térképek szerkesztéshez. Használatukkal a térképezés lényegesen rövidebb idő alatt és könnyebben elvégezhető, mint a morfológiai markerek esetében volt. Annak ellenére, hogy a technika elemei már a hetvenes évek közepén rendelkezésre álltak, molekuláris markerként történő felhasználásáról és a markerek felhasználásával térkép készítéséről csak a '80-as évek elején számoltak be (Botstein és mts., 1980).

A növényi genom 10^8 - 10^{11} bp közötti mérete miatt a 4, illetve 6 bp felismerő enzimek olyan sok fragmentumra hasítanak a DNS-t, hogy éles elválasztásuk nem lenne lehetséges. A restrikciós helyek eloszlásában az egyes genotípusokban meglévő különbségeket, - amelyeket inszerció, delécio, pontmutáció okoz - csak akkor lehet detektálni, ha jelölt próbával hibridizáltatjuk a fragmentumokat. A próba lehet a genomi

DNS egy szakasza, cDNS, vagy szintetikus oligonukleotid. A hibridizáció technikáját Southern (1975) dolgozta ki. Az RFLP-vel detektált változékonyság, elsősorban nem a DNS-t hasító endonukleázoktól, hanem a próba DNS hibridizációs képességétől függ.

2.4.1 RFLP markerek alkalmazása a *Prunus* fajokban

Az RFLP markereket a *Prunus* fajokban elsősorban géntérképezési célokra használták. A technikával elvileg korlátlan számú marker hozható létre, ami rendkívül előnyös tulajdonság a kapcsoltsági térképek kialakításánál. Különösen igaz ez a *Prunus* nemzetségben, ahol viszonylag kicsi a genetikai variabilitás mértéke. A kilencvenes évek elején kezdődtek az első vizsgálatok őszibarackban, ahol Eldredge és mts. (1992) 16 RFLP markert teszteltek két hasadó nemzedékben. A morfológiai és az RFLP markerek között ugyan kapcsoltságot nem találtak, csak két RFLP marker kapcsolatát tudták igazolni. Az igazi áttörést Rajapaske és mts. (1995) vizsgálata hozta, amikor 8 kapcsoltsági csoportban 46 RFLP markert helyezett el az őszibarack genetikai térképén. Elsőként morfológia markerekhez (pl. gyümölcshús szín) kapcsolt RFLP markereket azonosítottak.

A '90-es évek közepétől felgyorsultak az események, és sorra jelentek meg a nemzetségben közölt RFLP térképek: őszibarack × mandula hibridek (Fooland és mts., 1995), mandula (Viruel és mts., 1995) és meggy (Wang és mts., 1998) hasadó nemzedékeinek felhasználásával. Ebben az évtizedben szinte kizárólag RFLP-alapú térképek készültek, amik csak elvéve egészültek ki RAPD markerekkel.

Elvéve találni forrást arra vonatkozóan, hogy a nemzetségben használtak RFLP markereket fajtaazonosítási céllal. Quarta és mts. (1998) RFLP és RAPD markerekkel végzett vizsgálata ad magyarázatot erre. Munkájukban 37 mandula, őszibarack fajta genetikai diverzitását jellemezték. A felhasznált 28 próba közül csak kilenc adott polimorf mintázatot, amely jól demonstrálja, hogy az RFLP markerek korlátozott mértékben használhatók fel fajtaazonosítási célokra. Talán az egyedüli kísérletet, amely eredményesnek tekinthető De Vicente és mts. (1998) végezték, mely során 52 európai és észak-amerikai kajszifajtát hasonlítottak össze RFLP markerekkel. A 33 genomi és cDNS próba közül 18 bizonyult polimorfnak. Az általuk kimutatott polimorfizmus (48 értékelhető sáv) elegendő volt a 45 genotípus azonosítására.

Az RFLP-, RAPD- és AFLP-technikákkal kimutatható genetikai variabilitás fokát először 16 kajszifajtában Hurtado és mts. (2001) hasonlították össze. Noha az összes markertípus alkalmas volt a fajták megkülönböztetésére és a származásuk szerinti csoportosításra, az AFLP szolgáltatta messze a legtöbb polimorf markert. Az egy primerre eső polimorf markerek számával kifejezett hatékonyságot figyelembe véve még a RAPD-módszer is kétszer hatékonyabbnak bizonyult az RFLP-vel való összehasonlításban.

A fentiek alapján elmondható, hogy a *Prunus* nemzetségben a térképezésen kívül az RFLP-markerek használata erősen korlátozott. Mindamelllett, hogy megjelentek már jóval nagyobb polimorfizmust adó technikák, az RFLP idő és költségigényes, valamint az izotóp használata miatt veszélyes is. Nem beszélve arról, hogy alkalmazásához jelentős mennyiségű, jó minőségű DNS szükséges.

Manapság a térképezési céloknál is egyre nagyobb szerep jut az AFLP- és a mikroszatellit markereknek, illetve az RFLP módosított változatának a PCR-RFLP-nek vagy más néven CAPS-nak.

2.5 PCR – polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

A legenda szerint a PCR elve 1983 áprilisában Kary Banks Mullis elméjében született meg. A módszer elvét egy gyakorlati eredmény bemutatásán keresztül 1985-ben közzétették (Saiki és mts., 1985). Ettől az időponttól egy egyszerű elven alapuló, de zseniális technikával bővült a molekuláris biológia eszköztára. A ciklikus, enzimekatalizált, DNS-szintetizáló eljárás lehetőséget teremtett arra, hogy kimutatható szintre növeljék a vizsgálni kívánt DNS-szakaszt, lényegében megszüntetve a DNS-vizsgálatok mennyiségi korlátait. A technikával specifikus szekvenciájú oligonukleotid primerek által közrefogott DNS-szakaszokat lehet enzimatikus módon felszaporítani (Mullis és Faloona, 1987). A PCR reakció a DNS-függő polimerázok aktivitásán alapul. Ezek az enzimek egy indító oligonukleotid, a primer segítségével képesek lemásolni, és így megkettőzni az eredeti DNS-szálat. Ismételt működésük során a templát szakasz hatványozottan felsokszorozódik (Innis és mts., 1990). Akár 10000 bp hosszú DNS-szakasz is amplifikálható ezzel a módszerrel. A PCR módszer széles körű elterjedését egy termostabil DNS-polimeráz (Taq polimeráz) alkalmazása, valamint az automatizált fűtőblokk (PCR készülék, thermocycler) kialakítása tette lehetővé. Korábban a PCR-hez az *E. coliból* származó Klenow enzimet használták. Ekkor azonban a magas hőmérsékleten nemcsak a DNS, hanem az enzim is denaturálódott, ami azt jelentette, hogy a hőérzékeny polimeráz enzimeket minden ciklus után újra a reakció elegybe kellett adagolni. Az amerikai Yellowstone Nemzeti Park forró vizű hőforrásában fedezték fel a *Thermus acqaticus* baktériumot (Brock és Freeze, 1969), amely 94 °C-on él, és a belőle kinyert DNS-polimeráz ezen a hőmérsékleten is megőrzi aktivitását.

A PCR reakció ciklusokból áll, egy cikluson belül pedig három fő lépés követi egymást.

- Kettősszálú DNS denaturálása hőkezeléssel (92-95 °C)
- A target DNS-szakasszal komplementer két oligonukleotid hibridizálása az egyes DNS-szálakhoz. A kapcsolat stabilizálásához a reakciómixet le kell hűteni, és az oligonukleotidokat nagy feleslegben kell alkalmazni. Az ideális hőmérsékletet az alkalmazott primerek hossza és bázisösszetétele határozza meg.
- Új DNS-szálak szintézise dNTP-k és DNS-polimeráz segítségével (72 °C)

Harminc-negyven ciklus alatt a reakcióelegyben lévő, akár pikogrammnyi DNS-ből mikrogrammnyi mennyiséget lehet előállítani. Az PCR reakciót a primer

kapcsolódási és a lánchosszabbítási hőmérséklet változtatásával módosíthatjuk. A ciklusszám növelésével pedig a célszekvenciákhoz közelítő, egyre rövidebb fragmentumokat kapunk túlsúlyban.

2.6 RAPD-polimorfizmus

A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) módszer a genomi DNS egyes szakaszainak felszaporításán alapszik. A technika kidolgozásához szükséges volt a Mullis és Faloona (1987) által kidolgozott PCR eljárásra. A RAPD módszert elsőként Williams és mts. (1990) valamint Welsh és McClelland (1990) publikálták. A vizsgálataik igazolták, hogy a 8-10 nukleotidból álló primerek növények és állatok széles körénél képesek amplifikációs termék létrehozására.

A primerek előállításához nem szükséges semmilyen előzetes információ a templát DNS-ről, szintézisük véletlenszerűen zajlik. A RAPD markerek használata gyorsan elterjedt, mivel gyors, olcsó módszer és az élőlények széles körénél alkalmazható a genetikai információk gyűjtésére. Az amplifikált DNS méretbeli különbségeit a primerek kötőhelyein, vagy a köztük lévő szakaszon bekövetkezett deléciók vagy inszerciók okozzák. Előfordulhat, hogy a primerek kötőhelyein található nukleotid szekvenciák megváltozása okoz polimorfizmust. Ez azonban nem minden esetben igaz, hiszen a primerek kötődéséhez nem szükséges a templát DNS és a primer teljes komplementaritása.

A módszer használható genetikai variabilitás térképezésében (Arnold és mts., 1991; Welsh és mts., 1991), különféle taxonómiai célokra (Echt és mts., 1992), és genomspecifikus markerek földelésére (Quiros és mts., 1991).

A módszer kétségtelen előnye az RFLP-vel szemben, hogy a reakcióhoz nagyon csekély mennyiségű DNS szükséges (Phillips, 1994).

Számtalan pozitív tulajdonsága ellenére a RAPD markerek hátránya az, hogy domináns öröklődésűek. A hasadó utódnemzedékben csak a RAPD markerek jelenléte vagy hiánya mutatható ki, ezáltal a heterozigóta egyedeket nem lehet elkülöníteni a homozigóta egyedektől (Phillips, 1994). A módszer másik negatívuma az, hogy a kapott eredményeket nehéz reprodukálni. A megismételhetőséget főleg a templát DNS minősége és mennyisége befolyásolja. A RAPD mintázatokban lévő, az ismételt reakciók során tapasztalt eltéréseket leginkább a DNS etanollal kicsapható

szennyeződései okozzák. A nagyon kicsi vagy nagyon nagy templát DNS koncentráció szintén megbízhatatlan mintázathoz vezet. Néhány primer-templát kombináció nem ad reprodukálható mintázatot. Ezen a reakció paramétereinek (pl. magnézium koncentráció) megváltoztatásával lehet javítani (Hajós, 1999). A gyorsaságának és hatékonyságának köszönhetően viszont több növénynél felhasználták ezt a technikát a térképezésben. A RAPD-markerek felhasználásával készültek például a lucerna (Kiss és mts., 1993), lóbab (Torres és mts., 1993), alma (Hemmat és mts., 1994), cseresznye (Stockinger és mts., 1996) kapcsoltsági térképek. Hasadó nemzedékek RAPD módszerrel történő elemzése számos esetben sikeres volt, például a rezisztenciagénekhez kapcsolt markerek azonosítása paradicsomnál (Martin és mts., 1991), napraforgónál (Lawson és mts., 1996), búzánál (Hu és mts., 1997), salátánál, (Paran és mts., 1991) valamint babnál (Adam-Blondon és mts., 1994) történt.

2.6.1 RAPD-polimorfizmus kimutatása a *Prunus* nemzetségben

2.6.1.1 Őszibarack

A többi növényfajhoz hasonlóan a PCR alapú markerek közül a RAPD módszert alkalmazták először a csonthéjas gyümölcsfajoknál is. Először a csoportban gazdaságilag legfontosabb növényfajnál, az őszibaracknál kezdődtek meg a vizsgálatok. A legelső vizsgálatokat, melyben RAPD markereket is használtak, Rajapaske és mts. (1996) végezték. Kapcsoltsági térképet készítettek RFLP, RAPD és morfológiai markerekkel. A hasadó F2 nemzedékben összesen 65 markert sikerült azonosítaniuk, 46 RFLP, 12 RAPD, valamint 7 morfológiai lókuszt. Az azonosított markerek nyolc kapcsoltsági csoportban 333 cM távolságot fedtek le az őszibarack genomban. A markerek közti átlagos távolság 8 cM volt.

Az első fajta-összehasonlító vizsgálatokat Warburton és Bliss (1996) végezték, amikor 136 különböző földrajzi területről származó őszibarack fajtát hasonlítottak össze RAPD-dal. Sikerült 12 jól elkülönülő csoportba sorolniuk a fajtákat. A csoportok közül kilenc az ázsiai fajtákat tartalmazza, míg az európai és amerikai fajták három csoportot alkottak, és kisebb változatosságot mutattak. Lu és mts. (1996) tizennyolc őszibarack-alanyfajta között tudtak különbséget tenni a RAPD technikával, és olyan genetikai hasonlóságot kaptak, amely megfelel az eredetüknek. A dendrogramon található első elágazódás alapján a fajtákat gyökérfonálféreggel szembeni ellenállóságuk, illetve

fogékonyságuk szerint lehetett csoportosítani. Hashmi és mts. (1997) által végzett vizsgálat bizonyította a RAPD markerek alkalmasságát az őszibarack szomaklonális variánsok kimutatásában. Emellett igazolta, hogy valóban léteznek genetikai különbségek a variánsok között. Casas és mts. (1999) negyvenegy *Prunus* alanyt, különböző fajokat és interspecifikus hibrideket vizsgáltak RAPD-dal, és a kísérletekből nyert eredmények alapján három olyan nagy csoportba sorolták őket, amelyek egybe estek a már korábban morfológiai markerekkel meghatározott besorolással. A vizsgálatok megerősítették további néhány interspecifikus anyagnak az állítólagos eredetét, valamint rávilágítottak egy miobalán klón hibás rendszertani besorolására.

6.1.1.2 Mandula

Először mandulánál, (*Prunus dulcis* L.) kaliforniai fajtákon történtek RAPD markeres vizsgálatok. Bartolozzi és mts. (1998) tizenhét mandulafajta genetikai rokonságát és lehetséges eredetét vizsgálták 20 RAPD primer alkalmazásával. A rügmütánsoktól eltekintve minden egyes fajtát el tudták különíteni egymástól. A fajtákat három csoportba sorolták származásuk alapján. Resta és mts. (1998) 17 mandulafajtát hasonlítottak össze RAPD markerekkel. A felhasznált 60 primer 241 polimorf fragmentumot eredményezett. A markerekkel sikerült elkülöníteni a fajtákat, illetve a fajták közötti kapcsolatot a klaszter analízissel becsülték. Két fajta-pár között nagy hasonlóságot találtak, amely megfelelt az előzetes megfigyeléseknek.

6.1.1.3 Szilva

Ortiz és mts. (1997) a RAPD markerek rendkívül nagymértékű polimorfizmusának köszönhetően különbséget tudtak tenni eltérő földrajzi helyekről származó huszonnyolc hexaploid és három diploid szilvafajta között, mindössze három primer használatával. Az amplifikált fragmentumok tisztán elváltak a diploid és hexaploid genotípusoknál, és jól korreláltak az ismert szülőikkel. Shimada és mts. (1999) negyvenkét különböző ploidszintű szilvafajta között tudtak különbséget tenni 20 RAPD primer alkalmazásával. A vizsgálat eredményeként két főcsoportba (európai és japán) sorolták a fajtákat. A két csoport azonban nem vált el élesen egymástól, hanem vélhetően a kereszteződéseknek köszönhetően átfedéseket lehetett tapasztalni. Boonprakob és mts. (2001) a termesztett diploid szilvákat és őseiket elemezték RAPD

markerekkel. A délkeleti fajtakör jóval nagyobb változékonyságot mutatott a Floridában, Kaliforniában és Dél-Afrikában termesztett fajtáknál.

Nem fajtaazonosítási célokra, hanem gyökérfonálféreggel szembeni rezisztencia kimutatására használtak RAPD markereket myrobalan szilván Lecouls és mts. (1999).

6.1.1.4 Cseresznye

RAPD markereket az őszibarackhoz hasonlóan a cseresznyénél is genetikai kapcsoltsági térkép készítése során használtak fel. Stockinger és mts. (1996) 88 RAPD markerekkel 10 kapcsoltsági csoportot alakítottak ki, lefedve 503 cM távolságot a cseresznyegenomban. Gerlach és Stösser (1997) tizennyolc fajtát jellemzett molekulárisan RAPD markerekkel. A vizsgált fajták közül tizenhatot el tudtak különíteni 23 RAPD primerrel, de mint ahogyan az várható volt, a rügymutánsok között nem találtak különbséget.

Elemelve a RAPD markerek felhasználásával járó kutatásokat, megállapítható, hogy az eljárás kifejlesztését követő 10 év során számos publikáció látott napvilágot, és a technikát széleskörűen alkalmazták genetikai azonosításra a mezőgazdaságilag legfontosabb *Prunus* fajokon. Noha a RAPD markerekkel végzett kutatások a 2000. évet követően látványosan visszaestek, napjainkban is fel-felbukkan a technika egy-egy vizsgálat erejéig. A korábbi évek tapasztalataira építve és a módszer korlátait megismerve, ma leginkább kis egyedszámú fajtacsoportok, valamint egyes kapcsolt tulajdonságok jellemzésére használják elsősorban. Ezekben az esetekben, mint az alábbi példák is mutatják, a RAPD markerek olcsó, gyors és a célnak megfelelő megoldást jelentenek. A kapcsoltsági térképek készítésére, illetve nagyméretű populációk egyedeinek összehasonlítására ma már inkább jóval megbízhatóbb markereket (SSR, AFLP) alkalmaznak.

Raddova és mts. (2003) a cseh nemzeti fajtagyűjteményből 28 őszibarack- és két mandulafajtát vizsgáltak. A 46 vizsgált primer közül 34 produkált polimorf mintázatot, melyek alkalmasak voltak a vizsgált genotípusok egyedi azonosítására. 12 primert használtak fel dendrogram készítéséhez. Az elvégzett klaszteranalízis élesen elkülönítette a két mandulafajtát. A három további jól elváló csoportot a mandula × őszibarack, a *P. persica* × *P. davidiana* hibridek, valamint *P. persica* fajták alkották. A felosztás megfelelt a rendszertani egységeknek és a fajták származásával kapcsolatos

elérhető információknak, valamint a fajtaleírásoknak. Lisek és mts. (2006) a 19 legnépszerűbb lengyel cseresznyefajtát hasonlították össze RAPD markerekkel. A vizsgált 55 primer közül 26 bizonyult polimorfnek. Mindösszesen 6 primer elegendő volt a 19 fajta megkülönböztetésére az amplifikált tizenhét polimorf fragmentum alapján. A vizsgálat bizonyította, hogy kis fajtaszám és megfelelően polimorf RAPD markerek alkalmasak fajták egyértelmű azonosítására.

Jun és mts. (2002a) RAPD markereket alkalmaztak az őszibarack fajták gyümölcshús magvaválóságának jellemzésére. A magvaválóságot egyetlen gén okozza. A magvaváló tulajdonság domináns a duránci típusal szemben. Hasadó nemzedék RAPD markeres analízisével a gén közelében 1.1 és 2.2 cM távolságra elhelyezkedő két RAPD markert találtak. A kapcsolt domináns szekvenciákból SCAR markereket terveztek, amelyek alkalmasak voltak a hasadó nemzedék, valamint a kereskedelmi fajták magvaválóságának azonosítására. Ez egyben kiváló eszköz a nemesítők számára a korai szelekcióhoz.

2.6.1.5 RAPD-polimorfizmus vizsgálata kajszibaracknál

Az izoenzim vizsgálatokhoz hasonlóan kajszinál is elsőként Gogorcena és Parfitt (1994) alkalmazták ezt a technikát. Az első vizsgálat tulajdonképpen még csak arra szorítkozott, hogy a technika mennyiben alkalmas polimorf fragmentumok létrehozására kajsziban. Az eredmények reprodukálhatósága érdekében tökéletesíteni kellett a reakciókörülményeket, így meg kellett találni a megfelelő DNS-kivonási eljárást, az ideális DNS koncentrációt, amely az egyik kulcskérdésnek bizonyult. A kipróbált 15 primer közül 7 konzisztens és polimorf mintázatot eredményezett, így alkalmasnak bizonyult a kajszigenom jellemzésére. A szerzők azonban óvatosságra intettek a RAPD markerek megbízhatóságát illetően, hiszen az eredményeket számos faktor befolyásolhatja. A módszert megalapozó vizsgálatokat követően még ugyanebben az évben Shimada és mts. (1994) 54 japánkajszifajta (*P. mume* Sieb. Et Zucc) genetikai rokonságát vizsgálták 95 RAPD primerrel. A kapott eredmények alapján a fajtákat hét jól elkülönült csoportba lehetett sorolni, amelyek megfeleltek az eredetüknek. A vizsgálatok emellett megerősítették néhány fajta előzetesen feltételezett származási viszonyait. Ozaki és mts. (1995) ugyancsak japánkajszifajtáknál alkalmaztak RAPD markereket a származási viszonyok tisztázására és a szülők

azonosítására. A polimorf DNS-fragmentumok egyértelműen azonosították a szülőket, illetve majdnem az összes hasadást mutatott az F2 utódnemzedékben. Southern blot vizsgálattal sikerült igazolni, hogy a szülőspecifikus fragmentumok átörökítődtek az utódnemzedékbe, ezáltal a morfológiailag azonos utódok elkülöníthetők voltak egymástól. Később Takeda és mts. (1998) harminchárom kajszii és két rokon faj (*P. sibirica* L., *P. brigantina* Vill.) kapcsolatát vizsgálták. Első körben 225 primert tesztelt le öt fajtan, melyből mindösszesen 18 adott kellően polimorf mintázatot. A kiválasztott primerekkel két fő csoportba sikerült sorolni a fajtákat: egy kínai eredetű (Kelet-Kína és Japán) valamint egy nyugati eredetű (Európa, Közép-Ázsia és Nyugat Kína) fajtakörre. Zhebentyayeva és Sivolap (2000) az addig megjelent egyik legátfogóbb vizsgálatot tették közzé. Kísérletükben RAPD és izoenzim polimorfizmust vizsgáltak a kajszii genetikai diverzitásának felmérése céljából. A nyolcvannégy jellemzett fajta az európai, iráni-kaukázusi, kínai, közép-ázsiai fajtakörből került ki, valamint néhány hibrid, illetve vad típust is bevontak. A különböző eredetű, és ezen belül a géncentrumokból származó fajták vizsgálatával megállapították, hogy a termesztett kajszii a vad *P. armenicaból* alakult ki. Ugyanakkor a kajsziihoz közel álló, elsődlegesen a kínai centrumban található fajok is szerepet játszhattak a faj házasításában. Azt is megállapították, hogy az európai fajták genetikai diverzitása kicsi.

Az ezredforduló elejétől a kajszinál a többi *Prunus* fajhoz hasonlóan a RAPD markereket egyre inkább felváltották a mikroszatellit markerek, illetve párhuzamos vizsgálatokkal tették az eredményeket megbízhatóbbá. A RAPD markerek sem tűntek el teljesen, továbbra is használták kis egyedszámú csoportok azonosítására, illetve egyéb speciális célokra.

Hormaza (2001) ötven különböző eredetű kajszifajtát elemzett RAPD és SSR markerekkel. A vizsgálatot kiegészítette olyan spanyol fajták tesztelésével, amelyek pomológiai jellemzők alapján nagyon közel álltak egymáshoz. A két markerezési technika kombinációja lehetővé tette a valóban különböző genotípusok azonosítását és a szinonim fajták kiemelését. Hurtado és mts. (2001) tizennyolc, Spanyolországban termesztett kajszifajtát jellemeztek RAPD markerekkel. Negyven dekamer primert próbáltak ki, melyből huszonkettő 45 könnyen reprodukálható, markerként használható fragmentumot eredményezett. A 18 fajta mindegyike megkülönböztethető volt ezzel a néhány primerrel. UPGMA klaszter analízissel a fajtákat 5 csoportra lehetett osztani.

Megállapították, hogy a RAPD markerek eszközei lehetnek a genetikai diverzitás jellemzésének, a genotípusok közti hasonlóság kimutatásának, új genotípusok azonosításának, ezáltal értékesek a kajszi nemesítésében. A módszer mellett alkalmas kereskedelmi tételek azonosítására rutinszerű, olcsó és gyors eljárással. Jun és mts. (2002b) RAPD markereket használt 31 különféle *Prunus* taxon genetikai kapcsolatának elemzésére. A kipróbált több mint háromszáz primer közül 30 eredményezett fajspecifikus markereket a *Prunus* fajok többségénél. Érdekes, hogy *P. salicina* fajnál és az interspecifikus Plumcot hibridnél nem találtak specifikus RAPD markereket. A 31 *Prunus* taxont három nagy csoportra lehetett osztani a markerekkel, amely összhangban van az érvényben lévő osztályozási rendszerrel. Mariniello és mts. (2002) RAPD markerekkel azonosított 19 olasz, görög és észak-amerikai fajtát. Meghatározta az amplifikált régiók pontos szekvenciáját, és ennek alapján SCAR markereket tervezett. Pedryc és mts. (2002) Magyarországon termesztett tizennégy fő fajtát, valamint további három világfajtát jellemzett RAPD markerekkel. A kipróbált hatvan primer közül 45 esetben sikerült jól detektálható fragmentumokat elérni. A kapott fragmentumok többsége uniformnak bizonyult, azonban nyolc polimorf mintázatot mutatott. Az eltérő fragmentumokat felhasználva sikerült két fajtapár kivételével az összes fajtáról egyedi DNS ujjlenyomatot készíteni. Mivel az egyik esetben két klónról, míg a másik esetben gyaníthatóan ugyanarról a fajtáról volt szó, a vizsgálat tulajdonképpen megerősítette azt az előzetes feltételezést, hogy a két fajtapár genetikai háttere azonos. A vizsgálatot azonos növényanyagon a későbbiekben mikroszatellit markerek használatával Ruthner és mts. (2003) megerősítették. Baránek és mts. (2006) 15 genotípust vizsgált a *Prunus* nemzetségből RAPD és SSR markerekkel. Összehasonlították a mikroszatellit és RAPD markerek által produkált polimorfizmust, és kapcsolatukat a klasszikus morfológiai alapokon nyugvó fajtaleírással. Érdekes módon a RAPD által elért eredmény jobban igazolta az elméleti várakozásokat, amely irányadó lehet a későbbi vizsgálatokhoz.

2.7 Az AFLP markerek

A genomi DNS restrikciós emésztésén és a fragmentumok szelektív PCR amplifikációján alapuló módszer (Vos és mts., 1995). Az AFLP eljárás az RFLP-hez hasonlóan első lépésben restrikciós endonukleázokkal – egy ritka és egy gyakori felismerési szekvenciával rendelkező enzimmel – emészt a DNS-mintát. Következő lépésként történik a duplaszálú DNS-adapterek ligálása a fragmentumok végére, és ezt követi az adapterekre és a hasítóhelyre tervezett primerek közötti DNS-szakasz amplifikálása, majd gélen való megjelenítése. Az AFLP mintázatot a restrikciós fragmentumok hosszában megnyilvánuló különbség eredményezi, amelyet inszerció, delécio, pontmutáció okozhat, amelyek restrikciós helyeket hoznak létre vagy szüntetnek meg. Az AFLP módszer kulcsa a szelektív amplifikációban alkalmazott primerek kombinációja.

Az AFLP számos előnnyel rendelkezi a RAPD technikához képest, mivel nagy a teljesítőképessége, sok fragmentumot eredményez, a primerek kapcsolódásának nagyfokú specifikussága pedig biztosítja a reprodukálhatóságot. Bármely szervezetre, fajra alkalmazható előzetes térképezés, illetve markerfejlesztés nélkül is.

2.7.1 AFLP markerek alkalmazása a *Prunus* fajoknál

Amíg az RFLP módszert elsősorban a térképezési célokra használták a génuszban, addig az AFLP-t elsődlegesen a fajtaazonosítás, a genetikai távolságok és a származási kérdések tisztázása érdekében alkalmazták. Az AFLP fajtaazonosítási célokra történő alkalmasságát elsőként Dirlewanger és mts. (1998) bizonyították. Megerősítették azt a feltételezést, hogy az őszibarack polimorfizmusának kutatásánál az AFLP technika jóval hatékonyabb, mint akár a RAPD vagy az RFLP. Az AFLP a nemzetségen belül az öntermékenyülő őszibarackban jutott jelentősebb szerephez, hiszen ez a szaporodási mód nagymértékben csökkentette a termesztett fajtákban a genetikai változékonyságot. Munkájukban hatvanhat fajtát jellemeztek RAPD és AFLP markekkel. Kiemelték, hogy ugyan a két módszer együttes alkalmazása kiegészíti egymást, mégis az AFLP összességében hatékonyabbnak bizonyult.

Aranzana és mts. (2001a) az időközben elérhetővé vált mikroszatellit markereket hasonlították össze az AFLP-vel, amikor 100 őszibarack fajtát hasonlítottak össze. A felhasznált 40 AFLP marker 97 genotípust azonosított, míg a 7 SSR marker „csak” 78

fajtát tudott megkülönböztetni egymástól. A két módszer kombinációja azonban már 99%-os eredményt hozott.

A módszer alkalmasságát megalapozó vizsgálatokat követően „futószalagon” érkeztek a nemzetségen belüli fajtaazonosítást és származási viszonyokat célzó vizsgálatok.

Őszibarackban Shimada és mts. (1999) különítették el 8 nagyon hasonló származású fajtát AFLP-vel. Ezt követően Aranzana és mts. (2003a) 210 fajtát 9 AFLP primer kombinációt felhasználva elemeztek. A fajták 93%-át sikerült elkülöníteni a módszerrel. A nagyfokú polimorfizmust talán még jobban jellemzi, hogy 187 fajtát már mindössze három primer segítségével el lehetett különíteni egymástól.

Cseresznyében először Boritzki és mts. (2000) 10 AFLP primerpár használatával 128 cseresznyefajta azonosítását végezték el. Összesen 712 AFLP fragmentumot nyertek, amelyek közül 124 bizonyult polimorfnak. Majd Tavaud és mts. (2001) a francia termesztett cseresznyefajták és a vad *P. avium* L. genotípusok variabilitását vizsgálta. A 4 primer felhasználásával nyert 76 marker klaszteranalízise a termesztett fajtákat 3 csoportba sorolta. A vad genotípusok külcsoportot alkottak. A dendrogram elemzése alapján a szerzők feltételezték, hogy a francia vadcserecsznye legalább két eltérő származási ágon alakult ki. Ugyanezt meg lehetett állapítani a termesztett fajtákról is. Hasonló fajtaazonosítási célú vizsgálatokat végeztek cseresznyében még Struss és mts. (2001), valamint Zhou és mts. (2002). A cseresznyénél és meggyénél kulcskérdés a ploidfok, valamint a különböző interspecifikus hibridek genetikai származásának ellenőrzése. Tavaud és mts. (2004) AFLP-markerekkel elemezték a *P. avium* L. (AA $2n=2x=16$) és *P. cerasus* L. (AAFF $2n=4x=32$) fajokat. A *P. cerasus* F genomja a *P. fruticosa*-ból származik. Nagy valószínűséggel sikerült azonosítani azt az AFLP markert, amely alkalmas az A és F genom azonosítására és nyomon követésére az egyéb interspecifikus hibridekben is.

Goulao és mts. (2001) AFLP markereket használtak a diploid, és a hexaploid szilvák elkülönítése céljából. Bianchi Valmor és mts. (2002) az AFLP mellett SSR-markereket használták a dél-brazíliai szilvák jellemzésére. A szerkesztett dendrogramon a hexaploid szilvák élesen elkülönültek a diploidoktól.

Martins és mts. (2001) harmincöt portugál mandulafajtát vizsgált meg nemesítési programjának előkészítése során. Yon és RongCai (2004) 5 rokonfajba tartozó 49

egzotikus és helyi mandulafajtát jellemzett 3 AFLP primerrel. A mandulafajták egy csoportba kerültek a klaszteranalízis során, bár nagy polimorfizmust mutattak. Az AFLP-vel végzett mandulamarkerezési tanulmányok közül kiemelkedik Sorkheh és mts. (2007) munkája. Ebben mintegy 45 iráni, európai és amerikai fajtát vizsgáltak 19 primerkombinációval. Sikeres volt a vizsgált genotípusok egyedi azonosítása. A közölt eredményekből jól látható, hogy a markerekkel kimutatott polimorfizmus tökéletesen alkalmas volt a fajták földrajzi eredetének bizonyítására, de csak kis korrelációt mutatott az agronómiai tulajdonságok alapján szerkesztett csoportokkal.

A kajszinál elsőként Hurtado és mts. (2002a) 16 fajtát vizsgáltak 6 primerpárral. Eredményként 231 polimorf markert sikerült azonosítani, amelyek minden egyes fajtának egyedi mintázatot biztosítottak. Hasonló céllal Hagen és mts. (2002) 47 különböző eredetű fajta AFLP polimorfizmusát vizsgálták 5 primerkombinációval. A kísérletbe vont eltérő származású genotípusok kellően széles spektrumot biztosítottak a módszer tesztelésére, és az általánosítható következtetések levonására. Összesen 379 polimorf marker elemzésével megállapították, hogy a fajták eredetének függvényében a kajszi genetikai diverzitása folyamatosan csökken Közép-Ázsia és Dél-Európa között. Az eredmények közvetlenül felhasználhatók a nemesítési alapanyagok kiválogatásakor. Az AFLP használata egyre népszerűbbé vált a kajszinál is, és újabb fajtaköröket vontak be a kutatásokba. Panaud és mts. (2002) a Szahara oázisaiban termesztett 19 fajtát jellemzett AFLP markerekkel. Ebben a kísérletben 7 primer 97 polimorf markert eredményezett. Ez a variabilitás elegendő volt az összes fajta egyedi azonosítására. Az AFLP ilyen célú felhasználásra való alkalmasságát Ricciardi és mts. (2002) is megerősítették a dél-olasz apuliai genotípusok azonosításával.

A kutatási célú fajtaazonosítás és a származási viszonyok meghatározása mellett a szakirodalomban találni forrást az AFLP markerek egyéb célú felhasználására a *Prunus* nemzetségben. Az AFLP MAS-ban való felhasználhatóságára példa Wu és mts. (2004) vizsgálata, amelynek során sikerült megtalálniuk azt az AFLP markert, amellyel az őszibarackban szelektálni lehet a nagy és kis savtartalmú genotípusokat. Az első őszibarackalanyokat elemző genetikai térkép is AFLP markerek felhasználásával készült el (Lu és mts., 1998). A térképen olyan markerek is szerepelnek, amelyekkel a nematóda rezisztencia nyomonkövetése válik lehetővé. Térképezési célokra használták az AFLP technikát Dirlewanger és mts. (1998) is, amikor izoenzim, RFLP, RAPD és

SSR markerek mellett 115 AFLP markert helyeztek el az őszibarack kapcsoltsági térképén. A vizsgálat eredményeként 11 kapcsoltsági csoportban 714 cM távolságot fedtek le, és markerenként 4,5 cM átlagos távolság adódott.

Gyakorlatorientált fajtaazonosítási célokra dolgoztak ki technikát Struss és mts. (2003). A módszer annyiban tér el a korábban megismertektől, hogy olyan DNS-kivonási eljárást sikerült kidolgozniuk, amely által a gyümölcshúsból is képesek voltak az AFLP-hez megfelelő DNS-t izolálni. Így lehetővé vált a frisspiaci meggytélékek fajtaazonosítási célú vizsgálata. Ez mindenféleképpen jelentős eredmény, hiszen a jó minőségű DNS alapfeltétele az AFLP vizsgálatoknak. Ennek érdekében dolgoztak ki külön AFLP célú DNS-kivonási eljárást őszibarackban Manubens és mts. (1999). A DNS-minta jelentőségét Aranzana és mts. (2001b) is kiemelték. Levélből és gyümölcsből nyert DNS-t alkalmazva nekik nem minden esetben sikerült azonos AFLP mintázatot nyerniük.

Ahogy a fenti összefoglaló is mutatja, az AFLP markereket előszeretettel használták a *Prunus* nemzetségben, elsősorban fajtaazonosítási célból, valamint származás és diverzitás kutatására. Ennek ellenére visszaszorulóban van a használata, amelyet részben a módszer relatív bonyolultsága és költségessége indokol. Az AFLP markerek a korábbinál ritkább használatának másik indoka a könnyebben kezelhető mikroszatellitek megjelenése volt (Wünsch és Hormaza, 2002a).

2.8 Mikroszatellit markerek

2.8.1 A mikroszatellit markerek jellemzői, funkciója és evolúciója

A mikroszatellitek (Litt és Luty, 1989) abba a repetitív szekvencia családba tartoznak, amelyben igen egyszerű di-, tri- tetra-, vagy pentanukleotidok egymást követve ismétlődnek egy szakaszon. A mikroszatellitoknak többféle szinonim megnevezését is ismerjük, amelyek a következők: VNDR (Variable Number of Dinucleotide Repeats - változó számú dinukleotid ismétlődések, Nakamura és mts., 1987), STR (Short Tandem Repeat - rövid tandem ismétlődés, Edwards és mts., 1991), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism – egyszerű szekvencia hosszpolimorfizmus), ETR (Exact Tandem Repeats – precíz egymást követő ismétlődések) vagy SSR (Simple Sequence Repeat - egyszerű szekvencia ismétlődés, Jacob és mts., 1991).

A szatellit szekvencia kifejezést már jóval korábban alkalmazták annál, mint hogy tudták volna a jelenség DNS-szintű háttérét. Az eukarióta DNS ultracentrifugában kialakított sűrűség gradiens hatására a vizsgált DNS átlagát reprezentáló széles csúcs mellett, számos kisebb csúcs jelent meg. Az eltérő sűrűséget jelző szokatlan kis csúcsokat szatellit csúcsoknak, a kialakulásukat eredményező DNS-régiókat pedig szatellit DNS-nek nevezték el. A renaturáció kinetikai elemzése vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy a szatellit DNS akár több millió repetitív szekvenciát tartalmazhat.

A repetitív szekvenciák kutatásában igazi áttörést Tautz és Renz (1984) kísérlet-sorozata jelentett. Az eredményeik azt bizonyították, hogy az ismétlődő szekvenciák általánosan fordulnak elő az eukarióta szervezetekben, és tulajdonképpen mindenféle dinukleotid ismétlődése lehetséges. A szerzők ekkor már feltételezték, hogy az ismétlődéseket a replikáció során bekövetkező csúszás (slippage) okozza. A későbbiekben még további kísérletek és feltételezések láttak napvilágot az ismétlődések okát illetően. Levinson és Gutman (1987), valamint Schlötterer és mts. (1991) szerint a replikáció során kialakuló **frameshift** mutáció okozza az ismétlődéseket. Megállapították, hogy a *frameshift* mutációk nagy gyakorisággal fordulnak elő az ismétlődő szekvenciákat tartalmazó régiókban, azonban a rögzült mutációk gyakorisága a javítás hatékonyságán múlik. Az ismétlődő szekvenciákról sokáig azt gondolták, hogy a génműködésben nem játszanak különösebb szerepet. Néhány növényfaj teljes genomjának megismerése rávilágított arra, hogy a mikroszatellit szekvenciák eloszlása nem egyenletes a genomon belül (La Rota és mts., 2005). A mikroszatellitek leginkább a gének határoló régióiban, illetve géneken belül helyezkednek el (Fujimori és mts., 2003). Egyre több a bizonyíték arra, hogy a korábban funkcionálisan semlegesnek gondolt DNS-szakaszok szerepet játszanak a gének működésének szabályozásában (Li és mts., 2004).

A mostanában, *Arabidopsis* és rizsen végzett kutatások azt a meglepő eredményt hozták, hogy a vizsgált mikroszatellit szekvenciák 80%-a kapcsolatban van a génekkel. A szekvenciák jelenléte és a génexpresszió együttes vizsgálata alapján feltételezhető, hogy a mikroszatellitek a növényi gének százainak működését befolyásolják (Sharapova, 2008). A génregulációs szerepet a korábbi vizsgálatok elsősorban azzal magyarázzák, hogy a mikroszatellitek részt vesznek a DNS másodlagos szerkezetének kialakításában, amely hatással van a kapcsolatban lévő gének

transzkripciójának intenzitására (Tóth és mts., 2000). Ez a felfedezés lehetőséget biztosíthat arra is, hogy a mikroszatelliteket a jövőben ne csak a szelekciót segítő eszközként, hanem közvetlenül is felhasználják a nemesítési programokban a genetikai szabályzás befolyásolásával.

Az előzőekben tárgyalt mechanizmusok, mint például a *frameshift* mutációk már csak a meglévő variabilitást növelik. Ennek tükrében jogosan merül fel a kérdés, hogy milyen módon keletkeztek ezek az ismétlődések. Jelenleg az az általános vélekedés, hogy egy véletlenszerű proto-mikrosatellite-re van szükség a mikrosatellit régiók kialakulásához (Levinson és Gutman, 1987). Sokáig ismeretlen volt, hogy létezik-e olyan minimális ismétlődésszám, amelynél már a DNS-polimeráz megcsúszására nagy valószínűséggel sor kerül. Először Pupko és Graur (1999) élesztőnél bizonyították, hogy már két ismétlődésből álló repetitív szekvencia is kiválthatja a DNS-polimeráz megcsúszását.

A mikrosatellitek kialakulása mellett másik érdekes kérdés, hogy milyen módon alakul ki ezen régiók hossza, azaz létezik-e olyan optimális mérettartomány, ami az evolúció során képes volt fennmaradni. A szabálytalan replikáció növelheti, illetve csökkentheti is az ismétlődések számát. Azt, hogy mikor melyik mechanizmus alakítja a mikrosatellit régiók hosszát, először élesztőn sikerült meghatározni. A kísérletek kimutatták, hogy a rövid és hosszú szekvenciák mutációinak eredménye más-más tendenciát mutat. Míg a rövidebb szekvenciák frameshift mutációi általában hosszabb szekvenciákat hoznak létre, a hosszabb szekvenciák rövidültek a DNS-slippage következtében (Wierdl és mts., 1997). A folyamat önmagát szabályozza, mindenféle külső szelekciós nyomás befolyásoló hatása nélkül.

2.8.2 A mikrosatellit markerek alkalmazhatósága a növényekben

A mikrosatellitek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, melyek alapján alkalmasak a növényi genom markerezésére, valamint kapcsolt tulajdonságok térképezésére. Többnyire rendkívül nagy allélváltozékonyságot mutatnak a populáción belül, emellett a mikrosatellitek kodominánsak, és a lókuszek heterozigótási indexe nagyon magas. Öröklődésük egyszerű mendeli szabályok szerint történik, így egyszerűen használhatók kapcsoltági csoportok elemzésére (Gupta és mts., 1996). Rendkívüli variabilitását több szerző is bizonyította, ezért a növényi genomok

jellemzésére az egyik legalkalmasabb módszernek tekinthetők. Az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy a növényekben és az állatokban található mikroszatellit nukleotid-összetétele különböző. „Míg az emlős genomra az (AC)_n vagy a (AG)_n, (CG)_n, addig a növényekre a (TA)_n, (AG/TC)_n, (AC,TG)_n motívumok a legjellemzőbbek. A (CG)_n előfordulása még kérdéses” (Kiss, 2005). A növényi mikroszatellit markerek egyik alapvető tulajdonsága, hogy az ismétlődő egységek száma tekintetében is rendkívül polimorfak úgy a fajok, mint az egyedek között egyaránt (Akkaya és mts., 1992; Saghai-Marroof és mts., 1994).

Az ismétlődő motívumsor szempontjából: perfekt, imperfekt és összetett (*compound repeat*) szekvenciákat különböztetünk meg (Weber, 1990). A perfekt mikroszatellit szabályosan ismétlődő egységekből épülnek fel. Az imperfekt mikroszatellit esetén egy vagy több nukleotid ékelődik a perfekt sorba. Az összetett szekvenciájú mikrosatelliteknél különböző típusú ismétlődő szekvenciákból épül fel a mikroszatellit régió. A perfekt szekvenciáknál Weber (1990) megfigyelte, hogy az ismétlődő egységek számának növekedésével nő a lókusztartalom információ tartalma, és több allél keletkezése várható. Ez a megállapítás azonban nem volt igaz az imperfekt szekvenciákra. Az azonos ismétlődésű imperfekt szekvencia információ tartalma lényegesen kisebb, mint a perfekt szekvenciáé.

2.9 Mikroszatellit markerek használata a *Prunus* nemzetségben

2.9.1 Mikroszatellit régiók azonosítása és primerfejlesztés

A *Prunus* nemzetségben a mikroszatellit markeres kutatásokat Cipriani és mts. (1999) korszakalkotó munkája tette lehetővé. A munkacsoport 17 primer szekvenciáját közölte, melyet a ‘Red Haven’ őszibarackfajta genomi könyvtárából klónozott és szekvenált. Tíz mikroszatellit medeli öröklődést is mutatott a hasadó visszakeresztett nemzedékben. 15 primer polimorf volt a megvizsgált 10 őszibarack genotípusnál, lókuszonként 2-4 allélt találtak. A mikroszatellit régiók határoló szekvenciájának konzervativizmusát kihasználva a kifejlesztett primereket más *Prunus* fajokon és almán is tesztelték. A primerek több mint a fele alkalmas volt az amplifikációra. Tíz primer hatékonyan működött *P. domestica* L., *P. salicina* Lindl., *P. armeniaca* L., *P. dulcis* L., *P. persica* var. *leavis*, *P. avium* L. és *P. cerasus* L. fajokban. Három primer alkalmasnak bizonyult a *Malus x domestica* Borkh. SSR-markerek amplifikációjára is.

Cipriani és munkatársainak publikációját követően számos új eredmény született a mikroszatellitek kutatásában a *Prunus* nemzetségen belül. Már a következő évben ugyanaz a kutatóműhely újabb, 26 őszibarackból kifejlesztett primert mutatott be (Testolin és mts., 2000). Ebben a közleményben már nemcsak a primerfejlesztésre koncentráltak, hanem az új lókuszek segítségével 50 őszibarack és nektarinfajtát teszteltek. Az újonnan kifejlesztett primerek mindegyike polimorf mintázatot (2-8 allél/lókuszt) eredményezett. Sikerült elkülöníteni a fajták döntő többségét, kivéve néhány, genetikailag nagyon közel álló fajtát, mint például a 'Compact Redhaven' és 'Redhaven', ahol azonosságot tapasztaltak. Emellett sor került néhány tisztázatlan eredetű fajtánál a fajta származásának pontosítására, illetve több esetben sikerült megerősíteni a feltételezett szülői vonalakat.

Az egymástól független, párhuzamos kutatások tényét bizonyítja, hogy ugyanabban az évben egy amerikai kutatócsoport, Sosinski és mts. (2000) közzé tette az őszibarack genomi és cDNS szekvenciái alapján kifejlesztett 10 primerből álló sorozatot. Az előző példaktól eltérően nem az AC/GT és AG/CT ismétlődésű mikrosatellit régiókat azonosították, hanem a CT/GA, CA/GT valamint egy AGG/TCC poli-trinukleotidot. Ebben a kísérletben is elvégezték a fajon belüli polimorfizmus vizsgálatot 28 őszibarack fajta bevonásával, amely lókuszonként 4 allélt eredményezett. A primerek fajok közti amplifikációs képességét is tesztelték. A primerek működtek kajsziban, meggyben, rózsában, sőt *Arabidopsisban* is.

Yamamoto és mts. (2002) tovább növelték az elérhető primerek körét, amikor újabb 36 mikrosatellit markert azonosítottak őszibarack genomi és gyümölcs cDNS könyvtár használatával. A nagy primerfejlesztés időszaka Dirlwanger és mts. (2002) által nyilvánosságra hozott 41 SSR primer szekvenciával zárult. A primereket 12 rokon és nem rokon (pl. dió és mogyoró) fajokon is sikerrel tesztelték.

A kezdeti lépéseket követően számos további primer fejlesztése történt a *Prunus* nemzetségen belül. A fejlesztések többsége őszibarack genomi vagy cDNS könyvtárak alapján történt, de ezenkívül több primert terveztek a cseresznye, kajszai, mandula és szilva genomok alapján. A mikrosatelliteknek a nemzetségen belül több fajnál történő sikeres felhasználása általánosan tekinthető. Nem ritka a más nemzetségben való alkalmazás sem. A primerek tervezésének új irányát jelzi, hogy már megjelentek olyan közlemények is, amelyek a teljes *Rosaceae* családban megfelelően működő

primerkészletek kifejlesztését tűzték ki a kutatás céljául (Nishitani és mts., 2007). E szerzők munkájának különlegessége, hogy a hosszú repetitív szekvenciákat (tri- és hexanukleotid) tartalmazó mikroszatellit régiókat kutatták. Az újonnan létrehozott primereket kezdetben főleg a polimorfizmus megállapítására és a fajták elkülönítésére használták különböző *Prunus* fajoknál. Manapság az új primerekkel szemben viszont már más elvárásokat támasztanak, mint például egy-egy nemesítési szempontból lényeges tulajdonság nyomkövetése.

2.9.2 Mikroszatellit markerek alkalmazása a fontosabb *Prunus* fajokban

2.9.2.1 Őszibarack

Az előző fejezetben ismertetettek szerint a primerfejlesztés és a markerezési munka elsőként a csoporton belül gazdaságilag legjelentősebb gyümölcsfajon, az őszibarackon kezdődött. Az első években már jelentős mennyiségű tudás és tapasztalat, és nem utolsósorban számos mikroszatellit régióra tervezett primer szekvencia állt rendelkezésre. Nem véletlen, hogy a meglévőket gyorsan követték további kutatások további fontos fajtakörök származási viszonyainak jellemzésére. Aranzana és mts. (2001a) AFLP és SSR markerek alkalmazhatóságát 100 őszibarackfajta polimorfizmusának vizsgálatánál alkalmazta. A felhasznált 9 AFLP és 7 SSR primerkombinációval lehetséges volt a vizsgált genotípusok azonosítása. Ezzel a kutatással Olaszországot és az USA-t követően egy újabb jelentős őszibaracktermesztő központ, Spanyolország is bekapcsolódott a kísérletekbe. Yu és mts. (2004) hét genetikailag közel álló *Prunus* faj (*P. amygdalus*, *P. persica* subsp. *ferganensis*, *P. persica*, *P. kansuensis*, *P. mira*, *P. davidiana* és *P. persica* subsp. *potanini*) SSR elemzésének eredményeit közzölték. A legnagyobb mértékű azonosságot a *P. persica* subsp. *ferganensis* és *P. persica* között tapasztalták. Ehhez hasonló fokú rokonságot a *P. persica* subsp. *potanini* és *P. kansuensis* között mutattak ki.

Az őszibarackfajták szűk genetikai bázisa, és a világon elterjedt hasonló fajtakörök miatt a vizsgálatok hamar kiterjedtek a tájfajtákra, valamint egy-egy körzetben termesztett populációkon belüli diverzitás vizsgálatára. Badenes és mts. (2002) Valencia környéki őszibarack tájfajtákat vizsgáltak, és annak ellenére, hogy kevésbé változékony genotípusról volt szó, sikeresen elkülönítették a különböző termőtájokról származó fajtákat. Ebben a kísérletben számoltak be egyébként a *Prunus*

nemzettségben először nemesítési szempontból fontos fajtabélyegek és SSR markerek kapcsoltságáról. Wunsch és mts. (2006) 85 helyi fajtát vizsgáltak mikroszatellit markerekkel. A fajták közel feléről egyedi ujjlenyomat készült, illetve olyan morfológiai bélyegekkel egyező csoportokat sikerült kialakítani, mint a hússzín vagy a gyümölcs alakja. Az eredmények hozzájárulnak a spanyol tájfajták eddigénél hatékonyabb génmegőrzéséhez. Hasonló kutatásokat folytatattak Bouhadida és mts. (2007) aragóniai tájfajták jellemzésére. A sikeres próbálkozásokon felbuzdulva további kutatócsoportok csatlakoztak újabb fajtakörök bevonásával. A szicíliai tájfajtákat elemezték (Marchese és mts., 2006), majd Japánban elterjedt kínai eredetű őszibarack klónok polimorfizmusát, és azok pontos származását kutatták (Mase és mts., 2007).

A fajták leírásával és származásával kapcsolatos kutatásokkal párhuzamosan hamar megjelentek a fontos agronómiai tulajdonságok nyomonkövetését célzó SSR markeres vizsgálatok. A területen úttörő munkát végeztek Yamamoto és mts. (2001), amikor mikroszatellit markerekkel 9 egyszerűen öröklődő monogénes tulajdonság (pl. hússzín, virágszín, héjszín stb.), valamint négy QTL tulajdonság (érés idő, gyümölcsméret, virágzási idő, terméselrűgás idő) kapcsoltságát vizsgálták F2 hasadó nemzedékben. Scorza és mts. (2002) kimutatták, hogy a pchgms1 jelzésű primerpár alkalmas az oszlopos növekedésű genotípusok, valamint a meghatározott színű és hűskeménységű fenotípust mutató genotípusok szelektálására. Ugyanebben az évben Wang és mts. (2002) őszibarack BAC könyvtárból AFLP technika közbeiktatásával dolgoztak ki SSR-primerkészletet, amelyeket az őszibarackfák növekedési típusainak nyomonkövetése céljából, valamint a fonálféreg rezisztencia markerezésére terveztek. Az őszibarack folyamatos hajtásnövekedését egy gén recesszív allélja okozza. Wang és mts. (2002) a tulajdonsághoz kapcsolt mikroszatellit markereket azonosították, melyek így felhasználhatóvá váltak a későbbi nemesítési munkákhoz.

Ahogy a fenti példák is bizonyítják, a mikroszatellit markerekkel folytatott kutatások sok területen és számos kutatóhelyen indultak meg párhuzamosan. Ezt felismerve viszonylag korán, széles nemzetközi bázison megkezdődött az őszibarack genomikai kutatása (Abbott és mts., 2002). A konzorcium célja az őszibarack genomját modellként használni a *Rosacea* család genomikai kutatására. A konzorcium munkájának legutóbbi eredményeiről Shulaev és mts. (2008) számoltak be.

2.9.2.2 *Cseresznye és meggy*

Az első kísérleteket 66 kései meggy (*Prunus serotina*) genotípuson Downey és Iezzoni (2000) végezték egy meggyből származó kloroplasztisz DNS marker, valamint 8 genomi őszibarack, cseresznye és meggy mikroszatellit markerrel. Külön érdekesség, hogy az első meggyre tervezett SSR primerek egy magyar fajta, az 'Érdi bőtermő' genomi DNS-ének könyvtárából származnak. Ebből a tudományos műhelyből került ki a második vizsgálat is, ahol 75 különböző származású meggyfajtát hasonlítottak össze 10 SSR primerrel. Ennek a vizsgálatnak is vannak magyar vonatkozású eredményei, hiszen sikerült megkülönböztetni az 5 'Pándi meggy' klónt. A vegetatíván szaporított növények esetében nagyon jelentős az egyes változatok pontos azonosítása biztonságos termesztésük érdekében. A fajták azonosításánál meggy esetében gyakori probléma, hogy azonos fajtákat és tájfajtákat országonként eltérően neveznek. Erre példa a magyar 'Pándy' klón, 'Crisana' Romániában, és 'Köröser Weichel' Németországban (Cantini és mts., 2001).

Ezt követően a *Cerasus* fajok SSR-polimorfizmusát többen is leírták, és fajtaazonosításra, illetve származási viszonyok megállapítására használták (Wünsch és Hormaza, 2002b; Clarke és mts., 2004; Clarke és Tobutt, 2003; Schueler és mts., 2003; Struss és mts., 2003). E nemzetség esetében más jellegű vizsgálatot végzett Páron és Jacquemart (2005), akik a mikroszatellitek alkalmazását kutatták a ploidszint követésére. Az Észak-Amerikában faipari szempontból fontos tetraploid fekete cseresznyéről nem tudni, hogy a faj allo- vagy autotetraploid. Az ellenőrzött keresztezésekből és a vizsgált lókuszok hasadásából (két független kromoszóma szerelvény szerint) arra a következtetésre jutottak, hogy a fekete cseresznye alloplóid.

2.9.2.3 *Mandula*

Kapcsolatsági térképek készítéséhez már viszonylag hamar használtak SSR markereket. Joobeur és mts. (2000) az RFLP, RAPD és izoenzim markerek mellett, 6 mikroszatellit markert helyezett el a mandula molekuláris markerekkel szerkesztett térképén. Serrano és mts. (2002) az SSR-primerek nemzetségen belüli használhatóságát kiaknázva 25 mandulaalanyt azonosítottak őszibarack primerekkel történt analízis alapján. Elsőként Testolin és mts. (2004) azonosítottak mandulában mikroszatellit régiókat. Összesen 44 primert terveztek, melyből 20 amplifikációs képességét tesztelték

7 különböző, a *Prunus* nemzetségbe tartozó fajon. A primerek 30%-a eredményesen működött mind a 7 taxonban, sőt kettő még az almában is lókuszkokat tárt fel.

A mandula genetikailag változatos és kevésbé ismert nemesítési alapanyagait sokat ígérő kutatási területet jelenthetnek. Martínez-Gómez és Gradziel (2002), valamint Sánchez-Pérez és mts. (2006a) hangsúlyozták az SSR-polimorfizmus vizsgálatának fontosságát a nemesítési alapanyagok jellemzése terén. Az alapanyagok nagy genetikai diverzitását mutatták ki a kínai munkacsoportok által közölt adatok. Ez a változékonyság jellemző a kínai fajtákra (Xie és mts., 2006), de még inkább látványos a kínai fajták mediterrán fajtákkal való összehasonlítása, mely esetben a két régió fajtái határozottan elkülönültek a dendrogramon (Xu és mts., 2004). Ehhez hasonló nagy variabilitásról számolnak be Amirbakhtiar és mts. (2007) az iráni mandulafajták, valamint három vad faj (*Prunus communis*, *P. orientalis* és *P. scoparia*) elemzésekor.

2.9.2.4 Szilva

A *Prunus* nemzetségben a többi gazdaságilag fontos fajhoz képest csak viszonylag későn közöltek szilva genomra kifejlesztett mikroszatellit primereket (Decroocq és mts., 2004). A hexaploid szilva cDNS alapján, és eddig egyedi módon kloroplasztisz cpDNS templátra terveztek mononukleotid ismétlődéseket felszaporító primereket. Az újonnan kifejlesztett primerkészlet átlagosan 6 polimorf allélt eredményezett lókuszonként, mellyel sikerült korrigálni néhány csacsaki szilvafajta feltételezett eredetét. Az előző módszert követve Ohta és mts. (2005) diploid szilva kloroplasztisz cpDNS-ére tervezték a primerkészletüket. Tíz tervezett primer közül hét mononukleotidos ismétlődésű szakaszokat ismert fel. Segítségükkel lehetséges volt 17 *Prunus* faj megkülönböztetése.

A szilva mint gyümölcs taxonómiai- és így genetikai szempontból is nagyon változatos képet mutat. A faj SSR-markerekkel történő kutatásáról számoltak be Ahmad és mts. (2004), akik a diploid szilvákon kívül a pluot és plumcot hibridek, valamint kajszi-fajták genomját is jellemezték a mikroszatellit régiók változékonyságának vizsgálatával. A dendrogram alapján a szilvák és a ploutok élesen elkülönültek a kajszi-fajtáktól, míg a pluot fajták a szilva fajták között elszórtan helyezkedtek el. Ebből arra lehet következtetni, hogy a ploutok genetikai hátterüket tekintve közelebb állnak a szilvához, mint a kajszihoz.

Az amerikai szilvák bonyolult taxonómiai rendszerének molekuláris hátterébe próbáltak betekintést nyerni Rohrer és mts. (2004). Vizsgálataikból az derült ki, hogy a sokféle hibridizációra képes amerikai szilvák azonosítására nem minden esetben volt elegendő a kísérletben használt 15 SSR-primerpár, és az általuk kimutatott, lókuszonkénti átlagos 12,4 allélt eredményező polimorfizmus.

A fajtaazonosítási célú vizsgálatok mellett a szilvában is történtek egyéb célú kutatások. A gyökérfonálféreg rezisztenciát okozó génhez kapcsolt SSR markereket azonosítottak Claverie és mts. (2004).

2.9.2.5 Kajszi

A kajszinál már viszonylag hamar kifejlesztésre kerültek a faj genomjára tervezett mikroszatellit primerek. A kajszi genomi DNS-könyvtára alapján Lopes és mts. (2002) 21, Messina és mts. (2004) 99 SSR lókuszt azonosított. Decroocq és mts. (2003) 10 EST SSR szekvenciát találtak a kajszi levélből nyert cDNS könyvtárban. A kapott primereket nemcsak kajsziban, hanem további 11 rokon és nem rokon fajban sikeresen alkalmazták. Hagen és mts. (2004) 24 primerszekvenciát írtak le. A primereket 13 genomi DNS-ből, 8 gyümölcsből- 3 pedig levélből izolált cDNS könyvtárból azonosította. A kajszi genom alapján tervezett primerek megjelenését követően is végeztek azonban kutatásokat más, a *Prunus* nemzetségből származó mikroszatellitekkel, így jelentősen bővült a rendelkezésre álló primerek száma.

Természetesen ennél a fajnál is már azelőtt megkezdődtek a mikroszatellit markerekkel végzett kutatások, hogy a genomra tervezett primerek rendelkezésre álltak volna. A *Prunus* nemzetség más fajaihoz hasonlóan a kajszinál is a Cipriani és mts. (1999) által közzétett, őszibarackra tervezett primerek használatával kezdődtek el az SSR markeres vizsgálatok. Elsőként Hormaza (2002) jellemezte a kajszfajták SSR-polimorfizmusát. Negyvennyolc kajszifajtát vizsgált 37 más *Prunus* fajra, zömmel őszibarackra kidolgozott mikroszatellit primerekkel, melyből 31 megfelelő amplifikációt biztosított. Tehát a kajszinál is megerősítést nyert, hogy a mikroszatellit régiókat határoló szekvenciák konzervatívak a nemzetségen belül. Az alkalmazott módszer hatékonyságát jól bizonyítja, hogy az összes fajtát sikerült azonosítani a 20 lókuszból megfigyelt 82 allél alapján. Külön érdekesség, hogy a 'Gönci magyar kajszi' is a vizsgált genotípusok között szerepelt. A kapott adatok alapján készített dendrogram

a fajtákat két fő csoportra osztotta. Az egyik csoport különböző európai fajtákat, míg a másik kizárólag francia fajtákat, valamint a 'Gönci magyar kajszit' tartalmazta. A francia fajták és a 'Gönci magyar kajszit' közti hasonlóságot később Ruthner és mts. (2006) is igazolták. A kajszit ázsiai géncentrumából történő terjeszkedésekor magyar kajszit fajtakör egy közbülső állomást jelentett a nyugat-európai elterjedés során. Arra vonatkozóan pedig több szerző is utalt már, hogy a 'Luizet' francia fajta pedigében szerepel a magyar kajszit is. Ruthner és mts. (2003) 16 Magyarországon termesztett kajszifajtát sikeresen azonosítottak 5 kajszit SSR primerrel. A vizsgálat megerősítette a korábban RAPD markerekkel közölt eredményeket ugyanennél a fajtakörnél. Regner és mts. (2004) 88 kajszit genotípust hasonlítottak össze 12 őszibarack genomi DNS-ből fejlesztett SSR primer segítségével. A kutatás fő célja az Ausztriában két legnagyobb területen termesztett 'Klosterneuburger Marille' és 'Ungarische Beste' fajták és klónjaik jellemzése volt. A vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy a két fajta noha termesztési tulajdonságaiban némileg különböző, genetikai hátterét tekintve lényegében azonosnak tekinthető. Mindkét fajta tartalmaz azonban olyan genotípusokat, amelyek eltérnek az alaptípusoktól. Ez részben a vegetatív szaporítással tovább vitt mutációk eredménye. Ezenkívül voltak olyan genotípusok is, amelyek genetikailag annyira távoliak az alaptípusoktól, hogy a fajtához tartozásuk megkérdőjelezhető, ezért az elnevezés tévesnek tekinthető. Krichen és mts. (2006) 54 tuniszi tájfajtát vizsgáltak. Huszonhat primer alkalmazásával összesen 103 allélt detektáltak. A gyakorlati alkalmazhatóság céljából kiemelték azt a legjobb 6 primerpárt, amelyik elegendő polimorfizmust biztosított az összes fajta azonosításához.

A kizárólag fajtaazonosító vizsgálatok mellett egyre inkább jellemzővé vált a faj elterjedésének vizsgálata SSR markerekkel, melyek a rendelkezésre álló molekuláris markerek közül erre a célra a legalkalmasabbnak bizonyultak. Az ilyen célú kutatások egyik elindítója a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszéke volt. Az első, magyar fajták bevonásával végzett SSR vizsgálat már 2001-ben a nemzetközi kajszit szimpóziumon bemutatásra került. Az eredményeket tartalmazó kutatások teljes szövege azonban csak jóval később került publikálásra (Romero és mts., 2006). A vizsgálat során arra a kérdésre keresték a választ, hogy a magyar fajták milyen közeli rokonságban vannak a dél-európai fajtakörrel. Összesen 20 vizsgált fajtából 10 Magyarországon termesztett, illetve további 10 észak-amerikai és dél-európai fajta volt.

Mind a 12 felhasznált őszibarack primer polimorf fragmentumokat hozott létre, melynek segítségével sikerült a fajtákat megkülönböztetni. A kapott allélvariabilitás alapján készített dendrogram szerint a magyar fajták külön csoportot képeztek az észak-amerikai, valamint a dél-európai fajtáktól. A magyar fajtákon belül, két csoporton belül (Óriás kajszik és a Rózsakajszik) nagy hasonlóságot találtak. A kutatás bebizonyította, hogy az SSR-markerezés alkalmas a kajszii elterjedésének követésére.

Mindenféleképpen mérföldkönek számít a kajszii fajták kultúrevolúciós vizsgálatában Zhebentyayeva és mts. (2004) munkája. A munkacsoport 74 kajszii genotípust vizsgált, és az általában elterjedt fajtákon kívül jellemezni tudták a kajszibarack elsődleges és másodlagos géncentrumából származó genotípusokat is. A kajszii elsődleges és másodlagos géncentrumából származó minták az elvárhatónál kisebb genetikai diverzitást mutattak csoportjukon belül. Ennek ellenére a klaszteranalízis eredményei hűen tükrözték a korábban orosz tudósok által leírt kajszii kultúrevolúciós útvonalakat. Az európai, ezen belül a magyar fajták a legnagyobb azonosságot az iráni-kaukázusi fajtákkal mutatták.

Hasonló tanulmányokat végzett egy magyar, osztrák és portugál kutatókból álló nemzetközi csoport is. Százötven különböző eredetű fajta vizsgálatával a korábban leírt eredményeket megerősítették, de a kísérletben alkalmazott más fajtaösszetétel miatt lényeges megfigyeléseket tettek az amerikai fajtákat illetően is. Vélelmezték, hogy az amerikai fajták, és ezen belül a PPV rezisztencianemesítés fő donorai nem tisztán európai eredetű fajták. Az SSR-polimorfizmus alátámasztotta a korábbi feltételezést, amely szerint ezek a fajták ázsiai eredetű génekkel is rendelkeznek. A genetikai távolságok alapján sikerült meghatározni a fajták közötti rokonsági köröket. Az európai fajták külön ágra kerültek a dendrogramon. Néhány fajta esetében a korábban is feltételezett szinonim nevek létezése megerősítést nyert. Ezek közé tartozott pl. a 'Szegedi mamut' és a 'Ceglédi óriás' fajta (Maghuly és mts., 2005; Pedryc és mts., 2006; Ruthner és mts., 2006)

Az előbbi megállapítások egybevágóak a Zhebentyayeva és mts. (2008) által tapasztaltakkal. Munkájukban az AFLP- és SSR-markerekkel bebizonyították, hogy az amerikai fajtákban létező PPV rezisztencia forrása valószínűleg az Amerikába bekerült észak-kínai eredetű genotípusokból származik. Bizonyítást nyert, hogy a 'Stark Early

Orange', 'Goldrich' és 'Harlayne' fajták genotípusaira jellemző PPV rezisztencia génforrása vagy ugyanarra, vagy genetikailag nagyon közeli ősrre vezethető vissza.

A fent említett filogenetikai tanulmányokat kiegészíthetik a jövőben azok a kínai kutatások, melyek célja a vad *P. armeniaca* populációk genetikai összetételének elemzése. A He és mts. (2007) által közölt eredmények szerint ezek a populációk még megtartották a genetikai variabilitásukat, bár veszélyeztetve vannak úgy a kultúrfajták genetikai inváziójától, mint az emberi környezet átalakító tevékenységétől.

Az előzőekben említett vizsgálati célok mellett (fajtaazonosítás, származás-vizsgálat) kajsziban is alkalmaztak konkrét nemesítési célokra mikroszatellit markereket. Sánchez-Pérez és mts. (2005, 2006b) spanyol és néhány külföldi fajtát azonosítottak SSR-markerekkel. Tanulmányuk kiterjedt a vizsgált fajták néhány termesztési szempontból fontos tulajdonságának (virágzási idő, érési idő, termékenyülési viszonyok, gyümölcsszín és -tömeg stb.) jellemzésére is. Összehasonlítva az SSR-variabilitás és a morfológiai bélyegek alapján nyert klasztereket, nem találtak közöttük szignifikáns kapcsolatot. Graetz (2006) az aszalásra alkalmas fajták előállítását célzó nemesítési program során SSR-markerekkel jellemezte a nemesítési alapanyagokat. Vilanova és mts. (2006) PPV rezisztenciáért felelős szakasz pontos markerezése érdekében a rezisztencia géneket tartalmazó kajszii 1. kromoszómáját telítette markerekkel. Hasonló megfontolásból Sicard és mts. (2007) kihasználva a *Prunus* térképezés eddigi eredményeit, primereket terveztek a kajszibarack potenciális rezisztenciagénjeire (candidate resistance genes).

Nagyon jelentős célnak tekinthető, hogy azt a sok eredményt és tapasztalatot, amelyet az egymástól függetlenül működő kutatócsoportok létrehoztak, valamilyen módon egységesíteni lehessen. A célt felismerve egyre több olyan tanulmány születik, melyek az SSR markerek integrált genetikai térképekre való beiktatásával foglalkoznak. A *Prunus* nemzetségben a korábban említett Abbott és mts. (2002) indítványozták az ilyen irányú munkát egy nemzetközi konzorcium szervezésével. A térképezés eredményeit többek között bemutatták Dirlewanger és mts. (2004), illetve legutóbb Jung és mts. (2008). A kajszibarack markereit Dondini és mts. (2007) beillesztették az eddig összeállított, integrált *Prunus* genetikai térképre. A *Prunus* nemzetségben molekuláris markerekkel azonosított minőségi és mennyiségi tulajdonságokat a 4. és 5. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A molekuláris markerekkel azonosított fontosabb monogénes tulajdonságok a *Prunus* nemzetségben (Martinez-Gomez és mts., 2005)

Faj	Tulajdonság	Marker	Hivatkozás
Ószi barack	Levélszín	RAPD	Chaparro és mts., 1994
	Levélszín	SSR	Yamamoto és mts., 2001
	Levél mirigyezettsége	RFLP	Dettori és mts., 2001; Quarta és mts., 2000
	Dupla virág	AFLP	Sosinski és mts., 2000
	Hímsterilitás	AFLP	Dirlewanger és mts., 1999
	Héj szőrözöttsége	AFLP	Dirlewanger és mts., 1999
	Héj szőrözöttsége	RFLP	Bliss és mts., 2002
	Héjszín	SSR	Yamamoto és mts., 2001
	Lapított gyümölcs	RFLP	Dirlewanger és mts., 1999
	Hússzín	RAPD	Wartburton és mts., 1996
	Hússzín	AFLP	Abbott és mts., 1998
	Hússzín	RFLP	Bliss és mts., 2002
	Magvaválóság	RFLP	Abbott és mts., 1998; Dettori és mts., 2001; Quarta és mts., 2000
	Savtartalom	AFLP	Wu és mts., 2004
	Magvaválóság	AFLP	Yamamoto és mts., 2001
	Savtalan gyümölcs	RAPD	Dirlewanger és mts., 1999
	Savtalan gyümölcs	RFLP	Bliss és mts., 2002
	Nematóda rezisztencia	AFLP	Abbott és mts., 1998; Lu és mts., 1998
	Nematóda rezisztencia	STS	Lu és mts., 1999
	Nematóda rezisztencia	AFLP	Yamamoto és Hayashi, 2002
Nematóda rezisztencia	STS	Yamamoto és Hayashi, 2002	
Nematóda rezisztencia	AFLP	Blenda és mts., 2002	
Mandula	Önmeddőség	RFLP	Joobeur és mts., 1998
	Öntermékenyülés	RFLP	Arús és mts., 1999
	Mandulabél íze	RFLP	Bliss és mts., 2002
	Héj keménysége	RFLP	Arús és mts., 1999
	Késői virágzás	RAPD	Ballester és mts., 2001
Kajszi	PPV rezisztencia	SSR	Hurtado és mts., 2002b; Vilanova és mts., 2003
	PPV rezisztencia	AFLP	Salava és mts., 2001
	Önmeddőség	RAPD	Badenes és mts., 2000
	Hímsterilitás	RAPD	Badenes és mts., 2000
Cserenye/ meggy	Önmeddőség	EST	Tao és mts., 1997
	Önmeddőség	EST	Sonneveld és mts., 2001
	Törpe habitus	RFLP	Arús és mts., 1999
Szilva	Nematóda rezisztencia	RAPD	Salesses és mts., 1998
	Nematóda rezisztencia	SCAR	Lecoals és mts., 1999

5. táblázat: A molekuláris markerekkel azonosított fontosabb poligénes tulajdonságok a *Prunus* nemzetségben (Martinez-Gomez és mts., 2005)

Faj	Tulajdonság	Marker	Hivatkozás
Őszibarack	Levélsodródás rezisztencia	RAPD	Viruel és mts., 1998
	Internódium hosszúsága	RFLP	Verde és mts., 2002
	Lisztharmat rezisztencia	RFLP	Quarta és mts., 2000
	Virágzási idő	RFLP	Dirlewanger és mts., 1999; Quarta és mts., 2000; Verde és mts., 2002
	Érés idő	RFLP	Quarta és mts., 2000; Dirlewanger és mts., 1999
	Érés idő	SSR	Verde és mts., 2002
	Érés idő	SSR	Etienne és mts., 2002
	Gyümölcsérés ciklusa	RFLP	Abbott és mts., 1998
	Gyümölcsérés ciklusa	SSR	Etienne és mts., 2002
	Termőképesség	RFLP	Dirlewanger és mts., 1999
	Gyümölcs átmérő	AFLP	Abbott és mts., 1998
	Gyümölcs tömege	RFLP	Abbott és mts., 1998; Etienne és mts., 2002
	Gyümölcshéj színe	RFLP	Quarta és mts., 2000
	Gyümölcshéj színe	SSR	Verde és mts., 2002
	pH	RFLP	Abbott és mts., 1998; Etienne és mts., 2002
	Titrálható savtartalom	RFLP	Dirlewanger és mts., 1999; Etienne és mts., 2002
	Almasav-tartalom	RFLP	Dirlewanger és mts., 1999; Etienne és mts., 2002
	Citromsav-tartalom	RFLP	Dirlewanger és mts., 1999; Etienne és mts., 2002
	Vízoldható anyagok	RFLP	Abbott és mts., 1998; Quarta és mts., 2000
	Vízoldható anyagok	SSR	Etienne és mts., 2002; Verde és mts., 2002
Fruktóz tartalom	AFLP	Abbott és mts., 1998	
Fruktóz tartalom	RFLP	Etienne és mts., 2002	
Glükóz tartalom	RFLP	Abbott és mts., 1998; Dirlewanger és mts., 1999; Etienne és mts., 2002	
Mandula	Héj keménysége	RFLP	Arús és mts., 1999
Cserenye/ meggy	Virágzási idő	RFLP	Wang és mts., 2000
	Érés idő	RFLP	Wang és mts., 2000
	Gyümölcs tömege	RFLP	Wang és mts., 2000
	Vízoldható anyagok	RFLP	Wang és mts., 2000

3 A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLJAI

A kajszi molekuláris markerezése a kilencvenes évek elején kezdődött a jogelőd Kertészeti Egyetem Genetika és Növénynevelés tanszékén. Sokáig egy léghűtéses, kezdetleges PCR készülék, néhány futtatókád, valamint egy Polaroid gélfotózásra alkalmas készülék jelentette az egyedüli laborhátteret. Kezdetben szakkörös, majd Ph.D hallgatóként lépésről-lépésre haladva csak lassan, három-négy évvel ezelőtt sikerült azokat a feltételeket megteremteni, amellyel a molekuláris markerezés rutinszerűen végezhető. A vizsgálataim végzésének idején azonban még nem állt rendelkezésre a szükséges magas színvonalú technikai háttér és tapasztalat. Az előrelépés a saját fejlesztéseink mellett elsősorban annak volt köszönhető, hogy megfelelő partneri kapcsolatokat sikerült kiépítenünk hazai és külföldi intézményekkel.

Még egyetemi hallgatóként 2000-ben 8 hónapot töltöttem a Michigan State University Kertészeti Genetika tanszékén, ahol a meggy *Blumeriella jappii* rezisztenciához kapcsolt mikroszatellit markerek azonosításával foglalkoztam. Itt sikerült elsajátítanom azokat a technikai ismereteket, melyek nagyban segítettek a későbbi munkámban.

A kajszi molekuláris vizsgálatához a következő segítséget a Valenciái Mezőgazdasági Kutató Intézetben kaptuk, ahol 2002-ben közel egy hónapot töltöttem. Az intézetben kifejlesztett, illetve tesztelt őszibarack mikroszatellit primereket használtuk a hazánkban termesztett kajszik és nemesítési alapanyagok jellemzésére. A munkát közös publikációval zártuk.

A mikroszatellit kutatás következő munkái a bécsi BOKU egyetemmel kialakított közös projekt keretén belül zajlottak. Eközben sikerült olyan mértékben fejleszteni a tanszék laboratóriumi hátterét, megszerezni és saját laboratóriumunkban is hozzáférhetővé tenni a munkához nélkülözhetetlen tudást, hogy lehetővé vált a kutatás egy részét közvetlenül tanszékünkön elvégezni. Az osztrák-magyar projekt eredményei 2005-ben, az akkor újonnan induló *Tree Genetics & Genomes* (Springer) című szakfolyóiratban kerültek közlésre, mely lapot azzal a szándékkal hívták életre, hogy a tudományterületen nagy tekintélynek örvendő *Theoretical and Applied Genetics* fás kultúrák irányába szakosodott társfolyóirata legyen.

A hazai vizsgálatokhoz nagy segítséget kaptunk az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézettől, ami a referencia gyűjteményéből engedélyezte a minták begyűjtését, valamint a fragmentumhossz analízishez az ABI 310 szekvenátor készülékét is a rendelkezésünkre bocsátotta.

A kísérleti célokat és az elért eredményeket mindenféleképpen ezeknek az előzményeknek ismeretében célszerű értékelni, hiszen elképzeléseinknek, fantáziánknak többnyire anyagi korlátok, illetve a megfelelő laborfelszereltség hiánya szabott határt, késleltette a megvalósításukat.

A munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. A rendelkezésre álló laborháttérre és a kajszi növényre alkalmas rutinszerű DNS-izolálási eljárás adaptálása.
2. A Magyarországon árutermesztési célból termesztett kajszifajták azonosítása, és egyedi DNS-ujjlenyomat készítése RAPD és SSR markerekkel.
3. Őszibarackra és kajszibarackra tervezett SSR primerkészletek összehasonlítása a kajszi genetikai sokféleségének vizsgálatában.
4. Az eltérő kajszi ökoföldrajzi fajtacsoportok genetikai kapcsolatának követése mikroszatellit markerekkel.
5. A közép-európai fajtakör variabilitásának vizsgálata és összehasonlítása a fő fajtacsoportok polimorfizmusával.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Növényanyag

A vizsgált fajták és hibridek a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék Szigetcsépi ültetvényéből, az MgSzH (volt OMMI) referencia gyűjteményéből, a Mendel Egyetem (Csehország) lednicei ültetvényéből, a Ceglédi Gyümölcsstermesztési Kutató-Fejlesztő Intézet génbankjából, a Kecskeméti Főiskola gyümölcsültetvényéből, a BOKU Egyetem (Bécs) génbankjából, illetve Laimburgból és Ferraraból (Olaszország) származnak (6. táblázat).

4.2 DNS-izolálás

Az analízishez szükséges teljes genomi DNS-t 0,1 g áprilisban és májusban gyűjtött fiatal kajszilevéből izoláltuk három módszer tökéletesítése révén. A RAPD analízishez javított CTAB módszert, míg az SSR markeres vizsgálatokhoz a Qiagen cég által kifejlesztett DNeasy Plant Mini Kitet használtuk. A DNS mennyiségét spektrofotometriás úton mértük (GeneQuant II RNA/DNA) és hígítottuk a reakcióhoz szükséges megfelelő koncentrációra.

4.3 RAPD analízis

A vizsgálatba az állami elismerésben részesített, a nemzeti leíró fajtajegyzékben szereplő összesen 16, Magyarországon legnagyobb területen termesztett fajtát vontunk be. A 16 fajtából hét árufajta, öt választékbővítő fajta, valamint négy próbatermesztésre ajánlott fajta volt.

A kísérlet során az OPERON Co. által szintetizált B, C és O primerkit-et használtuk. Egy-egy kit 20 db, egyenként tíz nukleotidos primert tartalmaz. A kiválasztott 8 primer szekvenciáját, a reakcióelegy összetételét, valamint a felhasznált programot a 7. táblázat tartalmazza. A kísérletünkben a polimorf mintázatot ígérő reakciókat négyszer, ötször megismételtük, és csak a legélesebben megjelenő és reprodukálható fragmentumokat használtuk markerként. Az amplifikált mintákat 1%-os agaróz gélen választottuk el, majd az eredményeket ethidium-bromidos festési eljárással tettük láthatóvá. A kapott fragmentumokat 100 bp (Promega) méretmarkerrel vizuálisan értékeltük, és polaroid kamerával archiváltuk.

6. táblázat: A dolgozatban vizsgált fajták és hibridek származása, a mintagyűjtés helyszíne, a fajták pedigréje, jellemző agronómiai tulajdonságaik és termékenyítési fenotípusuk

Fajta	Származás	Génbank	Pedigré ^{1,2,3}	Pomológiai tulajdonságok ¹	Termékenyítés ^{2,3}
1 AIA 0-10	Ol.	F	Magonc	S, Kny, -, Ngy, GyÉ	SC
2 AIA 0-28	Ol.	F	Magonc	S, KKny, -, Kz, GyÉ	SC
3 AIA 0-68	Ol.	F	Magonc	Ncs, Kny, -, Kz, GyS	SC
4 Albena	Mo.	T.	Szilisztreuszka kajszija × Krasznoscsokij	SN, KKny, MÉ, Kz	?
5 Ananasznij cjurpinszkij	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	ViN, KKny, MÉ, Kz, GyÉ	SC
Andornaktályai magyar kajszija	Mo.	T.	Magyar kajszija tájszelekciója	SN, KKny, MÉ, -	SC
7 Arvam aramat	K-Á.	L.	Ismeretlen	?	?
8 Bachinger	K-E.	B.	Magonc	ViN, Kny, -, Kz, GyS	SC
9 Bebeco	Gro.	Sz.	Véletlen magonc	ViN, Kny, MKü, Ngy, Gyí	SC
10 Bergeron	Fro.	T.	Véletlen magonc (1920)	Ncs, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC
11 Bhart	USA	B.	Lasgerdi Mashhadi × NJA2	SN, KKny, MÉ, Ngy, -	SI
12 Borjana	Mol.	T.	Magyar kajszija × Jerevani	?	?
13 Borsi-féle kései rózsza	Mo.	T.	Ismeretlen, Kecskemét	Ncs, Kny, -, Kcs, -	SC
14 Bronzovij	Ukr.	Sz.	Khurmai × Krasznij partizan	Ncs, -, MÉ, Kz, -	?
15 Budapest	Mo.	Sz.	Nancy × (Acme, Magyar kajszija, Kései rózsza)	ViN, Kny, -, Ngy, GyS	SC
16 Bukurija	Mol.	Sz.	Salah szabadbeporzású magonca	ViN, P, MÉ, Kcs, -	SI
17 Csacsanszko zlato	Szb.	T.	Magyar kajszija tájszelekciója	-, -, -, Ngy, -	SC
18 Callatis	Rom.	Sz.	(Tarzii de Bukuresti × Ananas) × (Luizet × Umberto)	Ncs, KKny, -, Ngy, -	SC
19 Ceglédi arany	Mo.	Sz.	Rózsabarack C. 1668 × Ceglédi óriás	S, Kny, -, Ngy, Gyí	SC
20 Ceglédi bíborkajszija	Mo.	Sz.	Véletlen magonc	SN, P, MÉ, Ngy, GyÉ	SC
21 Ceglédi kedves	Mo.	T.	Ceglédi óriás szabadbeporzású magonca	Ncs, Kny, -, Kz, Gyí	SC
22 Ceglédi óriás	Mo.	T.	Tájszelekció, Izsák (1953)	SN, KKny, MÉ, Ngy, Gyí	SI
23 Ceglédi Piroska	Mo.	Sz.	Ceglédi óriás × Magyar kajszija C.1789	Ncs, KKny, MÉ, Kz, -	SI

Fajta	Származás	Génbank	Pedigré ^{1,2,3}	Pomológiai tulajdonságok ¹	Termékenyülés ^{2,3}
24 Chersonszkij 1469	Ukr.	Sz.	Magyar kajszí klón	SN, KKny, MÉ, Kz, -	SC
25 CIV 1.	O.	F.	Magonc	?	?
26 Comandor	Rom.	Sz.	Marculesti 17/52 × Marculesti 43/1	SN, KKny, MÉ, Ngy	SC
27 Crvena Ungarska	Mac.	T.	Magyar kajszí szelektált klónja	SN, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC
28 Darunek malahojeva	Ukr.	T.	Ismeretlen	?	SC
29 Dionis 1482	Ukr.	Sz.	Salah × Kok-psár	ViN, P, -, Kcs, -	?
30 Dolgocsukna	K-E	Sz.	Magyar kajszí szelektált klónja	?	SC
31 Dr. Mascle	Fro.	B.	Ismeretlen	?	?
32 Effekt	Ukr.	Sz.	Krupnolodnij szabadbeperzésű magonca	S, KKny, MÉ, Ngy, -	SC
33 Salah	Örm.	Sz.	Örmény tájfajta	ViN, Kny, MÉ, Ngy, GyÉ	SI
34 Fesztival	UKR	Sz.	Ismeretlen	?	?
35 Goldrich	USA	Sz.	Sunglo × Perfection	Ncs, Kny, -, Ngy, -	SI
36 Gönci magyar kajszí	Mo	T.	Magyar kajszí szelektált klónja	SN, P, MÉ, Kz, GyÉ	SC
37 Gulkin	P.	B.	Magonc	Ncs, Kny, MÉ, Kcs, GyÉ	SI?
38 Harcot	Kan	T.	(Geneva × Narmata) × Morden 604 × NJAI (Perfection × Phelps) (1977)	SN, Kny, MÉ, Kz, GyÉ	SI
39 Harmat	Mo.	Sz.	Salah szabadbeperzésű magonca	Ncs, P, MKü, Kz, -	SI
40 Hunza	P.	B.	Magonc	Ncs, Kny, MÉ, Kcs, GyÉ	SI?
41 Junszkij	Mol.	Sz.	Salah szabadbeperzésű magonca	S, P, MÉ, Kcs, -	SC
42 Kalasek	Cso.	L.	Magyar kajszí szelektált klónja	SN, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC
43 Karim-Abad	P.	B.	Magonc	Ncs, Kny, MÉ, Kcs, GyÉ	SI?
44 Karola	Szlo.	L.	Koloboucka × Velkopavlovicka	SN, Kny, -, Kz, -	SC
45 Kees-psár	Üzb.	Sz.	Helyi fajta	S, Kny, MÉ, Kz, -	SI
46 Keeskemét (késői)	Mo.	T.	Véletlen magonc	ViN, Kny, -, Kz, -	SC
47 Keeskemét (korai)	Mo.	T.	Véletlen magonc	ViN, Kny, -, Kz, GyS	SC
48 Kjurmai	K-A.	L.	Ismeretlen	S-Ncs, P, MÉ, Kz, GyÉ	SI
49 Kijejszkij aromatij	Ukr.	Sz.	?	?	?

	Fajta	Származás	Génbank	Pedigri^{1,2,3}	Pomológiai tulajdonságok¹	Termékenyülés^{2,3}
50	Kletnice	Cso.	L.	Helyi szelektált klón	ViN, KKny, MÉ, Kz, GyÉ	SC
51	Klosterneuburger	Au	B.	Ismeretlen magonc	ViN, Kny, MKü, Kz, GyÉ	SC
52.	Konkurencia	Ukr.	L.	Effekt × Priuszadebnij rannij	Ncs, -, MÉ, Kz, -	?
53.	Konzervnjj podznij	Ukr	Sz.	Véletlen magonc	SN, KKny, MÉ, Ngy, -	SC
54	Korai Piros	Mo.	Sz.	Ismeretlen eredetű tájfajta	Ncs, P, MÉ, Kcs, -	SC
55	Korai Zamatos	Mo.	Sz.	Jubilar szabadbeporzású magonca	Ncs, KKny, MÉ, Kz, GyÉ	SI
56	Krasznoscsokij	Ukr.	Sz.	Magyar kajszii szelektált klónja	SN, KKny, MÉ, Ngy, -	SC
57	Krimszkij Amur	Ukr.	T.	Mulla sadik × Udarnik	Ncs, Kny, MÉ, Ngy, -	SC
58	Kászna ungarska	Bul	T.	Magyar kajszii szelektált klónja	SN, -, MÉ, Kcs, -	SC
59	Kuresia	Eu, ÉA	B.	?	ViN, Kny, -, Kz, GyÉ-GyS	SC
60	Ligeti óriás	Mo.	T.	Tájszelekció, Dózsamajor (1959)	Ncs, KKny, MÉ, NNgy, -	SI
61	Litoral	Rom.	Sz.	(Luizat × Umberto) × (Ananas × Ananas)	?	?
62	Luizet	Fro.	F	Ismeretlen magonc	ViN, Kny, MÉ, Kz, GyÉ	SC
63	M2000 m	Pak	B	?	?	?
64	Magyar kajszii C.235	Mo.	T	Magyar kajszii szelektált klónja	SN, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC
65	Mandulakajszii	Mo.	T	Ismeretlen (1954)	Ncs, KKny, MÉ, Ngy, Gyí	SC
66	Mari de Cenad	Rom.	Sz.	Ismeretlen eredetű helyi fajta	Ncs, KKny, -, Ngy, -	SC
67	Marille	K-E.	B	Ismeretlen magonc	ViN, -, Kz-Ngy	SC
68	Moniquí	Spo	Sz	?	S, P, MKü, NNgy, GyÉ	SI
69	Morden 604	Kan	Sz	Ismeretlen	S, P, -, Kcs, -	SC?
70	MT 6/17 (T-6, transzgenikus)	K-Eur	B	Kései kecskeméti szabadelvirágzású utódja	?	SC
71	MT 8/9 (T-8, transzgenikus)	K-Eur	B	Kései kecskeméti szabadelvirágzású utódja	?	SC
72	Murfátlar	Rom	Sz.	?	ViN, -, -, Kcs, -	?
73	Nagygyümölcsű m. kajszii	Mo	T	Magyar kajszii szelektált klónja	SN, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC

	Fajta	Származás	Génbank	Pedigré^{1,2,3}	Pomológiai tulajdonságok¹	Termékenyülés^{2,3}
74	Narjadhij	Ukr.	Sz	Oranzsevo Krasznij × Shirazkij	ViN, -, MKü, Kz, -	?
75	Nyikitszkij	Ukr.	Sz.	Krasznocsokij szelektált klónja	?	SC
76	<i>P. x dasycarpa</i>	Ol.	B	<i>P. cerasifera</i> × <i>P. armeniaca</i>	?	?
77	Paksi magyar kajsz	Mo.	T.	Magyar kajsz szelektált klónja	SN, KKny, MÉ, Kz, -	SC
78	Paszinok	Ukr	Sz.	Vinoszlivij × Salah	ViN, KKny, MÉ, Kz, -	SC
79	Pieber (13,15,17)	K-E.	B	Ismeretlen	?	SC
80	Pisana	Ol.	Sz.	Toscaniai korai önbeporzás	Ncs, KKny, -, Ngy, -	SC
81	Plumcot	USA	Sz.	<i>P. armeniaca</i> × <i>P. saliciana</i>	-	?
82	Poldij junszkij	Mol	Sz.	-	-	-
83	Polonaise	Fro.	Sz.	Véletlen magonc	ViN, Kny, MÉ, Kz, GyÉ	SC
84	Priana	Fro	F.	Canino × Hamidi	S, P, -, Kcs, -	SI
85	Priuszadebnij rannij	Ukr.	Sz.	Szarmarkandszkij rannij × Krasznocsokij	ViN, P, MÉ, Kcs	SI?
86	P. brigantica	Fro.	B.	Ismeretlen	?	?
87	Rakovszky	Mo.	T.	Véletlen magonc, Kocsóc	SN, -, MÉ, Kz, -	SC
88	Rakvice	Cso	L.	Ismeretlen	?	?
89	Rana Dokucana	K-E.	L.	Ismeretlen	?	?
90	Rosensteiner	K-E.	B.	Magonc	ViN, Kny, -, Kz, Gys	SC?
91	Rouge de Sernhac	Fro.	B.	Véletlen magonc	ViN, Kny, MKü, Kz, GyÉ	SC
92	Rózsakajsz C.1406	Mo.	T.	Tájszelekcio, Nagykörös	Ncs, KKny, -, Kz, GyÉ	SC
93	Sabinovska	Szlo.	L.	Magyar kajsz szelektált klónja	?	SC
94	Szarmarkandszkij rannij	K-A.	Sz.	Krasznocsokij × Majszkaja szkoroszelka	Ncs, KKny, MÉ, Kcs, GyÉ	SI
95	San Caestre	Ol.	F.	Ismeretlen	SN, Kny, -, Ngy, -	SC
96	Selena	Rom.	T.	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)	SN, KKny, -, Ngy, Gyí	SC
97	Silvercot	USA	B.	Új nemesítésű fajta	?	?
98	Sirena	Rom.	Sz.	(Ananas × Ananas) × (Luizet × Umberto)	-, -, Ngy, -	SC
99	Spätblühende Koch	K-E.	B.	?	SN, -, -, Ngy, GyÉ	SC
100	Sulmona	Rom.	Sz.	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)	Ncs, KKny, -, Ngy, -	SC

	Fajta	Származás	Génbank	Pedigri^{1,2,3}	Pomológiai tulajdonságok¹	Termékenyülés^{2,3}
101	Szegedi mamut	Mo.	Sz.	Tájszelekció?	Ncs, KKny, MÉ, Ngy, Gyí	SI
102	Szilisztrenka kompotna	K-E.	Sz.	Magyar kajsi szelektált klónja	SN, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC
103	Szkopszka krupna	K-E.	Sz.	Magyar kajsi szelektált klónja	SN, Kny, MÉ, Kz, Gyí	SC
104	Tilton	USA	B.	Ismeretlen	S, Kny, MÉ, Ngy, -	SC?
105	Tomis	Rom.	T.	Ismeretlen	-, -, ENgy, -	?
106	Ungarische Beste	K-E.	B.	Magyar kajsi szelektált klónja	VöN, Kny, MÉ-MKú, Kz, GyÉ-GyS	SC
107	Uzgorod	Ukr.	T.	Ismeretlen	?	?
108	VAV B1	K-E.	B.	Ismeretlen	ViN, Kny, -, Kz-Ngy, GyÉ-GyS	SC
109	Veecot	USA	Sz.	Reliable szabadmegporzású magonca	VöN, Kny, MKú, Kcs, GyÉ	SI
110	Velkij	Ukr.	L.	Ismeretlen	?	?
111	Velkopavlovicka	Cso.	L.	Magyar kajsi szelektált klónja	SN, KKny, MÉ, Kz, Gyí	SC
112	Venus	Rom.	Sz.	(Umberto × Ananas) × (Luizet × Umberto)	Ncs, KKny, -, Ngy, -	SC
113	Vesna	K-E.	F.	Magyar kajsi szabadmegporzású magonca	Ncs, Kny, -, Ngy, -	SI
114	Vinschger Marille	Ol.	B.	Helyi fajta	ViN, KKny, MÉ, Kz, GyÉ	SC
115	Vnuk partizana	Ukr.	Sz.	Krasznij partizan szabadmegporzású magonca	ViN, KKny, MÉ, Ngy, -	?
116	Vognic	Ukr.	L.	Ismeretlen	?	?
117	Voszki	Ukr.	Sz.	Satani szabadmegporzású magonca	S, KKny, -, Ngy, -	SI
118	Zaposzdojje	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	Ncs, -, MÉ, Kz, -	SC
119	Zard	Üzb.	Sz.	Zardalju szabad megporzású magonca, VIR intézet	S, P, -, Kcs, -	SI

¹, Maghuly és mts., 2005.

², Halász, 2007

³, Halász és mts., 2007.

6. táblázat rövidítéseinek magyarázata:

Származás: Au.: Ausztria; Bul.: Bulgária; Cso.: Csehország; Fro.: Franciaország;

Gro.: Görögország; Kan.: Kanada; K-Á.: Közép-Ázsia; K-E.: Kelet-Európa;

Mac.: Macedónia; Mo.: Magyarország; Mol.: Moldávia;

Ol.: Olaszország; P.: Pakisztán; Rom.: Románia; Szb.: Szerbia;

USA: Amerikai Egyesült Államok; Ukr.: Ukrajna; Üzb.: Üzbegisztán

Gyűjtési hely B.: Bécs; F.: Ferrara; L.: Lednice; Sz.: Szigetcsép; T.: Tordas

Gyümölcsszín: ViN: világos narancs, SN: sötét narancs, S: sárga, Ncs: narancs,

VöN: vörös narancs

Gyümölcs konzisztencia: Kny: kemény, P: puha, KKny: közepesen kemény

A magház íze: MÉ: édes, MKű: keserű

Gyümölcsméret: ENgy: extrém nagy, NNgy: nagyon nagy, Ngy: nagy, Kz: közepes,

Kcs: kicsi

Gyümölcssíz: GyÉ: édes, GyS: savas, GyÍ: ízletes

7. táblázat: A RAPD reakció paramétereit és a felhasznált primerszekvenciák

A PCR reakció lépései			A PCR reakció elegy összetétele:	
1.	94°C	2 perc	Komponens	Koncentráció.
2.	92°C	1 perc	Primer	25 pmol
3.	33°C	1 perc	DNS templát	30 ng/μl
4.	72°C	1.30 perc	DNA Red Taq polimeráz	1 unit
5.	72°C	2 perc	dNTP mix	10 mmol
6.	4°C		10x puffer	1,5 m MgCl ₂
40 cikluson keresztül			Steril H ₂ O	-
A polimorf mintázatot eredményező primerek bázissorrendje				
Primer név		Szekvencia		
OPB-08		5'-GTC-CAC-ACG-G-3'		
OPB-09		5'-TGG-GGG-ACT-C-3'		
OPB-16		5'-TTT-GCC-CGG-A-3'		
OPC-06		5'-GAA-CGG-ACT-C-3'		
OPC-11		5'-AAA-GCT-GCG-G-3'		
OPC-14		5'-TGC-GTG-CTT-C-3'		
OPC-15		5'-GAC-GGA-TCA-G-3'		
OPC-20		5'-ACT-TCG-CCA-C-3'		

4.4 SSR analízis fajtaazonosítási céllal

A kutatásban a már korábban ismertetett és a RAPD analízishez használt 16 fajtát használtunk. A kísérletben 8 db kajszi fluoreszcens végjelölésű (Cy5) mikroszatellit primerpárt (Lopes és mts., 2002) használtunk az adott primerre közölt PCR programokkal (8. táblázat). A korábban publikált kajszimarkerezési kutatásoktól eltérően elsőként nyílt lehetőségünk kajszispecifikus primerek használatára (12. táblázat). Az amplifikált mintákat először 3%-os BMA MetaPhor agaróz gélen vizuálisan 25 bp méretmarker (Promega) kíséretében ellenőriztük, majd a sikeres reakciótermékeket 6%-os denaturáló poli-akril-amid gélen Amersham Pharmacia ALF Express szekvenáló készülékkel választottuk szét. A fragmentumok hosszának pontos meghatározása érdekében az amplifikált termékek mellett méretstandardot (100, 200 és 300 bp) és ismert méretű mintát futtattunk belső standardként. A gélek értékeléséhez a Fragment Analyser 1.03 (Amersham-Pharmacia) szoftvert alkalmaztunk.

8. táblázat: A felhasznált PCR program paramétererei

A PCR reakció lépései			A reakció komponensei	
			Komponens	Koncentráció
1.	96°C	5 perc		
2.	96°C	40 s	Primer F+R	10 pmol
3.	*	40 s	DNS templát	10 ng/μl
4.	72°C	1 perc	DNA Taq polimeráz	0,5 unit
5.	72°C	10 perc**	dNTP mix	10 mmol
6.	4°C		10x puffer	1,5 mM MgCl ₂
40 cikluson keresztül			Steril H ₂ O	-

* a primernek megfelelő annealing hőmérséklet

4.5 SSR analízis őszibarack mikroszatellit primerekkel

A kísérletbe negyvenöt olyan kajszifajtát állítottunk, melyeket Közép-Európában természetesség szempontjából értékesnek találtunk. A kiválasztott fajták között szerepelt a tizennégy legnagyobb területen termesztett főfajta, valamint 6 további, az ún. magyar kajszifajtakörhöz tartozó, vagy vele vélhetően szoros kapcsolatban lévő fajta. A fennmaradó fajták eltérő származásúak, ami közös bennük, hogy mindegyikük fontos szerepet játszik tanszékünk nemesítési programjában, ezáltal, mint nemesítési alapanyag kiinduló pontjai a jövő fajtáinak. Mindezen felül referenciaként felhasználtunk néhány olyan világfajtát is, mint pl. a ‘Bergeron’, vagy a ‘Moniquí’.

A PCR reakciót 18 őszibarackra és 1 kajszira kifejlesztett mikroszatellit primerrel végeztük (9. táblázat) MJ research PTC 200 típusú PCR készülékkel és programmal (10. táblázat).

Az amplifikált PCR termékeket 3%-os Metaphor agaróz (Biowhittaker Maine, USA) gélen választottuk el 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM borsav, és 2 mM EDTA (pH 8.0) futtató pufferrel. Az amplifikátumokat 0,7 µg/ml ethidium-bromid festéssel tettük láthatóvá UV fény alatt. A fragmentumokat 100 bp méretmarkerrel (Promega) vizuálisan azonosítottuk.

A genetikai távolsági mátrixot a Reynolds és mts. (1983) által kifejlesztett, hasonló allélok arányát felhasználó módszerrel készítettük MICROSAT programmal (Minch és mts., 1997). Az UPGMA klaszteranalízist a NEIGHBOR program PHYLIP 3.5c verziójával végeztük (Felsenstein és mts., 1989). A dendrogramot a TREEVIEW programmal szerkesztettük (Page, 1996). Ezenkívül meghatároztuk a lókuszonkénti allélszámot, valamint a megfigyelt heterozigótaságot (a heterozigóta genotípusok száma osztva az összes genotípussal).

9. táblázat: A felhasznált őszibarack SSR primerek és származásuk

Lókuszt	Referencia	Primer származás
BPPCT007	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
BPPCT009	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
BPPCT011	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
BPPCT017	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
BPPCT029	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
BPPCT030	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
BPPCT037	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack
Pchgms10	Wang és mts., 2002	őszibarack
Pchgms12	Wang és mts., 2002	őszibarack
Pchgms14	Wang és mts., 2002	őszibarack
Pchgms20	Wang és mts., 2002	őszibarack
MA006b	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
MA009b	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
MA010a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
MA013a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
MA019a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
MA027a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
MA030a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack
Ac7b	Nem publikált.*	kajszi

- Badenes és kutató csoportja által kifejlesztett primer (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias IVIA)

10. táblázat: A felhasznált PCR program paraméterei

A PCR reakció lépései			A reakció komponensei	
			Komponens	Koncentráció
1.	94°C	3 perc		
2.	94°C	45 mp	F+R Primer	10 pmol
3.	50°C	60 mp	DNS templát	10 ng/μl
4.	72°C	1.15 perc	DNA Taq polimeráz	0,5 unit
5.	72°C	10 min	dNTP mix	10 mmol
6.	4°C		10x puffer	1,5 mM MgCl ₂
40 cikluson keresztül			Steril H ₂ O	-

4.6 SSR analízis kajszai mikroszatellit primerekkel

A vizsgálatban 133 kajszai genotípust, a *P. brigantia* fajt, valamint két interspecifikus hibridet, a *P. x dasycarpa*-t és a Plumcotot jellemeztük. A kísérletbe vont fajták megfelelően reprezentálták az Európában, az iráni-kaukázusi régióban, Közép-Ázsiában és Észak-Amerikában termesztett különböző származású kajszikat.

Két különböző forrásból származó, kajszira tervezett 10 mikroszatellit primert alkalmaztunk (12. táblázat), a PCR reakció körülményeit a primereknek megfelelően optimalizáltuk (11. táblázat).

11. táblázat: A felhasznált PCR program paraméterei

A PCR reakció lépései			A reakció komponensei	
			Komponens	Koncentráció
1.	95°C	15 perc		
2.	95°C	50 mp	F+R Primer	8 pmol
3.	*	60 mp	DNS templát	25 ng/μl
4.	72°C	60 mp	DNA Taq polimeráz	0,5 unit
5.	72°C	10 min	dNTP mix	8 mmol
6.	4°C		10x puffer	2 mM MgCl ₂
35 cikluson keresztül			Steril H ₂ O	-

* a primernek megfelelő annealing hőmérséklet

Az amplifikált mintákat először agarózgélben ellenőriztük, majd a sikeres reakciótermékek fragmentumméreteit ABI 3100 kapilláris szekvenátorral és ABI Genotyper 3.7 szoftverrel határoztuk meg.

Minden vizsgált mikroszatellit lókuszt alléllösszetételét meghatároztuk a 136 vizsgált genotípusban. Az egyes allélokot alfabetikus sorrendbe rendeztük ('A' a legkisebb stb.). A POPGENE 1.32 programot használtuk a következő értékek kiszámításához: a lókusztok allélgyakorisága, allélszám, beltenyésztési együttható (F_{ST}), génáramlás ($N_m = 0,25(1/F_{ST}-1)$) (Nei, 1978). Meghatároztuk a várható heterozigótaságot ($H_e = 1 - \sum p_i^2$, ahol p_i az i . allél gyakorisága) (Nei, 1973) és a megfigyelt heterozigótaságot (H_o , a heterozigóta genotípusok száma osztva az összes genotípus számával). A mikroszatellitek által kapott értékek alapján kalkuláltuk a genetikai azonosságot (I), valamint a genetikai távolságot (D) (Nei, 1972; Nei, 1978).

A genetikai távolságok alapján az UPGMA klaszteranalízist az NTSYS programmal végeztük (Rohlf, 1993). A dendrogramot a TREEVIEW programmal

készítettük (Page, 1996). A párok közti távolságot a 133 vizsgált kajszifajta között PAUP (4. verzió) programmal számoltuk ki.

12. táblázat: Az 1. és 3. mikroszatellit kísérletekben felhasznált kajszi SSR primerek

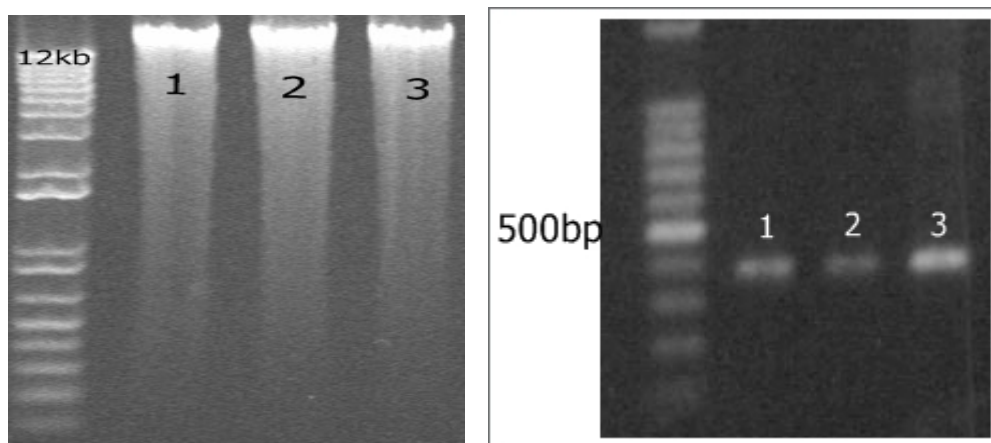
Lókus	Várható hossz (bp)	Referencia
ssrPaCITA2 ¹	219-249	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA7 ^{1,3}	186-224	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA10 ^{1,3}	142-212	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA15 ¹	232-262	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA19 ^{1,3}	98-148	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA23 ^{1,3}	112-157	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA27 ^{1,3}	224-266	Lopes és mts., 2002
UDAp-407 ³	118-162	Messina és mts., 2004
UDAp-410 ³	116-146	Messina és mts., 2004
UDAp-414 ³	150-214	Messina és mts., 2004
UDAp-415 ³	139-143	Messina és mts., 2004
UDAp-420 ³	154-261	Messina és mts., 2004

¹ kísérletben felhasznált primerek, ³ kísérletben felhasznált primerek

5 EREDMÉNYEK

5.1 DNS kivonási eljárás adaptálása kajszira

Rügyattanás után begyűjtött leveleket használtunk fel a DNS-izoláláshoz. A vizsgálatok során három módszert adaptáltunk a kajszi növényre. A protokollok módosítását követően mindhárom módszerrel sikerült PCR-reakcióhoz alkalmas minőségű, és a sorozatvizsgálatokhoz elegendő mennyiségű DNS-t izolálnunk (1. ábra). Az egyes módszerekkel kapcsolatos előnyöket és hátrányokat mérlegelve végül is a Qiagen cég által kifejlesztett DNeasy Plant Mini Kitet választottuk a későbbi vizsgálatokhoz. A DNS-kivonási eljárás során 1 g friss levélszövetet folyékony nitrogénben homogenizáljuk, majd a Qiagen által előállított pufferekkel eltávolítjuk a fehérje, polifenol és egyéb eredetű szennyeződések. A többszöri inkubációs lépések és centrifugálások után az izolált DNS-t speciális DNS-filteren kötjük meg. A protokoll eredményeként 200 µl térfogatú, kb. 20-30 ng/µl koncentrációjú, tiszta DNS-t kapunk.



1. ábra: DNS minőségének tesztelése a kivont DNS futtatásával, illetve PCR reakciót követően (1. bab módszer, 2. CTAB módszer, 3. Qiagen módszer)

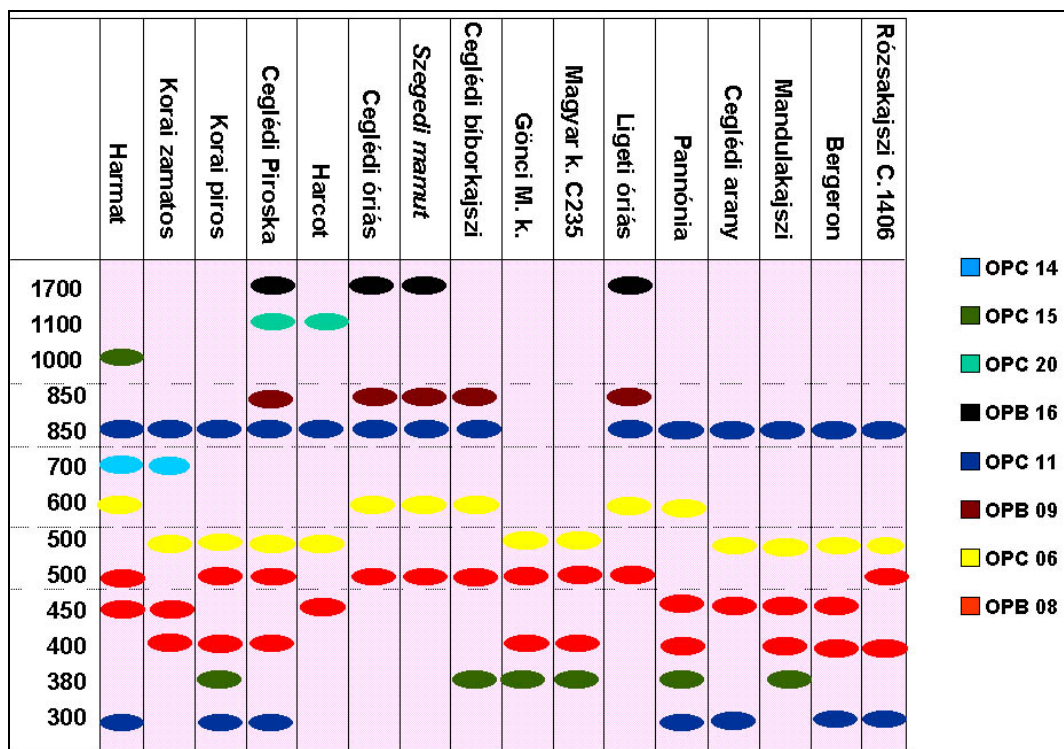
5.2 Magyarországon termesztett fő kajszifajták analízise RAPD markerekkel

A kipróbált OPA, OPB, OPC sorozatba tartozó hatvan OPERON RAPD primer közül 45 esetben kaptunk jól detektálható DNS fragmentumokat. A kapott fragmentumok többsége uniformnak bizonyult a vizsgált fajtáknál, azonban nyolc esetben reprodukálhatóan polimorf mintázatot kaptunk. A nyolc primer amplifikációja a vizsgált 16 fajtában összesen huszónhét fragmentumot eredményezett, melyből 14 bizonyult polimorfnak. Primerenként 1-3 számú polimorf fragmentum képződött. A fragmentumok a 300-1700 bp mérettartományba estek. Néhány esetben egy-egy fajtára jellemző, egyedi fragmentumot is kaptunk. Az OPC 15 1000 csak a 'Harmatra' volt jellemző, míg az OPC 20 1100 csak a 'Ceglédi Piroska' és a 'Harcot' fajtákban volt fellelhető, és az OPC 14-700 egyedül a 'Korai Zamos' és 'Harmat' fajtáknál jelent meg (2. ábra).

Az eltérő fragmentumokat felhasználva a vizsgált kajszifajták többségét sikerült egyértelműen megkülönböztetni, és egyedi DNS-ujjlenyomatot készíteni. A két magyar kajszi klón, a 'Gönci magyar kajszi' és 'Magyar kajszi C.235' esetében ugyanazt a mintázatot kaptuk. Az ún. Óriás kajszi fajtakörön ('Szegedi mamut', 'Ligeti óriás', 'Ceglédi óriás') belül sem tudtunk különbséget kimutatni (3. ábra).



2. ábra: Egyedi fragmentumokat produkáló OPC 14 primer, 100 bp méretmarker (Promega) mellett futtatva.



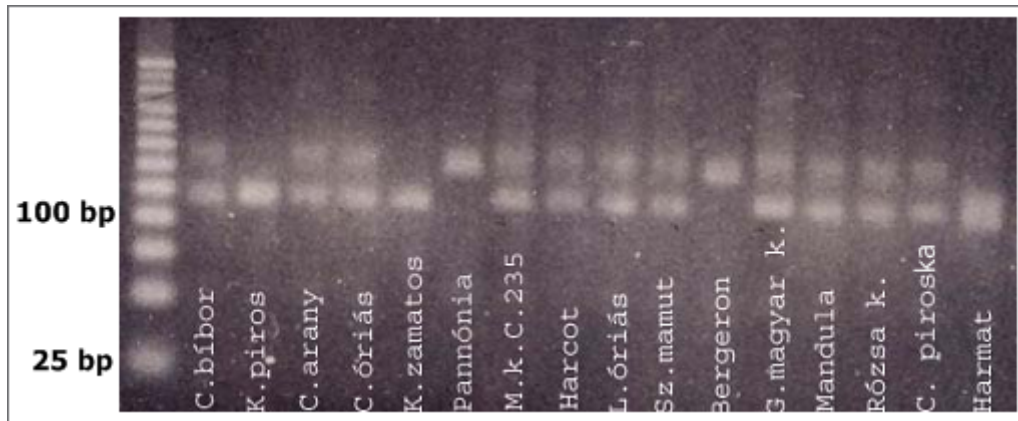
3. ábra: A jellemzett 16 kajszi fajta RAPD markerekkel kialakított egyedi DNS-mintázata

5.3 Magyarországon termesztett fő kajszifajták analízise SSR markerekkel

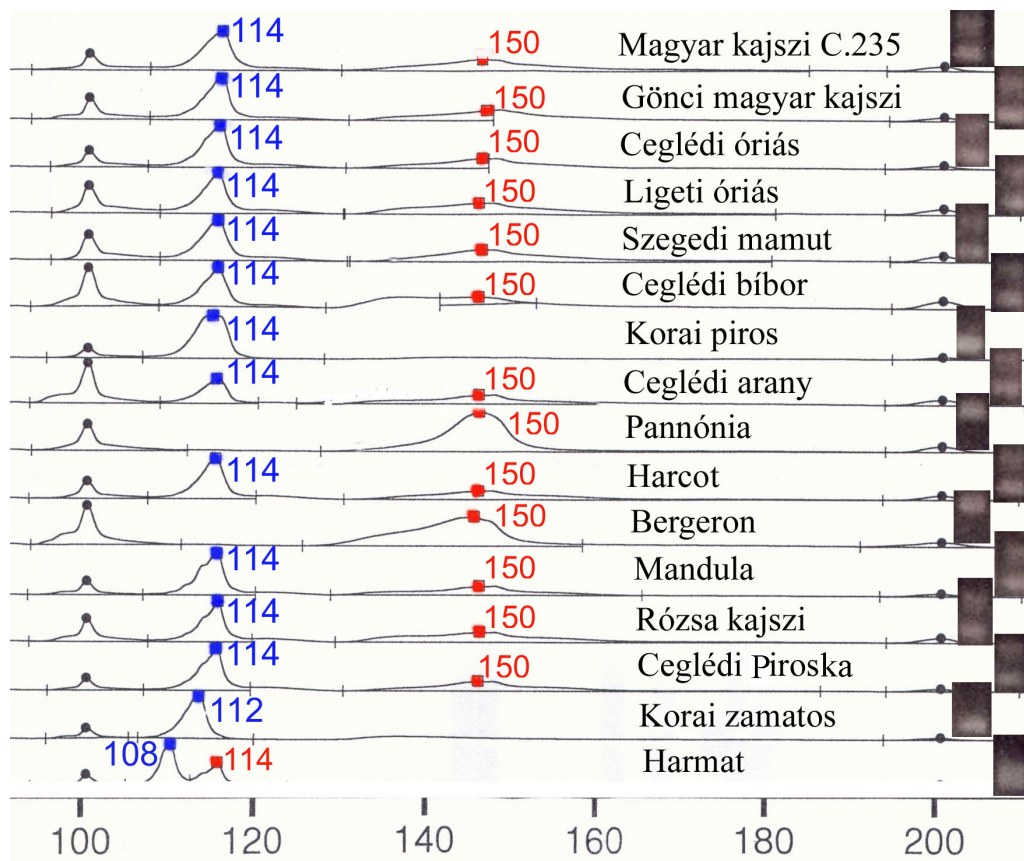
Lopes és mts. (2002) által a kajsziból elsőként izolált SSR primerek közül nyolcat választottunk ki, melyből 5 lókuszt találtunk, amely változékonyságában kiemelkedett a többi közül. Az öt polimorf lókuszt összesen 35 különböző allélt tartalmazott a 16 vizsgált fajtánál. Az összes egyedben kimutatható 35 allél közül 8 csak egyszer fordult elő a vizsgált mintákban. Külön érdekesség, hogy három esetben a ‘Korai zamatos’ fajta, míg két lókuszban a ‘Harmat’ fajta hordozott ilyen egyedi alléleket. A megfigyelt heterozigótaság mértéke relatíve magas 0,37-0,81 között alakult, mely átlagosan 0,61 a vizsgált lókuszeknél.

A több primernél a 3%-os MetaPhor agarózon történő szétválasztás olyan éles képet adott, hogy már önmagában is alkalmas volt egyes allélok kimutatására (4. ábra). A sikeres reakciótermékeket 6%-os denaturáló poliakrilamid gélen Amersham Pharmacia ALF Express szekvenáló készülékkel választottuk szét (5. ábra). A fragmentumok hosszának pontos meghatározása érdekében az amplifikált termékek mellett méretstandardot (100, 200 és 300 bp) és ismert méretű mintát futtattunk. A

kísérlet során felhasznált ‘Gönci magyar kajszzi’ fajta alléljainak pontos méreteit a fragmentumok szekvenálását követően mind az öt vizsgált lókuszesetében ismertük. A fajtát így belső standardként használva lehetőségünk volt a kapott fragmentumok hosszának bázis pontosságú meghatározásra. (13. táblázat). Ezáltal eredményeink teljes biztonsággal összehasonlíthatóak az azonos primereket használó laboratóriumok kajszimarkerezési kutatásaival. A felhasznált kajszzi mikroszatellit primerek egyértelműen alkalmasnak bizonyultak a vizsgált fajta egyedi DNS-profiljának felállításához. A két magyar kajszzi klón ‘Gönci magyar kajszzi’ és ‘Magyar kajszzi C.235’ esetében ugyanazt a mintázatot kaptuk. Az ún. Óriás kajszzi fajtakörön (‘Szegedi mamut’, ‘Ligeti óriás’, ‘Ceglédi óriás’) belül az SSR markerek használatával sem tudtunk különbséget kimutatni.



4. ábra: Az amplifikátumok előzetes szétválasztása 3%-os Metaphor agaróz gélen 25 bp méretmarker (Promega) mellett (ssrPaCita19)



5. ábra: Fragmentumhossz analízis ALF szekvenátorral (ssrPaCita19)

13. táblázat: Az ALF szekvenátor használatával bázis pontossággal meghatározott allélek méretei az öt vizsgált lókuszt esetében. Az egyedi allélek vastagon, a herozigóta lókusztok szürkével jelölve

Fajtanév	ssrPaCITA7		ssrPaCITA23		ssrPaCITA27		ssrPaCITA19		ssrPaCITA10	
	All1	All2	All1	All2	All1	All2	All1	All2	All1	All2
Ceglédi bíbor	187	187	140	140	261	267	114	150	157	175
Korai piros	187	211	140	146	249	255	114	114	175	175
Ceglédi arany	187	209	140	140	249	249	114	150	149	157
Ceglédi óriás	187	209	140	140	261	261	114	150	157	175
Korai zamatos	193	209	140	140	249	253	112	112	157	175
Pannónia	187	209	140	146	259	261	150	150	175	175
Magyar kajszi C.235	187	209	138	146	261	263	114	150	175	175
Harcot	189	209	136	138	261	261	114	150	157	165
Ligeti óriás	187	209	140	140	261	261	114	150	157	175
Szegedi mamut	187	209	140	140	261	261	114	150	157	175
Bergeron	209	209	138	138	261	263	150	150	175	175
Gönci magyar kajszi	187	209	138	146	261	263	114	150	175	175
Mandula	187	187	148	148	261	261	114	150	175	175
Rózsa kajszi	187	209	140	140	251	257	114	150	175	175
Ceglédi Piroska	187	211	142	146	251	251	114	150	157	175
Harmat	187	207	146	146	261	263	108	114	155	157

5.4 Az őszibarackra tervezett SSR primerkészlet alkalmazásának vizsgálata kajszii mikroszatellit régiók variabilitásának kimutatására

A felhasznált 18 őszibarack és 1 kajszibarack mikroszatellit régióra tervezett primer közül 17 eredményezett jól azonosítható fragmentumokat. Mindösszesen két primernél nem kaptunk egyáltalán PCR terméket. Öt primernél az alkalmazott elválasztási technikával elérhető felbontási szinten monomorf mintázatot kaptunk. Egy primert azért nem vettünk figyelembe az értékelésnél, mert kettőnél több allélt (komplex mintázat) hozott létre a vizsgált genotípusoknál. Ez valószínűsíthetően abból adódik, hogy az őszibarackkal ellentétben, a kajsziban ez a lókuszt nem egy, hanem két példányban van jelen (14. táblázat).

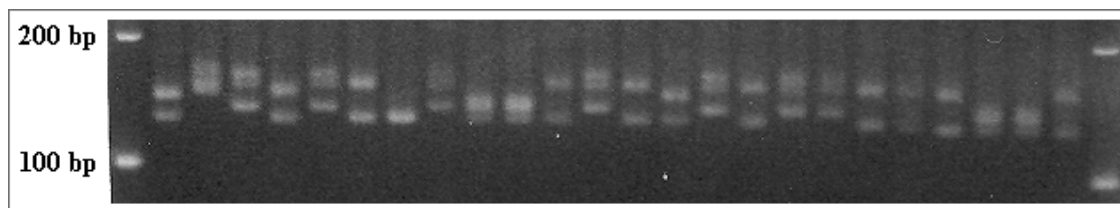
14. táblázat: A kísérletben monomorf vagy értékelhetetlen eredményt adó lókusztok

Lókuszt	Referencia	Primer származás	Várt allél-méret (bp)	Méret-tartomány (bp)	A kísérletből kizárás oka
BPPCT011	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	172	170-180	monomorf
BPPCT029	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	159	150-180	Komplex mintázat
Pchgms12	Wang és mts., 2002	őszibarack	433	460	monomorf
Pchgms14	Wang és mts., 2002	őszibarack	500	500	monomorf
MA006b	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	295	-	Nincs amplifikáció
MA009b	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	132	-	Nincs amplifikáció
MA010a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	122	100-130	monomorf
MA019a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	108	90-110	monomorf
MA030a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	237	230-260	monomorf

A fennmaradó 10 primernél jól azonosítható polimorf fragmentumokat kaptunk olyan elrendezésben, amely megfelel az egylókusztos öröklésmentnek (15. táblázat). A 3% MetaPhor agarózgelen történő futtatás megfelelő felbontást biztosított a fragmentumok könnyű azonosíthatóságára (6. ábra).

15. táblázat: A polimorf lókuszek és jellemzőik

Lókusz	Referencia	Primer származás	Várt allél-méret (bp)	Méret-tartomány (bp)	Allél szám	Heterozigótaság
BPPCT007	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	149	110-180	5	0,87
BPPCT009	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	171	170-210	4	0,19
BPPCT017	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	174	190-210	3	0,54
BPPCT030	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	175	150-180	3	0,64
BPPCT037	Dirlewanger és mts., 2002	őszibarack	155	120-150	3	0,68
Pchgms10	Wang és mts., 2002	őszibarack	198	170-210	3	0,98
Pchgms20	Wang és mts., 2002	őszibarack	252	250-270	2	0,33
MA013a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	211	190-220	3	0,60
MA027a	Yamamoto és mts., 2002	őszibarack	153	120-150	4	0,31
Ac7b	Nem publikált	kajszai	-	160-200	5	0,70

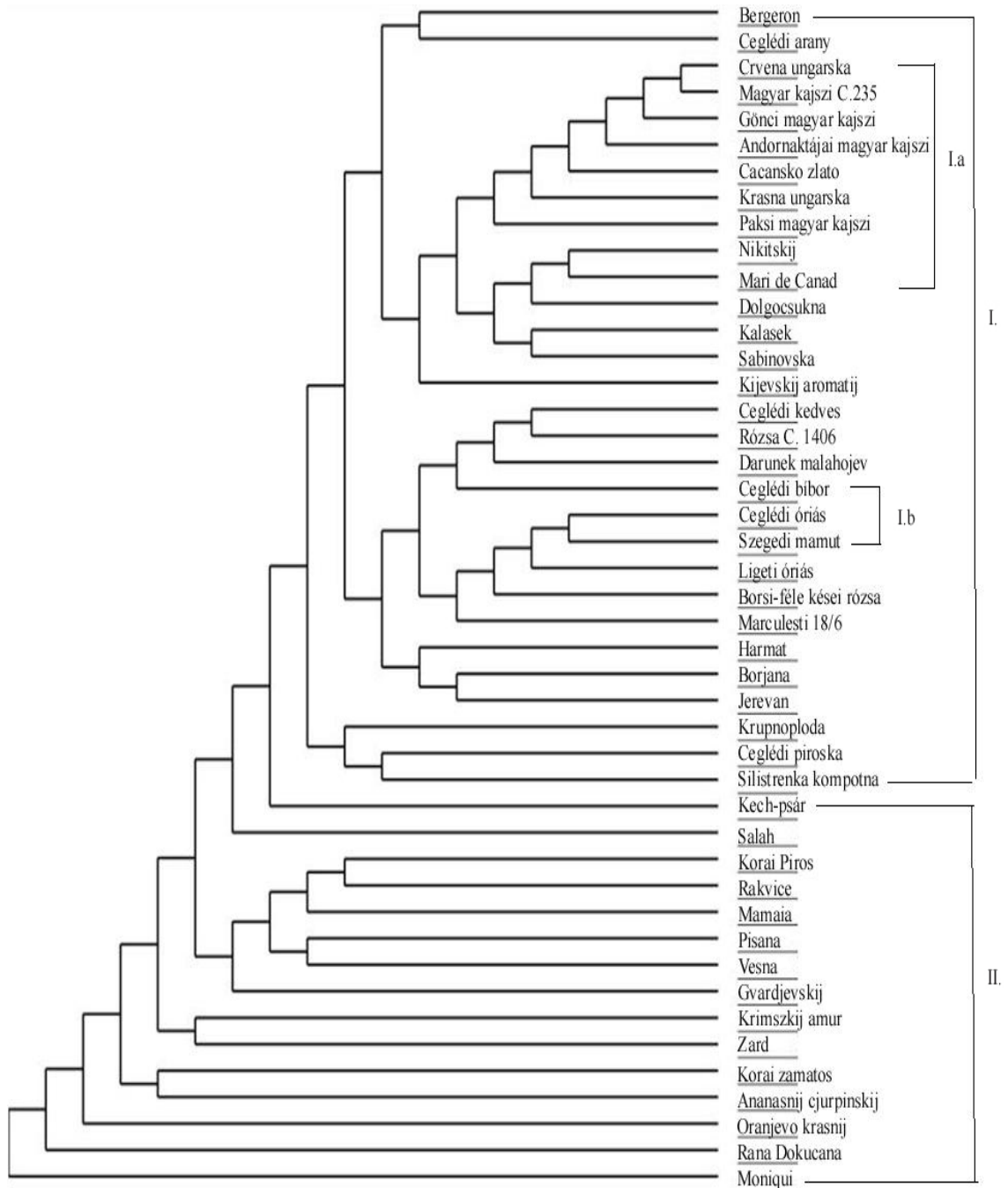


6. ábra: Jól detektálható fragmentumok a 3%-os MetaPhor agaróz használatával a BPPCT007 primerrel, 100 bp méretmarker (Promega) mellett futtatva

A kísérletbe vont 45 fajtánál a 10 primer 35 polimorf allélt hozott létre, lókuszonként 2-5 allél között, mely átlagosan 3,5 polimorf allél/lókusz. A megfigyelt heterozigótaság mértéke relatíve magas, 0,19-0,98 között alakult, mely átlagosan 0,58 a vizsgált lókuszeknél. Olyan ritka allélok is találtunk, amelyek csak néhány fajtában fordultak elő. Például az ‘Ananasznij cjurpinskij’ és a ‘Kecs-psár’, valamint az ‘Ananasznij Cjurpinskij’ és a ‘Korai piros’ olyan közös allélt hordoztak, amely a többi vizsgált fajtában nem fordult elő. A 10 primer használatával néhány vizsgált fajtára egyedi ujjlenyomatot is sikerült készíteni.

A Reynolds-féle hasonlósági indexen (F_{ST}) alapuló UPGMA klaszteranalízissel létrehozott dendrogram a 45 fajtát két fő csoportba és néhány alcsoportba sorolta. A két fő csoportot (I. és II.) többségében ázsiai és nem ázsiai eredetű fajták alkotják. A nem

ázsiai eredetű fajták további alcsoportokra oszthatók. A legnagyobb, és jól körülhatárolható alcsoport (I.a) kilenc, a magyar kajszi fajtakörbe tartozó, magyar és a környező országokból származó fajtákat tartalmazott. A másik nagy alcsoport (I.b) az Óriás kajszi fajtakörbe tartozó fajtákon kívül néhány ceglédi fajtát tartalmazott (7. ábra).



7. ábra: 45 kajszifajta UPGMA analízissel készített dendrogramja 9 őszibarack és 1 kajszi SSR primerekkel végzett vizsgálat alapján

5.5 Kajszi genomokra tervezett SSR régiók variabilitásának elemzése egy széles genetikai bázisú kajszifajta csoporton

Százharminc kajszifajta és három rokon faj genetikai polimorfizmusát vizsgáltuk 10 kajszi genomi DNS alapján tervezett SSR-primer segítségével (16. táblázat). Az összes vizsgált lókuszt polimorf volt. Az allélok méretét kapilláris elektroforézissel működő automata szekvenálókészülék használatával bázispár pontossággal meghatároztuk (8. ábra). A vizsgált lókusztok közül a legnagyobb polimorfizmust az UDAp-407 lókuszt esetében tapasztaltuk, ahol 22 allélt azonosítottunk. Az effektív allélszám is itt volt a legnagyobb (17. táblázat). Ezzel szemben a legkevésbé polimorfnak (7 allél) az ssrPaCITA27 lókuszt bizonyult. Mindent összevetve 133 minta tesztelésével 133 allélt azonosítottunk, ami átlagosan 13,3 allél/lókuszt értéket mutatott (17. táblázat). A lókuszonként megfigyelt heterozigótáság mértéke $H_o=0,8636$ (UDAp-410 lókuszt) és $H_o=0,3182$ (ssrPaCITA27) között változott; az átlag 0,6281 volt (17. táblázat). A megfigyelt heterozigótáság (H_o) minden fajta esetében kisebb volt az elméletileg várt heterozigótáságnál (H_e).

16. táblázat: A vizsgált mikroszatellit primerek jellemzői

Lókuszt	Méret-tartomány (bp)	Annealing (°C)	Ismétlődés típus	Referencia
ssrPaCITA7	186-224	60	(AG) n	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA10	142-212	58	(CT) n	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA19	98-148	60	(TC) n	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA23	112-157	56	(AC) n (AG) n	Lopes és mts., 2002
ssrPaCITA27	224-266	58	(TC) n (TA) n (TG) n	Lopes és mts., 2002
UDAp-407	118-162	58	(TC) n TT (TC) n	Messina és mts., 2004
UDAp-410	116-146	58	(AG) n	Messina és mts., 2004
UDAp-414	150-214	58	(AG) n	Messina és mts., 2004
UDAp-415	139-143	58	(GA) n	Messina és mts., 2004
UDAp-420	154-261	58	(CT) n	Messina és mts., 2004

Az összes egyedben kimutatható 133 különböző allél közül 32 olyan allélt találtunk, amely csak egyszer fordult elő a vizsgált mintákban. Az egyedi allélokat az eltérő ökoföldrajzi csoportokból származó fajtákban vagy rokonfajokban találtuk meg (18. táblázat). Nem amplifikálódó (null-allélokat) 5 fajta három lókusztában találtunk:

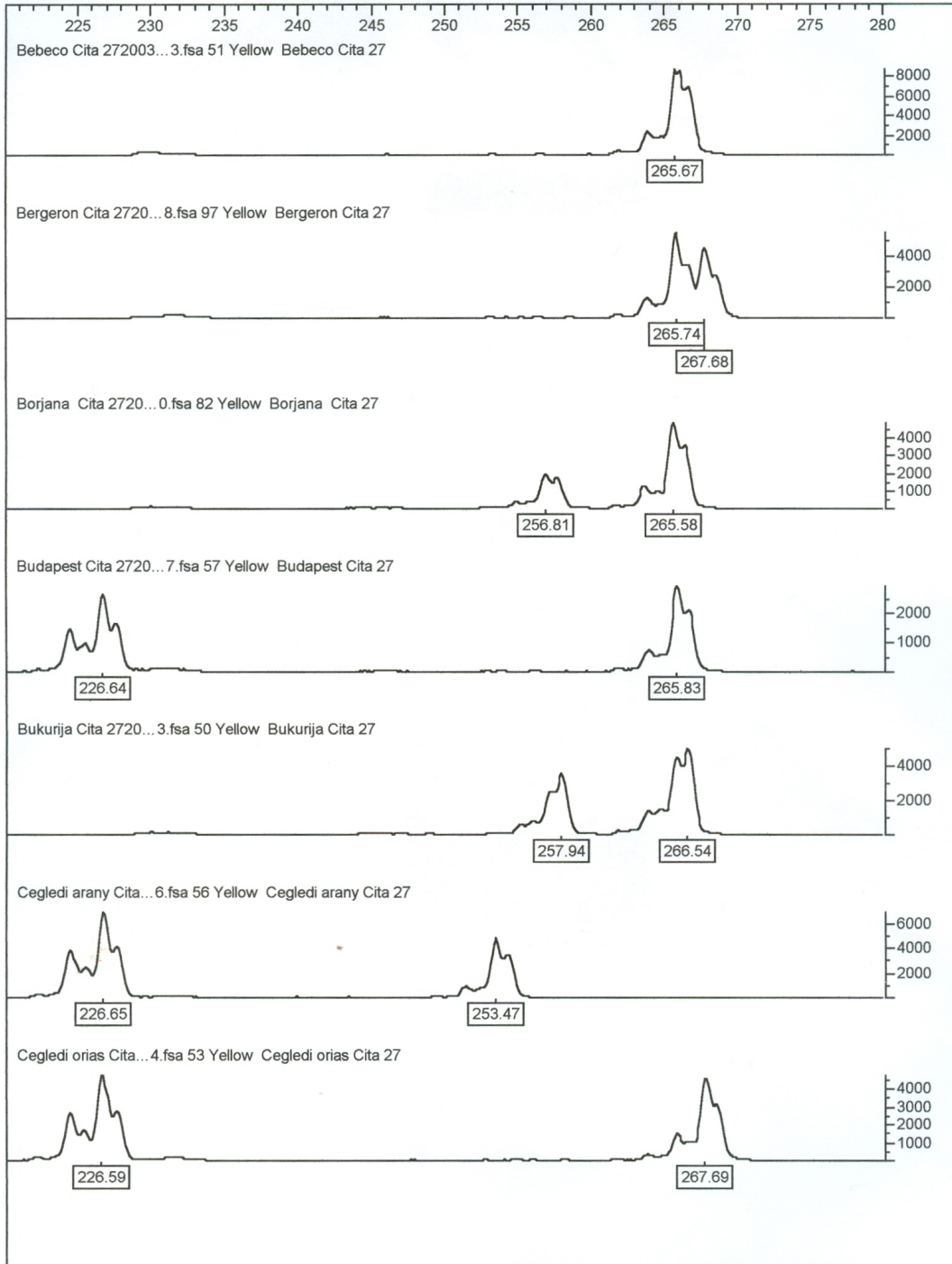
‘Zard’ (ssrPaCITA 27 lókuszból), ‘Uzsgorod’ és ‘Rakovice’ (ssrPaCITA 23 lókuszból) és a ‘Korai kecskemétiben’ (osztrák szelekció) (UDAp-410). Az F_{ST} értékek 0,4544 (ssrPaCITA 7) és 0,7363 (ssrPaCITA 27) között változtak 0,5786-as átlaggal. Az F_{ST} -ből becsült N_m génáramlás mértéke az ssrPaCITA 7 lókuszból 0,3003 volt, ami háromszor magasabb érték, mint az ssrPaCITA 27 lókuszból mért 0,0895 (17. táblázat).

17. táblázat: 10 SSR lókuszból jellemzői a 133 vizsgált fajta alapján

Lókuszból	Kimutatott allélek száma	Effektív allélszám (N_e)	Megfigyelt heterozigótáság (H_o)	Elméletileg várt heterozigótáság (H_e)	Wright-féle beltenyészési koefficiens (F_{ST})	Génáramlás (N_m)
ssrPaCITA7	14	4,2511	0,8346	0,7677	0,4544	0,3002
ssrPaCITA10	17	3,4492	0,5038	0,7128	0,6453	0,1374
ssrPaCITA19	12	3,9001	0,7519	0,7464	0,4944	0,2556
ssrPaCITA23	11	4,2604	0,6031	0,7682	0,6154	0,1562
ssrPaCITA27	7	2,4551	0,3182	0,5949	0,7363	0,0859
UDAp-407	22	6,4712	0,6917	0,8447	0,5909	0,1731
UDAp-410	12	4,6933	0,8636	0,7899	0,4576	0,2963
UDAp-414	14	5,0867	0,4887	0,8064	0,6958	0,1093
UDAp-415	11	3,2244	0,6242	0,6925	0,5477	0,2056
UDAp-420	13	3,1568	0,6015	0,6858	0,5598	0,1966
Átlag	13,3	4,0948	0,6281	0,7413	0,5768	0,1834
Szórás:	4	1,1461	0,1666	0,0725	-	-

18. táblázat: Az egyedi alléleket hordozó fajták

Lókuszból	Fajta
ssrPaCITA10	Arvam aramat, Effekt, Karim Abad 8, Hunza 1, Vesna
ssrPaCITA19	Vesna
ssrPaCITA23	Kijevskij aromatinij, Harcot
ssrPaCITA27	Poldij junskij
ssrPaCITA7	Priana
UDAp-407	Effekt, Jerevan, Kuresia, Junskij, Poldij junskij, Priusadenbnij
UDAp-415	Ananasznij ciurpinszkij, Kec-psar
UDAp-410	Gulkin
UDAp-414	Gulkin, Morden-604, Paszinok
UDAp-420	Ceglédi kedves, Mari de Cenad, Zaposzdojje



For Forensic and Research Use Only

-1-

Not for use in Diagnostic Procedures.

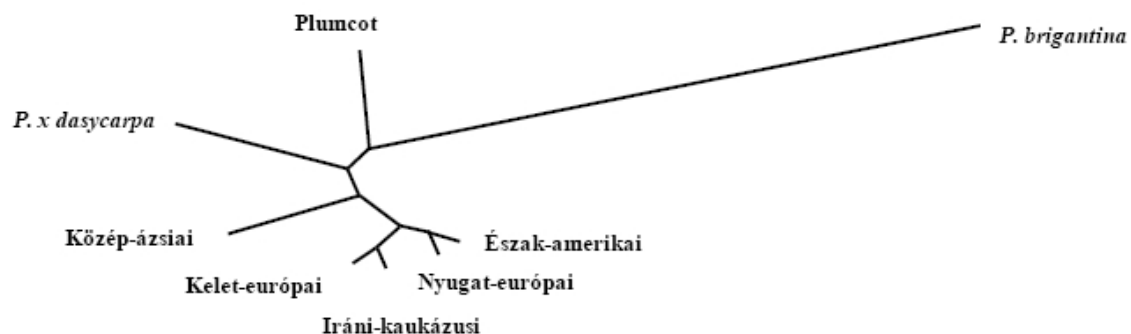
8. ábra: A kapilláris elektroforézissel végzett fragmentumhossz analízis lehetővé tette az allélok bp pontosságú azonosítását

5.5.1 A fajták közötti genetikai kapcsolatok vizsgálata

A kajszi fajták genetikai rokonságának megállapításához egy dendrogramot szerkesztettünk. A dendrogramot a 10 SSR-lókuszt adatai alapján összeállított genetikai távolságmátrixból páronkénti genetikai távolságok alapján UPGMA módszerrel készítettük. A dendrogram a fajtákat két nagy csoportra osztotta (10. ábra). Az 1-es csoportban két alcsoport (1.1 és 1.2) található, amelyek a legtöbb közép-európai fajtát magukba foglalják. Az 1.1 alcsoport 6 európai fajtát és az amerikai 'Goldrich'-ot tartalmazza. Az 1.2 alcsoportba került a legtöbb európai fajta. Ezen a csoporton belül további 4 kelet-európai alcsoport jelenik meg: a Magyar kajszi fajtacsoport; az Óriás kajszi fajtacsoport; a román nemesítési programból származó hibridek; a Rózsabarack típusú fajták és ceglédi hibridek. Külön kiemeltük a 'Salah' ismert vagy feltételezett pedigréjű hibridjeit (10. ábra és 6. táblázat). Az alcsoportokba tartozó fajták kapcsolatát alátámasztják részben morfológiai jellemzőik, részben pedig az ismert pedigrek. Az 1. csoport többi, különböző ökoföldrajzi területekről származó fajtái az 1.3 csoportba kerültek. A 2. csoport csak közép-ázsiai eredetű fajtákat tartalmaz.

5.5.2 Ökoföldrajzi csoportok és a rokon fajok közötti genetikai kapcsolat

Az allélgyakoriságok alapján kiszámítottuk az öt ökoföldrajzi csoport genetikai távolságát és genetikai azonosságát (Nei, 1972). Az eredményeket a 19. táblázatban mutatjuk be. A legkisebb mértékű genetikai azonosságot (43%) a közép-ázsiai és a nyugat-európai csoportok között állapítottuk meg. Ezzel szemben a kelet-európai, a nyugat-európai és az iráni-kaukázusi csoportok genetikailag nagyon hasonlóknak bizonyultak, az azonossági index 79 és 81% közötti értékeket vett fel. A genetikai távolságokon alapuló UPGMA dendrogram két fő csoport elkülönítését eredményezte (10. ábra). Az egyik tartalmazza a közép-ázsiai csoportot, míg a másik két további alcsoportra oszlik. Az egyik alcsoport a nyugat-európai és az észak-amerikai, míg a másik az iráni-kaukázusi és a kelet-európai fajtákat foglalja magába.



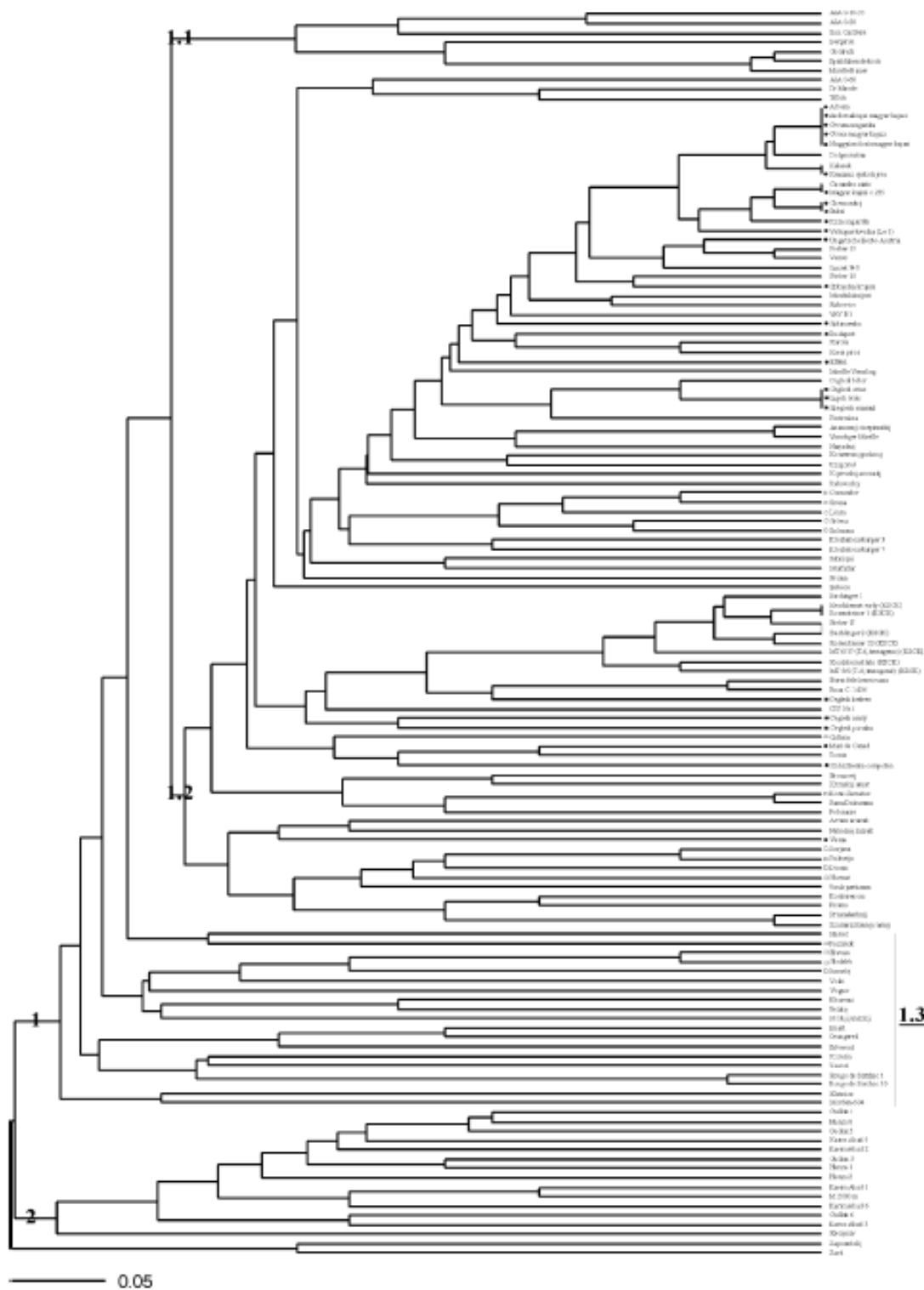
10

9. ábra: A különböző eredetű kajszi fajtacsoportok és a három rokonfaj genetikai távolságai alapján (Nei, 1972) szerkesztett UPGMA dendrogram

A 9. ábra a *P. armeniaca* termesztett fajtái és a rokon fajok közötti genetikai kapcsolatot szemlélteti. A *P. x dasycarpa*, *P. brigantiaca* (syn: *P. brigantina*) és Plumcot távol esnek a közös kajszi csoporttól. A rokonfajok közül *P. brigantiaca* mutatja a legkisebb azonosságot a *P. armeniaca* termesztett fajtáival. A *P. x dasycarpa*, amely egy kajszi \times *P. cerasifera* természetes hibrid átmenetinek bizonyult a kajszi fajták csoportjai és a Plumcot között. Ez utóbbi a kajszi és a *P. salicina* mesterséges hibridje. A genetikai azonosság a *P. brigantiaca* és a kajszi csoportok között általában kismértékű volt (19. táblázat). A *P. brigantiaca* és a közép-ázsiai, valamint az észak-amerikai csoportok közötti genetikai azonosság értéke nem haladta meg a 10%-ot.

19. táblázat: Genetikai azonosság és különbség az 5 kajszi öko földrajzi csoport és a 3 rokonfaj között

	Nyugat-európai	Észak-amerikai	Közép-ázsiai	Iráni-kaukázusi	Kelet-európai	<i>P. x dasycarpa</i>	Plumcot	<i>P. brigantiaca</i>
Nyugat-európai	-	0,7653	0,4391	0,6606	0,7982	0,6156	0,4716	0,1572
Észak-amerikai	0,2674	-	0,5092	0,6188	0,6510	0,5001	0,2936	0,0979
Közép-ázsiai	0,8231	0,6749	-	0,5712	0,4568	0,2362	0,2148	0,0967
Iráni-kaukázusi	0,4146	0,4800	0,5601	-	0,8239	0,3738	0,4252	0,1595
Kelet-európai	0,2254	0,4292	0,7834	0,1937	-	0,4653	0,5664	0,2206
<i>P. x dasycarpa</i>	0,4852	0,6930	1,4430	0,9839	0,7651	-	0,2224	0,1112
Plumcot	0,7517	1,2254	1,5380	0,8552	0,5685	1,534	-	0,2143
<i>P. brigantiaca</i>	1,8503	2,3240	2,3365	1,8360	1,5115	2,1965	1,5404	-



10. ábra: 133 kajszifajta közötti genetikai távolság alapján szerkesztett UPGMA dendrogram

6 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1 DNS-kivonási eljárás adaptálása kajszira

A tiszta, ép és jó minőségű DNS-izolálása szinte minden növénygenetikai vizsgálat alapját képezi, hiszen számos olyan anyagot tartalmazhat a növényi szövet, ami akadályozhatja a DNS vizsgálatát. Ez különösen igaz a legtöbb magasabb rendű növényfajra, ahol poliszaharidok, polifenolok, különböző pigmentek, illetve egyéb másodlagos anyagcseretermékek alkalmatlanná tehetik a DNS felhasználását (Wen és Deng, 2002). A másodlagos anyagcseretermékek, amelyek a gyümölcsfák szinte minden szövetében gazdagon jelen vannak, a klasszikus extrakciós eljárásokkal nehezen tisztíthatók (Qiang és mts., 2004).

Munkánk során az első lépés a DNS-izoláláshoz legmegfelelőbb növényanyag kiválasztása volt. A különböző időpontokban gyűjtött levelek tesztelése során, azt tapasztaltuk, hogy a tavaszi rügpattanás után szedett minták feldolgozása adta a legjobb DNS-minőséget, hiszen ekkor a levélszövet még kevésbé tartalmaz polifenolokat, ami a munkafolyamatot jelentősen megnehezíti. Ezt a megállapítást több szerző is megerősítette a fás- és lágyszárú növények DNS-extrakciós eljárásainak tökéletesítése során (Porebski és mts., 1997; Li és mts. 2002). A –80 fokon hosszabb ideig tárolt leveleket is alkalmasnak találtuk, azonban jobb minőségű és nagyobb mennyiségű DNS-t kaptunk, ha a mintákat a szedést követően egyből feldolgoztuk.

A kutatás idején fellelhető DNS-kivonási eljárásokat több szempontból is megvizsgáltuk. Az eredmény szempontjából legfontosabb kritérium a nyert DNS PCR reakcióhoz való alkalmassága volt. Ezen kívül olyan módszert kerestünk, amely alkalmas nagy mintaszám gyors és rutinszerű feldolgozására, és minél kevesebb környezetre, valamint egészségre káros vegyszer használatával, egyszerűen kivitelezhető.

A kutatás kezdetekor elsőként kipróbált eljárás az (amerikai) bab módszer volt (M2. melléklet). Az inkubációs idők növelésével, illetve az alkoholos kicsapási műveletek többszöri ismétlésével lehetett a módszer hatékonyságát leginkább növelni. Az eljárást eredetileg bab növényre dolgozták ki, és nem a kajszi durvább szövetű, a DNS-izolálást jelentősen megnehezítő anyagokat nagy mennyiségben tartalmazó levelére. Ebből adódóan többszöri ismétlésekkel lehetett csak a kívánt eredményt elérni. A plusz lépések bevezetése azonban még tovább növelte az amúgy is hosszú művelet

idejét. Noha sikerült jó minőségű DNS-t nyernünk, a módszert időigényessége és nehézkessége miatt a továbbiakban nem alkalmaztuk.

A következő módszer, amit vizsgáltunk, egy fás növények körére kidolgozott CTAB alapú eljárás volt (M2. melléklet) (Cheng és mts., 1997). A kísérlet során kezdetben rossz minőségű, töredezett DNS-t kaptunk, amely alkalmatlan volt a PCR reakcióhoz. A módszer optimalizálása során lecsökkentettük a centrifugálás sebességét, alacsonyabb inkubációs hőmérsékletet alkalmaztunk, illetve általában megpróbáltuk csökkenteni azoknak a lépéseknek a számát, ahol a DNS durva fizikai hatásnak van kitéve (rázás, ütögetés stb.). Sikerült így egy gyors, olcsó, rutinszerűen elvégezhető eljáráshoz jutnunk, ahol a DNS minősége is kielégítő. A módszer hátrányát a kivitelezéséhez használt nagy mennyiségű egészségre káros vegyszer használata jelentette. Az extrakciós pufferhez használt CTAB por alakban légzőszervi megbetegedést idézhet elő. A DNS további tisztításához használt kloroform az idegrendszert károsító anyag, a fenol pedig rákkeltő hatású. Ezért megpróbáltunk olyan módszert találni, amely hasonló hatékonyságú, de emellett kevésbé veszélyes a felhasználóra és a környezetünkre nézve.

A későbbi vizsgálataink során rátaláltunk a Qiagen cég által kifejlesztett DNeasy Plant Mini Kitre (M2. melléklet). Az SSR markerekkel végzett kutatásokhoz szinte kizárólag ezt a technikát alkalmaztuk a DNS izolálásához. Ez a módszer egy teljesen zárt rendszer, a használt oldatok biztonságosak, az eljárás rövid idő alatt könnyen elsajátítható. Amellett, hogy egészségi szempontból semmiféle veszéllyel nem jár, lehetővé teszi, hogy megfelelő minőségű és mennyiségű genomi DNS-hez jussunk munkánk során. A módszer egyedüli hátrányát a szükséges vegyszerek és eszközök magas költsége jelenti, de ezt teljes mértékben kompenzálják az említett előnyös tulajdonságai.

6.2 A Magyarországon legnagyobb területen termesztett fajták azonosítása és egyedi DNS-ujjlenyomat készítése RAPD és SSR markerekkel

6.2.1 Jellemzés RAPD markerekkel

Az Operon cég által szintetizált RAPD primereket széles körben és nagy hatékonysággal használják a *Prunus* genotípusok jellemzésére. A nemzetségen belül az egyes sorozatok eltérő hatékonysággal működtek. Őszbarackban leginkább az E, M (Raddova és mts., 2003), cseresznyében a B, G (Lisek és mts., 2006), mandulában a M, S (Resta és mts., 1998), míg kajsziban a B, C primer sorozatok (Hurtado és mts., 1999) eredményezték a legnagyobb polimorfizmust. Az alapos tesztelést követően kiválasztott nyolc primer amplifikációja a vizsgált 16 fajtában összesen huszónhét fragmentumot eredményezett, melyből 14 (53%) volt polimorf. A polimorf fragmentumok aránya megegyezik a Hurtado és mts. (1999) által korábban közöltekkel, akik 18 kajszifajta vizsgálatokor 22 RAPD marker felhasználásával 45 polimorf markert azonosítottak. Több olyan markert is találtunk, amely csak egy vagy két fajtában fordult elő, OPC 15 1000 csak a 'Harmatra' volt jellemző, míg az OPC 20 1100 csak a 'Ceglédi Piroska' és a 'Harcot' fajtákban volt fellelhető. A két fajta származása ismert, de nem található a szülők között közös fajta. A jelenségre esetleg az adhat magyarázatot, hogy a legtöbb észak-amerikai fajta európai genetikai alapokra vezethető vissza. Az OPC 14-700 egyedül a Kertészeti Egyetem Növénynemesítés Tanszéke által nemesített 'Korai Zamos' és 'Harmat' fajtákon jelent meg. Annak ellenére, hogy a két fajta egyik szülője sem azonos, több hasonló tulajdonsággal rendelkeznek (korai érés, önmeddőség), valamint a szülőnövények az örmény fajtakör tagjai közül kerülhettek ki, ami magyarázatot adhat a közös fragmentumra.

A polimorf fragmentumokat felhasználva a vizsgált kajszifajták többségét sikerült egyértelműen megkülönböztetni, és egyedi DNS ujjlenyomatot készíteni. A két magyar kajsziklón 'Gönci magyar kajszik' és 'Magyar kajszik C.235' esetében ugyanazt a mintázatot kaptuk. Vélhetően azért, mert a klónok közti genetikai különbség olyan csekély, hogy a RAPD markerek nem alkalmasak az elkülönítésükre.

Az úgynevezett Óriás kajszik fajtakörön ('Szegedi mamut', 'Ligeti óriás', 'Ceglédi óriás') belül sem tudtunk különbséget tenni. Ez alátámasztja azt a mostanában kialakult feltételezést, hogy a 'Szegedi mamut' és a 'Ceglédi óriás' fajtakeveredés

következményeként tulajdonképpen ugyanaz a fajta, és szinonim elnevezésnek tekinthető. A 'Ligeti óriás' és a 'Ceglédi óriás' fajták között pedig nincsenek morfológiai különbségek, csak néhány pomológia eltérés (pl. érésidő), így vélhetően a genetikai állományukat tekintve is nagyon hasonlóak (Mády és Szalay, 2003).

A vizsgálat alapján elmondható, hogy a viszonylag kevés RAPD primer felhasználásával sikerült a fajtákat megkülönböztetni egymástól. Ennek alapján a RAPD markerek alkalmasak lehetnek nemcsak tudományos célokra, hanem a kereskedelmi tételek azonosítására, illetve fajtaelismerési célokra egyaránt (Hurtado és mts., 1999).

Ez irányú törekvésünket bizonyítja, hogy a vizsgálati eredményeinket, mint a hazánkban termesztett fajták meghatározására alkalmas módszert, az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet Kertészeti Szaporítóanyagok Osztálya egy szerződés keretében fajtaazonosítási célra használja tovább. A szerződés értelmében az OMMI részére bocsátottuk a munka teljes irodalmi háttérét, ami e tárgykörből korábban megjelent publikációk összességét, illetve a fentiekben közölt, a konkrét vizsgálatra kidolgozott módszer leírását jelenti. Ezek ismeretében a munka rutinszerűen végezhető, illetve az irodalmi háttér ismeretében későbbi, esetlegesen felmerülő problémák is korrigálhatók.

A reakció igen érzékeny a környezeti feltételekre (vegyszer, eszközök, labor körülmények). Ezért közöltük az általunk felhasznált vegyszerek pontos listáját (termék neve, gyártó, gyártási szám) és az összes laboratóriumi eszközt, felszerelést, amely tételek beszerzése a vizsgálat elvégzését sikeressé teszi.

A megbízó laboratóriumában beprogramoztuk a PCR-készüléket az általunk e vizsgálatra kidolgozott programmal. A kísérletet a kajszifajta DNS-ének kivonásától az eredmények detektálásáig, a laborszemélyzet jelenlétében többször sikeresen megismételtük.

A kísérletek elvégzését követően ígéretesnek tűnt, hogy a fajtaelismerés során, a DUS vizsgálatok elvégzésekor szerepet kapnak majd a molekuláris markerek is. A megfelelő referenciagyűjtemények fenntartása rendkívül költséges feladat. Kézenfekvő és költséghatékony megoldás lenne ezeket a gyűjteményeket legalább részben molekuláris markerekkel leváltani. Eddig konkrét előrelépés nem történt a területen. A fajtaelismerési metodikák ma még kizárólag morfológiai markerekre épülnek. A

fajtaregisztrációs költségek csökkentése azonban egyre nagyobb kényszer, ezért a közeljövőben várható, hogy elkezdődik a molekuláris markerek használata is.

Ez a munka Magyarországon több éven keresztül egyedülálló törekvést jelentett a molekuláris gyümölcsnemesítés és a nemesítési alapanyagok körültekintő, genetikai kapcsolatokat feltáró értékelése felé.

Noha a RAPD markerekkel végzett vizsgálatok az utóbbi időben háttérbe szorultak, és más technikák is elérhetővé váltak, nem tűnt el végérvényesen. Építve a korábbi évek tapasztalataira, és megismerve a módszer korlátait ma leginkább kis egyedszámú fajtacsoportok, valamint egyes kapcsolt tulajdonságok jellemzésére használják elsősorban a *Prunus* nemzetségben (Raddova és mts., 2003; Lisek és mts., 2006). Ezekben az esetekben a RAPD markerek olcsó, gyors és a célnak megfelelő megoldást jelentenek.

6.2.2 Jellemzés SSR markerekkel

A primer szekvenciák publikálása előtt nekünk volt először lehetőségünk kajszifajtákból izolált mikroszatellit markereket alkalmazni. Kézenfekvőnek tűnt a választás, hogy a korábban már RAPD markeres jellemzésnek alávetett fajtacsoporttal kezdjük az új primerek tesztelését. Az eredmények messze felülmúlták a korábbi publikációkon alapuló várakozásainkat. Az elért, átlagosan 7 allél/lókuszt érték jóval magasabb, mint a korábban publikált lókuszonként 3-4 allél szám (Badenes és mts., 2002; Hormaza 2002). Egyedül Zebentyayeva és mts., (2004) értek el hasonló polimorfizmust, de jóval több - 74 féle, genetikai hátterét tekintve igen eltérő-genotípus felhasználásával. A legtöbb egyedi allélt, szám szerint ötöt, a Kertészeti Egyetem Növénynemesítési Tanszéke által nemesített 'Korai Zamos' és 'Harmat' fajták hordozták. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen ezek az új nemesítésű anyagok genetikai hátterüket és egyes tulajdonságaikat (pl. érésidő) tekintve jelentősen eltérnek a hazánkban termesztett honos, több évtizede termesztésben lévő fajtáktól.

A mikroszatellit markerek alkalmazásával kapott eredményeink egyértelműen alátámasztották a korábban RAPD markerek által nyert eredményeinket. A morfológiai és RAPD markerekkel történő kutatások alapján felállított hipotézis, miszerint a 'Szegedi mamut', 'Ceglédi óriás', és 'Ligeti óriás' fajták azonos genetikai háttérrel rendelkeznek, az általunk vizsgált mikroszatellit lókusztok esetében is megerősítést

nyert, mivel a kapott allélok mind az öt vizsgált lókuszt esetében azonosak voltak. Emellett a 'Gönci magyar kajsz' és 'Magyar kajsz C.235' fajta klónok között sem találtunk különbséget.

6.3 Őszibarack SSR primerek használata 45 kajszigenotípus jellemzésére

6.3.1 A felhasznált primerek alkalmassága és a polimorfizmus jellemzői

A különböző *Prunus* fajok mikroszatellit régióit határoló szekvenciák konzervativizmusa lehetővé tette számunkra, hogy őszibarack primereket használjunk a kajsz genetikai sokféleségének tanulmányozására (Tautz, 1989; Bell és Ecker, 1994; Guilford és mts., 1997; Sosinski és mts., 2000). Már az első őszibarack genomi DNS-re kidolgozott SSR-markerekről is bebizonyosodott, hogy néhány más *Prunus* faj esetében is felhasználhatók (Cipriani és mts., 1999; Sosinski és mts., 2000; Testolin és mts., 2000; Aranzana és mts., 2002; Hormaza, 2002; Dirlewanger és mts., 2002). A fenti közlemények közül csak Hormaza (2002) számolt be kajszifajták vizsgálatáról. A tapasztalatokat fel tudtuk használni a kajsz genetikai variabilitásának tanulmányozására őszibarackra tervezett primerek (Dirlewanger és mts., 2002; Wang és mts., 2002; Yamamoto és mts., 2002) alkalmazásával. Fontos megjegyezni, hogy a kiválasztott primerek közül korábban csak négyet használtak kajszifajták genetikai analíziséhez. A felhasznált őszibarack primerek 90%-ban alkalmasak voltak mikroszatellit lókusztok azonosításra, mely jól bizonyítja a módszer alkalmazhatóságát. Ez még akkor is igaz, ha egy részüknél monomorf mintázatot kaptunk. Ennek alapján az is megállapítható, hogy nem feltétlenül szükséges minden *Prunus* fajra külön mikroszatellit markereket kifejleszteni, ami igen időigényes és költséges folyamat.

Az átlagos polimorfizmus mértéke 3,5 allél/lókuszt volt, hasonló a Badenes és mts. (2002) 3,1, Sánchez-Pérez és mts. (2005) 3,9, valamint Hormaza (2002) 4,1 kajsz mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálataikhoz azonban lényegesen alacsonyabb Zebentyayeva és mts., (2003) által elért eredménynél, ahol ugyanez a mérték 7,6 volt. Az amplifikációs fragmentumok hossza hasonló tartományba esett, mint az őszibarackban található azonos mikroszatellitek. A 19 primerből mindösszesen négyet próbáltak ki kajsziban. A kapott fragmentumhosszak ezekben az esetekben is

megegyeztek a korábban már publikált kísérletekkel (Zhebentyayeva és mts., 2003; Sánchez-Pérez és mts., 2005).

A lókuszonkénti nagy allélszám (3,5) megerősítette, hogy a mikroszatellit markerek nagyon hasznos eszközei a kajszai fajtaazonosításának. Az allélszám nagyobb, mint az egyéb molekuláris markerekkel végzett korábbi vizsgálatoknál, mint az izoenzimek (Badenes és mts., 1996), RFLP (de Vicente és mts., 1998) vagy akár a Hurtado és mts. (1999) RAPD kísérlete, ahol az átlagos lókuszonkénti allélszám csak kettő volt.

6.3.2 A vizsgált fajták genetikai kapcsolatának elemzése

A kapott DNS-ujjlenyomat és dendrogram a felhasznált elválasztási technika alacsony felbontó képessége miatt távolról sem teljes. Ennek ellenére számos érdekes megállapítás tehető. A magyar kajszai fajtacsoport számos különböző módon elnevezett fajtákat tartalmaz. A fajták egy része Magyarországon jól ismert árufajta és tájfajta. Ezenkívül számos szomszédos ország rendelkezik olyan fajtaival, amit magyar kajsziként ismernek és termesztnek. A fajták egy része nem tudatos nemesítői munka eredménye, ezért a származásuk sem pontosan ismert. Mivel nem sikerült különbséget találni a fajták között, megerősítést nyert az előzetes feltételezésünk, hogy hasonló a genetikai hátterük.

A csoporthoz egyik legközelebb található fajta a 'Bergeron'. Ez a megfigyelés megegyezik Hormaza (2002) SSR markerekkel végzett kísérletének eredményével, melyben a 'Gönci magyar kajszit' a 'Bergeront' is tartalmazó francia fajtacsoportban helyezte el.

Az Óriás kajszai fajtacsoportba tartozó három fajta a 'Ceglédi óriás', a 'Ligeti óriás' és a 'Szegedi mamut' nagyon hasonló pomológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, de korábban különböző genotípusonként tartották őket számon. A RAPD és SSR markerekkel végzett kutatások azzal az eredménnyel zárultak, hogy a három fajtának valószínűleg azonos a genetikai háttere. A kísérletben felhasznált őszibarack mikroszatellit primerekkel sem sikerült különbséget tenni a vizsgált óriás kajszik között.

6.3.3 A felhasznált elválasztási technika jellemzői

A MetaPhor agarózzal történő gélelektroforézis alkalmas a mikroszatellitek azonosítására. Összehasonlítva a poliakrilamid gélen történő futtatással, vagy pedig az automata fragmentumhossz analízissel, messze a legegyszerűbb és legolcsóbb módszer. Különösen jó felbontás érhető el a 100-200 bp mérettartományban. Az egyik legnagyobb előnye a módszernek, hogy könnyen adaptálható olyan gyakorlati területekre, mint például a faiskolák, illetve kertészeti árudák, ahol a fajtaazonos szaporítóanyag kulcskérdés. A módszer használata semmiképpen sem egyedi, a szakirodalmi adatok alapján a vizsgálati cél és a lehetőség dönti el, hogy az egyes esetekben melyik módszert alkalmazták (20. táblázat)

Az természetesen nyilvánvaló, hogy egy automata detektációs rendszer, mely alkalmas az egyes fragmentumok hosszának akár egynukleotid eltérését is jelezni, nagyobb allél variabilitást képes kimutatni, mint az agaróz gél. Következésképpen az allélok száma várhatóan magasabb lett volna annál, mint amit a jelen eredmények mutatnak. Egy magasabb felbontóképességű rendszerben az a 6 primer, amely monomorf mintázatot mutatott, lehet, hogy polimorf fragmentumokat eredményezett volna, mely segítségével a vizsgált fajták még pontosabban elkülöníthetők lettek volna.

20. táblázat: Mikroszatellit lókuszok detektálására alkalmazott módszerek a *Prunus* nemzetségben

Fajok	Poliakrilamid gél	Metaphor® agaróz	ABI® szekvenátor
Őszibarack	Aranzana és mts., 2002; Georgi és mts., 2002; Sosinski és mts., 2000; Testolin és mts., 2000 Cipriani és mts., 1999; Dirlewanger és mts., 2002; Bliss és mts., 2002; Martínez-Gómez és mts., 2003a	Cipriani és mts., 1999; Dettori és mts., 2001; Martínez-Gómez és mts., 2003a	Aranzana és mts., 2003a; Wang és mts., 2002; Yamamoto és mts., 2002; Etienne és mts., 2002
Mandula	Joobeur és mts., 2000; Bliss és mts., 2002; Martínez-Gómez és mts., 2003	Martínez-Gómez és mts., 2003a	
Kajszi	Zhebentyayeva és mts., 2003 Hurtado és mts., 2002b; Vilanova és mts., 2003; Decroocq és mts., 2003	Hormaza, 2002; Sánchez-Pérez és mts., 2005; Romero és mts., 2006; Ruthner és mts., 2006	Decroocq és mts., 2003, Zhebentyayeva és mts., 2004; Maghuly és mts., 2006
Cseresznye/ meggy	Downey és Lezzoni, 2000; Aranzana és mts., 2002; Schueler és mts., 2003 Cantini és mts., 2001; Dirlewanger és mts., 2002; Struss és mts., 2003	Wünsch és Hormaza, 2002a	
Egyéb Prunus fajok	Cipriani és mts., 1999 Decroocq és mts., 2003; Martínez-Gómez és mts., 2003b	Serrano és mts., 2002; Martínez-Gómez és mts., 2003b	

6.4 Kajszi SSR markerekkel vizsgált 136 genotípus azonosítása és genetikai kapcsolatuk, származásuk elemzése

6.4.1 A felhasznált primerek alkalmazása és a polimorfizmus jellemzői

Mint ahogyan az előző vizsgálatból is kiderült, a mikroszatellitek evolúciósan rögzült szekvenciák, ezért az egy fajból fejlesztett primerek hatékonyak lehetnek más rokon, de akár nem rokon fajtákban is. A *Prunus* nemzetségben főként az elsőként kifejlesztett őszibarack primerek használata volt a jellemző. Az a felvetés is hamar napvilágot látott, hogy a nagyobb genetikai távolság rendszerint csökkenti a primerek amplifikációs képességét, valamint a polimorfizmus mértékét. A nagyobb genetikai távolsággal fokozatosan rövidül a mikroszatellitek hossza is (Steinkellner és mts., 1997; Hormaza, 2002). Továbbá a „null” allélok gyakorisága is megnövekszik, köszönhetően annak, hogy a primerek hibás bekötődésre való hajlandósága egyre nagyobb (Ciofi és mts., 1998).

A kutatás eredményei bizonyítják, hogy a nagy polimorfizmussal bíró homológ mikroszatellit markerek kiváló eszközei a kajszi fajtaazonosítás célú vizsgálatainak. Az átlagos lókuszonkénti allélszám 13,3 volt, amely lényegesen nagyobb mint a 4,1 érték, amit Hormaza (2002) talált 48 fajta 19 polimorf SSR markerrel végzett vizsgálatában, 7,64, amit Zebentyayeva és mts. (2003) azonosított 74 genotípus és 14 markerrel, vagy 3,1, amiről Romero és mts. (2003) számoltak be, amikor 40 kajszifajtát jellemeztek 16 mikroszatellit markerrel. Az összes korábbi tanulmányban azonban a kajszifajták diverzitásának megállapításához őszibarackból izolált és tervezett SSR primereket használtak. A vizsgálatunkban elért magas lókuszonkénti allélszám elsősorban annak volt köszönhető, hogy a korábbiaknál jóval több genotípust vizsgálunk, valamint először használtuk tíz - részben Ruthner és mts. (2003) által már előzetesen tesztelt - kajszi izolt SSR primert (Lopes és mts., 2002; Messina és mts., 2004). A vizsgálatokban megfigyelt 10 lókuszt átlagos heterozigótasága $H_o=0,6281$ volt, ami magasabb, mint a Zebentyayeva és mts. (2003) és Romero és mts. (2006) által őszibarack primerekkel megállapított értékek (az előbbi esetben 0,517, az utóbbi vizsgálatnál 0,320). A nagy allélszám és a nagy heterozigótaság különösen alkalmassá teszi az SSR-markereket a genotípusok egyedi genetikai profiljainak leírására. Az F_{ST} -értéket a populációgenetikában a heterozigótaság (variabilitás) részpopulációkban és egész populációban való eloszlásarányának kifejezésére használják. Wright-nak megfelelően a 0,25 fölötti F_{ST} -értékek nagyon nagy genetikai differenciálódást mutatnak (Hartl és Clark, 1997). Mivel az általunk vizsgált mintákban az F_{ST} -értékek átlaga 0,5768 (17. táblázat) volt, megállapítható, hogy a fajták között relatíve nagy a genetikai különbözőség. A vizsgálatainkban megállapított magas F_{ST} -értékek a fajták közötti nagy variabilitásra utalnak, amelynek kialakulása a kismértékű génáramlással magyarázható. Erre utalnak a 17. táblázatban bemutatott N_m értékek is. Az vizsgált lókusztok átlagos génáramlási (N_m) értéke 0,1834 volt, ami rendkívül kis érték. Ha az $N_m < 1$ értéket vesz fel már kis génáramlásról beszélhetünk.

A legtöbb gyümölcstermő növény különbözik a vadontermő ősétől, ahol a keresztbeporzást az önmeddőség fenntartja. A gyümölcsfáknál a domesztikáció általában azt jelenti, hogy megváltoztatjuk a szaporodási mechanizmust, a generatív szaporodást igyekszünk a vegetatív úton történő szaporítással leváltani. Míg Közép-Ázsiában a fajták házasítása természetes környezetben, a természetes populációban

folyt, és lehetőség volt vad és „félvad” típusok folyamatos interakciójára, addig Európában, a vegetatív szaporítás bevezetése, és néhány fajtára szűkített nemesítési alapanyag használata, jelentősen szűkítette a fajták genetikai variabilitását. Közép-Ázsiában a kajszi természetes élőhelyén, ahol ez még evolúciós előny, a fajták zömmel önmeddőek, míg az európai fajták többsége öntermékenyülő, megfelelően az árutermesztési céloknak. Az öntermékenyülés a vegetatív szaporítás mellett tovább csökkentette a fajták genetikai variabilitását. Az ivaros úton szaporodó fajok populációinak jellemzésére használt mutatók, a vegetatív szaporítású természetett gyümölcsfajták értékelésére csak korlátozott mértékben használhatók fel. Ugyanakkor nem tekinthetünk el attól, hogy a jelenlegi fajtacsoportok magukban hordozzák a természetes ősi populációkra jellemző, kimutatható és bizonyos mértékben módosuló allélvariabilitást.

Ezek az eredmények a részben fixált genotípusú fajták egymás közötti különbözőségének fokára utalnak, és nem adnak információt – az itt nehezen értelmezhető – egész populációra nézve.

6.4.2 A kajszi genetikai változékonysága és fajták közötti genetikai kapcsolatok

Az UPGMA klaszterelemzés alapján készült dendrogram számos csoportot hozott létre, amelyek összefüggésben vannak az ezeket alkotó fajták pedigréjével, illetve a genotípusok földrajzi eredetével. A vizsgált európai fajták legtöbbje az 1.2 alcsoportba tartozik. Közép- és Kelet-Európában – elsősorban a Kárpát-medencében – elterjedt egy sor nagy gyümölcsű és édes magvú fajta, amely az öntermékenyülő Magyar kajszi fajtacsoportba tartozik. A nemesítés során ezeknek a fajtáknak számos hibridjét is létrehozták. Az egy csoportba tartozó klónok különböző elnevezései – legalább néhány esetben – valószínűleg szinonimák. A mikroszatellit régiók variabilitásának adatai alapján megállapítható, hogy feltételezéseink szerint 18 ebbe a csoportba tartozó fajta közül 15 szoros rokonságban van, és közülük 5 (‘Albena’, ‘Andornaktályai magyar kajszi’, ‘Crvena ugarska’, ‘Gönci magyar kajszi’ és ‘Nagygyümölcsű magyar kajszi’) esetben az eltérő elnevezések mögött azonos genotípus jelenléte is lehetséges (10. ábra). Három fajta (‘Mari de Cenad’, ‘Szilisztrenka kompotna’ és ‘Vesna’) klasztere igen messze esett a csoport többi tagjától, ami talán abból adódott, hogy mind a három

esetben hibridekről van szó, illetve a begyűjtés során ejtett hibát sem lehet teljes mértékben kizárni.

Világosan elkülönül a magyar óriás kajszifajták csoportja. Az ide tartozó ‘Ceglédi óriás,’ ‘Szegedi mamut’ és ‘Ligeti óriás’ fajták teljes azonosságot mutatnak. A korábbi RAPD illetve őszibarack SSR-el végzett elemzés is azonos eredménnyel zárult e fajták esetében (Pedryc és mts., 2002; Ruthner és mts., 2003; Ruthner és mts., 2006). A ‘Ceglédi óriás’ és a ‘Szegedi mamut’ szinonim elnevezések. A ‘Ligeti óriás’ viszont kevés pomológiai bélyegben (pl. érésidő) különbözik a ‘Ceglédi óriástól’ (Mády és Szalay, 2003). A ceglédi nemesítésű fajták jellegzetes klasztert alkotnak. Mind a három vizsgált fajta pedigréjében szerepel a ‘Ceglédi óriás’, de ennek ellenére viszonylag távol esnek ettől a fajtától. Feltűnő viszont a Rózsabarackokhoz való közelség. A ‘Ceglédi arany’ (‘Rózsabarack C.1668’ × ‘Ceglédi óriás’) esetében ez a fajta eredetével magyarázható, de ez lehet a magyarázat a ‘Ceglédi kedves’ esetében is, amely a ‘Ceglédi óriás’ szabad megporzásából jött létre (Mady és Szalay, 2003).

A bukaresti Agronómiai Kutató Intézet nemesítési programjából származó ‘Comandor’, ‘Sirena’, ‘Litoral’, ‘Selena’ és ‘Sulmona’ fajták az ‘Umberto’, ‘Ananas’ és ‘Luizet’ fajták keresztezéséből jöttek létre, és ennek megfelelően a dendrogramon mind egy klaszterbe kerültek. Érdekes módon a francia ‘Luizet’ fajta a ‘Magyar kajsz’ fajtacsoporttal egy klaszterbe került. A ‘Magyar kajsz’ feltételezett helyéről a ‘Luizet’ pedigréjében már korábbi közleményekből is tudomást lehetett szerezni (Faust és mts., 1998; Hormaza, 2002). A tanulmányunkban az SSR-variabilitás alapján kimutatott fajtakapcsolatokat korábbi erre vonatkozó információk is megerősítették. A Hormaza (2002) által közölt dendrogramon a ‘Bergeron’, ‘Gönci magyar kajsz’ és ‘Luizet’ szorosan egymás mellett foglaltak helyet, egy klaszterben. Geuna és mts. (2003) az AFLP-markerekkel kapott eredményei szerint a ‘Budapest’, ‘Bergeron’, ‘Ananas’, ‘Comandor’, ‘Selena’, ‘Ceglédi óriás’, ‘Ceglédi bíbor’ és ‘Magyar kajsz’ fajták szintén egy klaszterbe kerültek. A Bergeron RAPD és őszibarack SSR primerekkel végzett elemzések során is következetesen a Magyar kajsz fajtacsoporthoz közeli besorolást kapott (Pedryc és mts., 2002; Ruthner és mts., 2003; Ruthner és mts., 2006).

A kecskeméti csoport két alkalzteret alkotott, az elkülönülés alapja egyértelműen az érési idő volt korai és kései kecskeméti fajták szerint.

A 'Klosterneuburger' kajszi egy alsó-ausztriai helyi fajta, aminek feltehetően magyar az eredete. A vita, hogy talán azonos a Magyar kajszi valamelyik klónjával, már a múlt évszázadban megkezdődött. A gyümölcsöt első alkalommal 1898-ban a bécsi, majd 1901-ben a kremsi kajsziállításon sorolták be, mint 'Hungarian Best' fajtát. Az 1943-as bécsi és kremsi kiállításon azonban a két fajtát már elkülönítették (Lösching és Passecker, 1954). Adataink világosan mutatják, hogy két külön fajtáról van szó. Ettől némiképp eltérő eredményre jutottak Regner és mts. (2004), akik számos 'Klosterneuburger' és 'Ungarische Beste' fajtát és klónjaikat jellemezték. A vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy a két fajta, noha természetesen tulajdonságaiban némileg különböző, genetikai hátterét tekintve lényegében azonosnak tekinthető. Mindkét fajta tartalmaz azonban olyan genotípusokat, amelyek eltérnek az alaptípusoktól. Ez részben a vegetatív szaporítással tovább vitt mutációk eredménye. Ezenkívül azonban voltak olyan genotípusok is, amelyek genetikailag olyan távoliak az alaptípusoktól, hogy a fajtához tartozásuk megkérdőjelezhető, az elnevezés tévesnek tekinthető.

A 'Vinschger Marille' és az 'Annanasznij cjurpinszkij' egy klaszterbe kerültek. Közös genetikai hátterük nem kizárt.

Az 1.1 és az 1.3 alcsoportok a nyugat- és kelet-európai, valamint a legtöbb észak-amerikai fajtát magukba foglalják. A 'Harcot', 'Veecot', 'Bahrt' (Orange red) és 'Morden-604' fajták közép-ázsiai fajtákkal közös helye az 1.3 alcsoportban bizonyítéka annak, hogy a legtöbb amerikai fajta mellett, hogy európai genetikai alapokra vezethető vissza, ázsiai eredetű génekkel is gazdagodott. Ezek az eredmények megegyeznek azzal a feltevessel, hogy a kajszi fajták Kínából kerültek Örményországba, majd a rómaiak (ie. 70–60) közvetítésével Görögországon és Olaszországon át kerültek Európába (White, 1970). A kajszi egyes fajtái az USA-ba az angol telepesek és a spanyol misszionáriusok révén kerültek be Európából és részben Ázsiából (Faust és mts., 1998; Hagen és mts., 2002; Mehlenbacher és mts., 1991). Hagen és mts. (2002) arról számoltak be, hogy az észak-amerikai 'Veecot' fajta genetikai rokonságot mutat egy török fajtával, míg Geuna és mts. (2003) szerint a 'Veecot' – más észak-amerikai fajtákkal együtt – a 'Jerevani' (szin.: 'Salah') fajtával van rokonságban. A mi vizsgálatunk azt mutatták, hogy a 'Veecot' három másik Észak Amerikai fajta ('Bhart' 'Orange red' és 'Kuresia') társaságában a nyugat-európai fajtákhoz közel a 'Jerevani'-val egy csoportban található.

A 2. klaszter a különböző allélok nagy változatosságával csak az ázsiai genotípusokat (pakisztáni magoncok) tartalmazta. Ez a csoport kitűnő példa arra, hogy a ma termesztett fajták elődeinek természetes populációi mennyire voltak képesek fenntartani nagyfokú variabilitásukat. Ennek egyik legfontosabb eszköze az a bonyolult genetikai rendszer, amely biztosítja az allogámiát, és ennek köszönhetően gátolja az egyes allélok fixálódását homozigóta állapotban, illetve ezek kiszorulását a populáció génállományából. A vizsgálatban felhasznált pakisztáni magoncok egy ilyen populáció képviselői, amely egyrészt megtartotta egyedi voltát, és emiatt vált el a többi klasztertől, de ugyanakkor a populáción belüli variabilitás nem engedte, hogy a populációból kiemelt viszonylag kisszámú minta alapján elváljanak egymástól az alklaszterek szintjén (Zohary és Hopf, 1994). Ázsia legtöbb területén a kajszi domesztikációja a természetes magoncok révén történt meg, ami lehetővé tette a faj jelentős genetikai diverzitásának megtartását. Ezzel szemben Európában a termesztési célra leginkább megfelelő klónokat szelektálták, és vegetatív szaporítás útján tartották fenn (Hagen és mts., 2002; Zhebentyayeva és mts., 2003). Ez a gyakorlat óhatatlanul jelentős generációhoz vezetett, amit nagyon jól példáz a magyar fajtakörben tapasztalt korlátozott variabilitás. A vegetatív szaporítás mellett a kialakult öntermékenyülés is csökkenti a variabilitást. A 9. ábrának megfelelően a jól ismert eredetű, közép-ázsiai 'Zard' fajta közel áll a 'Zaposzdojje' fajtához, aminek földrajzi eredetéről nem rendelkezünk semmilyen hiteles információval. Elemzésünk azonban megerősíti az ázsiai allélok jelenlétét a 'Zaposzdojje' fajtában.

A fajta származását illetően érdekes megállapítást tettek Halász és mts. (2007) a kajszi S-allél rendszerének vizsgálata során. Az Sc-RN-áz szekvencia alapján a 'Zaposzdojje' fajta a mediterrán fajtákhoz volt közelebb. Erre magyarázatot adhat, hogy Ukrajna az ázsiai és nyugat-európai fajták találkozó helyét jelentette a XVII. században. Az Sc-RN-ázok közötti hasonlóság és egyben a fajták közötti nagy genetikai távolság azzal magyarázható, hogy a 'Zaposzdojje' keleti és nyugati fajták leszármazottja, de különböző genetikai összetétellel.

6.4.3 A kajszi és néhány rokon faj genetikai kapcsolatának elemzése klaszteranalízissel

A rokon fajokkal való összehasonlításban a közönséges kajszi, *P. armeniaca* termesztett fajtái egy klaszterbe tartoznak, egyértelműen jelezve a közös genetikai hátteret. Ettől a csoporttól a *P. brigantiaca* áll a legtávolabb (15. ábra). Ez a faj számos morfológiai jegyben jelentősen különbözik a *P. armeniaca*-tól, amit a molekuláris elemzések többször is alátámasztottak. Takeda és mts. (1998) és Hagen és mts. (2002) RAPD- és AFLP-markerek alkalmazásával az *Armeniaca* szekción belül, a *P. brigantiaca*-t helyezte el a legtávolabb a *P. armeniaca*-tól. A *P. ×dasycarpa* és a Plumcot, a *P. armeniaca* × *P. cerasifera* és a *P. armeniaca* × *P. salicina* hibridjei. Ezek a fajok a 9. ábra szerint is a *P. brigantiaca* és más kajszi fajok között helyezhetők el a genetikai különbség alapján. Ezeknek a fajoknak a *P. brigantiaca*-hoz és *P. armeniaca*-hoz való viszonyát Takeda és mts. (1998), valamint Hagen és mts. (2002) szintén megerősítették.

6.4.4 Ökoföldrajzi csoportok közötti genetikai viszony

A kajszifajták hagyományos taxonómiája a fiziológiai és morfológiai bélyegek összehasonlításán alapul, és négy fő ökoföldrajzi csoportot tart számon (Kosztina, 1969). Ezek közül hármat elemezhetünk: a magyar, a nyugat-európai és az észak-amerikai fajtákat magában foglaló európai csoportot, az iráni-kaukázusi csoportot, és a közép-ázsiai csoportot. A 9. ábra szemlélteti az UPGMA klaszteranalízis alapján megállapított genetikai viszonyokat a csoportok között. A számításokban nem vettük figyelembe a csoportok közötti keresztezésekből nyert hibrideket. A nyugat-európai és észak-amerikai fajták klasztereinek közvetlen kapcsolata megfelelt annak a korábbi feltételezésnek, hogy az amerikai fajták az európai fajtacsoportnak közvetlen leszármazottai (Kosztina, 1969; Bailey, és Hough, 1975; Badenes és mts., 1996; Romero és mts., 2003; Pedryc és mts., 2009). Természetesen az is lehetséges, hogy véletlenül éppen olyan kilenc észak-amerikai fajtát sikerült kiválasztanunk, amely európai fajtákból származik. Ez egyértelműen magyarázza, hogy miért van olyan közel ez a csoport a nyugat-európai fajtákhoz.

Az európai fajtacsoporton belüli további alcsoportok definiálása nem egyszerű, már a csoporton belüli keresztezés lehetősége miatt sem. Ennek ellenére egyes szerzők

kiemelik a kelet-európai fajtacsoportot, mint az európai fajták egy jellegzetes típusát (Kosztina, 1969; Kovalev, 1970). Romero és mts. (2003) által őszibarack SSR markeres vizsgálat adatai alapján elvégzett klaszteranalízis a kelet-európai csoportot képviselő magyar fajtákat közelebb helyezte el az ázsiai fajtákhoz, mint a nyugat-európai fajták csoportjához. Az eredményeink is alátámasztották az előbbi megállapításokat azzal, hogy az iráni-kaukázusi és a kelet-európai fajták csoportja ebben az esetben is közeli kapcsoltságra utaló két alcsoportot alkotnak. Ezek az eredmények a kajszai ázsiai géncentruma irányából való terjeszkedés mentén a magyar eredetű fajtakört egy közbülső állomás szerepébe helyezik. A vándorlás során fellépő, a faj genomját modifikáló folyamatok fontosságát korábban már hangsúlyozta Crossa-Raynaud (1960) és Faust és mts. (1998).

A molekuláris markerek használata a fajták, nemesítési anyagok genetikai hátterének megállapítására és nemesítési célú hasznosítására, a fajtagyűjtemények kezelése és rendszerezése szempontjából egy ígéretes eszköz a gyümölcsfajtákkal foglalkozó szakemberek számára. A legtöbb gyümölcsfajta vegetatív úton szaporított, és a szelekciós folyamatok csak kis számú nemzedékre korlátozódnak (Hormaza, 2002). A kajsziban fontos nemesítési célok elérése - mint a szélesebb ökológiai adaptáció, a kórokozókkal, kártevőkkel szembeni rezisztencia, az új, a korábnál jobb minőségű gyümölcstípusok iránti igény - csak különböző ökoföldrajzi csoportokból származó fajták felhasználásával lehetséges (Audergon, 1995; Badenes és mts., 1998; Egea és mts. 1995).

A vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a mikroszatellitek a fajtaazonosításban kiválóan alkalmazható kodomináns markerek, melyek nagy sikerrel használhatók a nemesítési programokban akár a szinonim nevű fajták és hibridek elkülönítésére is.

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Azonosítottunk olyan RAPD és SSR markereket, amelyek alkalmasak voltak a Magyarországon legnagyobb területen termesztett 16 fajta azonosítására, egyedi DNS-profiljának elkészítésére. A módszert az OMMI a gyakorlatban felhasználta fajtaazonosítási célokra.
- Megállapítottuk, hogy a kajszibarack genomjára tervezett SSR-primerkészletek hatékonysága a kajszibarack mikroszatellit variabilitásának kimutatására jelentősen nagyobb, mint az egész *Prunus* nemzetségben alkalmazható őszibarack primereké.
- Eredményeink alapján megállapítható, hogy összehasonlítva a kínai, közép-ázsiai, iráni-kaukázusi, kelet-európai, nyugat-európai és észak-amerikai fajtacsoportok közötti genetikai távolságokat, illetve egyedi és közös allélok jelenlétét, a főleg magyar kajszifajtákra épülő közép-európai kajszifajtacsoport az iráni-kaukázusi fajtákkal mutatja a legnagyobb genetikai azonosságot. Megerősítést nyert a francia 'Bergeron' és 'Luizet' fajták genetikai kapcsolata a magyar fajtákkal. Megállapítottuk, hogy az Óriás kajszibarack fajtacsoportba tartozó három fajta genetikai háttere vélhetően azonos. Bebizonyítottuk, hogy az észak-amerikai fajták keletkezésében úgy az európai, mint az ázsiai génállományok szerepet játszottak. A közép-európai fajtákon kívül minden csoportban felfedeztünk egyedi allélokat. A legtöbb egyedi SSR-allél a kínai és közép-ázsiai fajtákban található. A kínai fajták SSR-polimorfizmusa jelentősen eltér a többi csoport fajtáitól.
- Vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy az alapvetően magyar fajtákból álló közép-európai fajtakörben mért genetikai diverzitás egyértelműen alacsonyabb volt, mint az összes többi fajtacsoportnál.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatómunka során talán hazánkban az egyik legnagyobb termesztési hagyománnyal rendelkező csonthéjas gyümölcsnek, a kajszinak a genetikai hátterét vizsgáltuk DNS-alapú molekuláris markerekkel.

Elsőként több módszer összehasonlításával olyan DNS-izolálási technikát kellett találnunk, ami több követelménynek is eleget tesz. A kutatás idején fellelhető DNS kivonási eljárásokat több szempontból is megvizsgáltuk. A nyert DNS PCR reakcióhoz való alkalmasságán kívül, olyan módszert kerestünk, amely alkalmas nagy mintaszám gyors és rutinszerű feldolgozására, és minél kevesebb környezetre, valamint egészségre káros vegyszer használatával egyszerűen kivitelezhető. A választásunk a Qiagen cég által kifejlesztett DNeasy Plant Mini Kitre esett. A módszer egy teljesen zárt rendszer, a használt oldatok biztonságosak, az eljárás rövid idő alatt könnyen elsajátítható. Amellett, hogy egészségi szempontból semmiféle veszéllyel nem jár, lehetővé teszi, hogy megfelelő minőségű és mennyiségű genomi DNS-hez jussunk munkánk során.

A konkrét markerezési munka a kilencvenes évek végén elérhető RAPD markerek alkalmazásával kezdődött. A vizsgálatba állami elismerésben részesített, a nemzeti leíró fajtajegyzékben szereplő összesen 16, Magyarországon legnagyobb területen termesztett fajtát vontunk be. A kipróbált hatvan OPERON RAPD primer közül 45 esetben kaptunk jól detektálható DNS-fragmentumokat. A kapott fragmentumok többsége uniformnak bizonyult a vizsgált fajtáknál, nyolc esetében azonban reprodukálhatóan polimorf mintázatot kaptunk. A polimorf fragmentumokat felhasználva a vizsgált kajszifajták többségét sikerült egyértelműen megkülönböztetni, és egyedi DNS-ujjlenyomatot készíteni. Először sikerült az Óriás kajszifajtakörbe tartozó fajták genetikai hátterét illetően információhoz jutni, és igazolni azt a feltételezést, hogy a fajták genetikai állományukat tekintve nagyon hasonlóak.

A vizsgálati eredményeinket, mint a hazánkban termesztett fajták meghatározására alkalmas módszert, az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet Kertészeti Szaporítóanyagok Osztálya egy szerződés keretében átvette. A RAPD kísérlet eredményeit később elsőként általunk használt kajsziból izolált SSR markerekkel is megerősítettük.

A különböző *Prunus* fajok mikroszatellit régióit határoló szekvenciák konzervativizmusa lehetővé tette számunkra, hogy őszibarack primereket használjunk a kajszii genetikai sokféleségének tanulmányozására. A kísérletbe negyvenöt olyan kajszifajtát állítottunk, melyeket Közép-Európában termesztetőség szempontjából értékesnek találtuk. A felhasznált 17 őszibarack primer 90%-ban alkalmas volt mikroszatellit lokuszok azonosítására, ami jól bizonyítja a módszer alkalmazhatóságát. A klaszter analízissel létrehozott dendrogram a 45 fajtát két fő csoportba és néhány alcsoportba sorolta. A két fő csoportot főként ázsiai és nem ázsiai eredetű fajták alkották.

A legszélesebb körű kutatást 133 kajszii genotípus, a *P. x dasycarpa* és *P. brigantiaca* fajok, valamint egy interspecifikus hibrid bevonásával végeztük. A fajták jellemzésére két különböző forrásból származó, 10 kajszira tervezett mikroszatellit primert alkalmaztunk. A kísérletbe vont fajták megfelelően reprezentálták az Európában, az iráni-kaukázusi régióban, Közép-Ázsiában és Észak-Amerikában termesztett különböző származású kajszikat.

Megállapítottuk, hogy a kajszibarack genomjára tervezett SSR-primerkészletek hatékonysága a kajszii mikroszatellit variabilitásának kimutatására jelentősen nagyobb, mint az egész *Prunus* nemzetségben alkalmazható őszibarack primereké.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy összehasonlítva a közép-ázsiai, iráni-kaukázusi, kelet-európai, nyugat-európai és észak-amerikai fajtacsoportok közötti genetikai távolságokat, illetve az egyedi és közös allélok jelenlétét, a főleg magyar kajszii fajtákra épülő közép-európai kajszii fajtacsoport az iráni-kaukázusi fajtákkal mutatja a legnagyobb genetikai azonosságot. Megerősítést nyert a francia 'Bergeron' és 'Luizet' fajták genetikai kapcsolata a magyar fajtákkal. Bebizonyítottuk, hogy az észak-amerikai fajták keletkezésében úgy az európai, mint az ázsiai génállományok szerepet játszottak. A közép-európai fajtákon kívül minden csoportban felfedeztünk egyedi allélokat. A legtöbb egyedi SSR-allél a kínai és közép-ázsiai fajtákban található. Vizsgálataink rávilágítottak arra is, hogy az alapvetően magyar fajtákból álló közép-európai fajtakörben mért genetikai diverzitás egyértelműen kisebb volt, mint az összes többi fajtacsoportnál.

9 SUMMARY

Among the *Prunus* species, probably apricot cultivation has the biggest tradition in Hungary. In our study, we examined the genetic background of this important species with DNA-based molecular markers.

As the first step of our work, we compared several DNA isolation techniques in order to find an appropriate method that fulfils certain criteria. Our aim was to find a method which apart from enabling us to extract high quality DNA was also suitable for PCR reactions to process a large number of samples without being harmful to human health and natural environment. Finally, we chose the DNeasy Plant Mini Kit produced by Qiagen. This method can be performed in a totally closed system, the solutions used are safe, and it can easily process a large number of samples and means no threat to the users and the environment.

RAPD markers were the first molecular markers that were available for us in the late 90's. From the National Catalogue we selected the 16 most widely cultivated apricot cultivars in Hungary. Sixty decamer primers from Operon Technologies were used for the PCR reaction. Forty-five of the 60 primers tested were able to produce well detectable fragments but only 8 of them amplified highly reproducible polymorphic patterns. We managed to differentiate among almost all of the varieties. In the case of three varieties, which belong to the so-called Óriás group, we found similar patterns. These results confirm our preliminary expectation that these three varieties have almost the same genetic background therefore it is impossible to reveal these slight differences by using RAPD markers. Based on an agreement the National Quality Control Authority has the intention to use our elaborated method for variety identification purposes.

The above-mentioned results were confirmed later with SSR markers isolated from apricot.

The possibility of cross species amplification among different *Prunus* species using SSR primers allowed us to use primers developed in peach to study genetic diversity in apricot. 45 apricot accessions were selected that represent the cultivars grown in Central Europe. From the 17 peach primers tested, 90% was able to amplify SSRs in apricot and more than a half of them were polymorphic. The dendrogram generated from the UPGMA cluster analysis classified the 45 cultivars into two major groups and several subgroups. The two major groups contain cultivars with mainly Asian and non-Asian origin

In our most comprehensive study, 133 apricot accessions, 1 species (*P. brigantiaca*) and 2 hybrids (*P. x dasycarpa*, Plumcot) were chosen to represent the European, Irano-Caucasian, Central Asian and North American cultivars with different origin. Ten different primer combinations originally developed for apricot SSR loci and representing different regions of the apricot genome were used for amplification.

The results obtained in this study show that highly polymorphic homologous apricot microsatellite markers could be effectively used for fingerprinting purposes in apricot. They were proven to be more effective than the usage of heterologous peach primers which are extensively used for cross-amplification in stone fruits.

Our results clearly demonstrated that comparing the genetic distances and the presence of unique and shared alleles of the Irano-Caucasian, Eastern European, Western European, Central Asian and North American cultivars, the Central European group - containing mainly Hungarian cultivars - and the Irano-Caucasian group showed the highest genetic identity. We confirmed the genetic relatedness of two French cultivars Bergeron and Luizet to the Hungarian cultivars. We managed to prove that both European and Asian gene pools were vital in the origin of North American cultivars. We identified unique alleles in every group except the Central-European cultivar group. The Central Asian group contained the highest number of unique alleles. Our results revealed that genetic diversity was the lowest in the Central-European group including mainly Hungarian cultivars.

10 MELLÉKLET

M1. Irodalomjegyzék

1. Abbott, A.G., Lecouls, A.C., Wang, Y., Georgi, L., Scorza, R., Reighard, G. (2002) Peach: The model genome for *Rosaceae* genomics. *Acta Horticulturae*, 592: 199-209.
2. Abbott, A.G., Rajapakse, S., Sosinski, B., Lu, Z.X., Sossey-Alaoui, K., Gannavarapu, M., Scorza, R., Reighard, G., Ballard, R.E., Callahan, A., Baird, W.V. (1998) Construction of saturated linkage maps of peach crosses segregating for characters controlling fruit quality, tree architecture and pest resistance. *Acta Horticulturae*, 465: 141-150.
3. Adam-Blondon, A.F., Seignac, M., Bannerot, H., Dron, M. (1994) SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 865–870.
4. Adams, W.T. (1983) Application of isozymes in tree breeding. In: Tanksley, S.D., Orton, T.J. (Eds.): *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam, pp. 381-400.
5. Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in Plant Science. *Plant Cell Reports*, 27: 617–631.
6. Ahmad, R., Potter, D., Southwick, S.M. (2004) Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1: 164-169.
7. Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132: 1131-1139.
8. Amirbakhtiara, N., Kiania, S., Mohammadia, Sh., Sayed-Tabatabaeib, B.E., Moradic, H. (2007) Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111: 280-292.
9. Aranzana, M.J., Arús, P., Carbó, J., King, G.J. (2001a) AFLP and SSR markers for genetic diversity analysis and cultivar identification in peach (*Prunus persica* (L) Batsch). *Acta Horticulturae*, 546: 367–370.
10. Aranzana, M.J., de Vicente, M.C. and Arús, P. (2001b) Comparison of fruit and leaf DNA extracts for AFLP and SSR analysis in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Acta Horticulturae*, 546: 297-300.
11. Aranzana, M.J., Garcia-Mas, J., Carbo, J., Arus, P. (2002) Development and variability of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, 121: 87–92.
12. Aranzana, M. J., Carbo, J., Arus, P. (2003a) Using amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) to identify peach cultivars. *Journal of the American Society For Horticultural Science*, 128: 672-677.

13. Aranzana, M.J., Carbó, J., Arús, P. (2003b) Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1341-1352.
14. Arnold, M.L., Bruckner, C.M. Robinson, J.J. (1991). Pollen mediated introgression and hybrid speciation in irises. *The Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 88: 1398-1402.
15. Arulsekar, S., Parfitt, D.E., and Kester, D.E. (1986) Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *Journal of Heredity*, 77: 272-274.
16. Arús, P., Ballester, J., Jauregui, B., Joobeur, T., Truco, M.J., de Vicente, M.C. (1999) The European *Prunus* mapping project: update of marker development in almond. *Acta Horticulturae*, 484: 331-336.
17. Audergon, J.M. (1995) Variety and Breeding. *Acta Horticulturae* 384: 35-45.
18. Badenes, M.L., Asins, M.J., Carbonell, E.A., Llácer, G. (1996) Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant Breeding*, 115: 133-139.
19. Badenes, M.L., Cuenca, J., Romero, C., Martínez, J., Llácer, G. (2002) Description of peach cultivars from Spain. Identification of closely related clones by SSR markers. *Acta Horticulturae*, 592: 211-216.
20. Badenes, M.L., Hurtado, M.A., Sanz, F., Archelos, D.M., Burgos, L., Egea, J., Yacer, G. (2000) Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. *Plant Breeding*, 119: 157-160.
21. Badenes, M.L., Martínez-Calvo, J., Llácer, G. (1998) Analysis of apricot germplasm from the European eco-geographical group. *Euphytica*, 102: 93-99.
22. Bailey, C.H., Hough, L.F. (1975) Apricot. *Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana. pp. 367-383.
23. Ballester, J., Socias i Company, R., Arús, P., de Vicente, M.C. (2001) Genetic mapping of a major gene delaying blooming time in almond. *Plant Breeding*, 120: 268-270.
24. Baránek, M., Raddova, J., Pidra, M. (2006) Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia horticulturae*, 108(3): 253-259.
25. Bartolozzi, F., Warburton, M.L., Arulsekar, S., Gradziel, T.M. (1998) Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of the American Horticultural Science*, 123: 381-387.
26. Battistini, S., Sansavini, S. (1991) Electrophoretic analysis of isozyme variability in apricot cultivars. *Journal of Genetics and Breeding*, 45: 117-122.
27. Beranek, M., Raddova, J., Miroslav, P. (2006) Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia horticulturae*, 108: 253-259.

28. Bell, C.J., Ecker, J.R. (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*, 19: 137-144.
29. Bianchi Valmor, J., Fachinello, J.C ; Venturi, S., Tartarini, S., Sansavini, S. (2002) Molecular AFLP and SSR markers resolutive for genetic identification of plum cultivars (Amplified Fragment Length Polymorphism - Single Sequence Repeats - *Prunus domestica* L - *Prunus salicina* Lindl. - *Prunus cerasifera* Ehrb). *Rivista di Frutticoltura*. 64: 83-87.
30. Blenda, A.V., Reighard, G.L., Baird, W.V., Georgi, L.L., Abbott, A.G. (2002) Molecular markers and candidate resistance genes: a genetic study of tolerance to ring nematode in peach. www.intl-pag.org. Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference. San Diego, USA.
31. Bliss, F.A., Arulsekar, S., Foolad, M.R., Becerra, V., Gillen, A., Warburton, M.L., Dandekar, A.M., Kocsisne, G.M., Mydin., K.K. (2002) An expanded genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between almond and peach. *Genome*, 45: 520-529.
32. Boonprakob, U., Byrne, D. H., Graham, C. J., Okie, W. R., Beckman, T., Smith, B. R. (2001) Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 4: 451-461.
33. Boritzki, N.I., Plieske, J., Struss, D. (2000) Cultivar identification in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using AFLP and microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 538: 505-510.
34. Bošković, R., Tobutt, K.R., Nicoll, J.F. (1997) Inheritance of isoenzymes and their linkage relationships in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* 93: 129-143.
35. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
36. Bouhadida, M., Casas, A.M., Moreno, M.A., Gogorcena, Y. (2007) Molecular characterization of Miraflores peach variety and relatives using SSRs. *Scientia Horticulturae*, 111: 140-145.
37. Brock, T.D., Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus gen.n. and sp. N.*, a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98. 289-297.
38. Brózik, S., Nyéki, J. (1975) A kajszi termékenyülési viszonyai. In: Brózik, S., Nyéki, J. (Szerk.): Gyümölcsstermő növények termékenyülése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 173-176.
39. Burgos, L., Berenguer, T., Egea, J. (1993) Self- and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience*, 28: 148-150.
40. Byrne, D.H. (1989) Electrophoretic variability in four diploid stone fruits. *Acta Horticulturae*, 254: 29-33.
41. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1988) Verification of the parentage of presumed peach × almond hybrids by isozyme analyses. *Fruit Varieties Journal*, 42: 130-134.

42. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1989a) Characterization of isozyme variability in apricots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114: 674-678.
43. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1989b) Interspecific hybrid verification of plum × apricot hybrids via isozyme analyses. *HortScience*, 24: 132-134.
44. Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M., Struss, D. (2001) DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 205-209.
45. Casas, A.M., Igartua, E., Balaguer, G., Moreno, M.A. (1999) Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica*, 110: 139-149.
46. Chaparro, J.X., Werner, D.J., O'Malley, D., Sederoff, R.R. (1994) Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 805-815.
47. Cheng, F.S., Brown, S.K., Weeden, N.F. (1997) A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience*, 32: 806-835.
48. Ciofi, C., Funk, S.M., Coote, T., Cheesman, D., Hammond, R.L., Saccheri, I.J., Bruford, M.W. (1998) In: Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. (Eds.) *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp. 413-417.
49. Cipriani G., Lot G., Huang W.G., Marrazzo M.T., Peterlunger E., Testolin R. (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): Isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 65-72.
50. Clarke, J.B., Ortega, E., Sutherland, B., Marchese, A., Tobutt, K.R. (2004) Some new cherry microsatellites and their transferability to other stone fruits. *Acta Horticulturae*, 663: 83-86.
51. Clarke, J.B., Tobutt, K.R. (2003) Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Molecular Ecology Notes*, 4: 578-580.
52. Claverie, M., Bosselut, N., Lecouls, A. C., Voisin, R, Lafargue, B., Poizat, C., Kleinhentz, M., Laigret, F., Dirlwanger, E., Esmenjaud, D. (2004) Location of independent root-knot nematode resistance genes in plum and peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 4: 765-773.
53. Crossa-Raynaud (1960) *Problems d'arboriculture fruitiere en Tunisie. Abricotiers*. Ann. L'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, 33: 39–63.
54. Decroocq, V., Favé, M.G., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S. (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 912-22.
55. Decroocq, V., Hagen, L.S., Fave, M.G., Eyquard, J.P., Pierronnet, A. (2004) Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats. *Molecular Breeding* 13: 135-142.

56. Dettori, M.T., Quarta, R., Verde, I. (2001) A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. *Genome*, 44: 783-790.
57. De Vicente, M.C., Truco, M.J., Egea, J., Burgos L., Arús, P. (1998) RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding*, 117: 153-158.
58. Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., Laigret, F. (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 127-138.
59. Dirlewanger, E., Duha, S., Viruel, M.A., Saunier, R. (1998) Identification of peach varieties using molecular markers. *Acta Horticulturae*, 465: 69-78.
60. Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Calderé, F. G., Cosson, P., Howad, W., Arús, P. (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9891-9896.
61. Dirlewanger, E., Moing, A., Rothan, C., Svanella, L., Pronier, V., Guye, A., Plomion, C., Monet, R. (1999) Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 18-31.
62. Dondini, L., Lain, O., Geuna, F., Banfi, R., Gaiotti, F., Tartarini, S., Bassi, D., Testolin, R. (2007) Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* maps. *Tree Genetics & Genomes*, 3: 239-249.
63. Downey, L.D., Iezzoni, A.F. (2000) Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125: 76-80.
64. Durham, R.E., Moore, G.A., Sherman, W.B. (1987) Isozyme banding patterns and their usefulness as genetic markers in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112: 1013-1018.
65. Echt, C.S., Erdahl, L.A., McCoy, T.J. (1992) Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84-87.
66. Egea, J.G. Egea, J.E., Berenguer, T. (1995) Productive behaviour of apricot varieties in warm winter area. *Acta Horticulturae* 384: 129-133.
67. Edwards, A, Civitello, A., Hammond, H.A., Caskey, C.T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49: 746-756.
68. Eldredge, L., Ballard, R., Baird, W. V., Abbott, A., Morgens, P., Callahan, A., Scorza, R. Monet, R. (1992) Application of RFLP analysis to genetic-linkage mapping in peaches. *Hortscience*, 27: 160-163.
69. Etienne, C., Rothan, C., Moing, A., Plomion, C., Bodenes, C., Svanella-Dumas, L., Cosson, P., Pronier, V., Monet, R., Dirlewanger, E. (2002) Candidate genes and QTLs for sugar and organic content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 145-159.

70. Faust, M., Surányi, D., Nyujtó, F. (1998) Origin and dissemination of apricot. *Hortic. Rev.*, 22: 225-266.
71. Felsenstein, J. (1989) PHYLIP Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 5: 164-166.
72. Foolad, M.R., Arulsekhar, S., Becerra, V., Bliss, F.A. (1995) A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 262-269.
73. Fujimori, S., Washio, T., Higo, K., Ohtomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S., Tomita, M. (2003) A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Letters*, 554: 17–22.
74. Georgi, L.L., Wang, Y., Yvergiaux, D., Ormsbee, T., Iñigo, M., Reighard, G., Abbott, A.G. (2002) Construction of a BAC library and its application to the identification of simple sequence repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 1151-1158.
75. Gerlach, H.K., Stösser, R. (1997) Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angewandte Botanik*, 71: 212–218.
76. Geuna, F., Toschi, M., Bassi, D. (2003) The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breeding*, 122: 526-531.
77. Goffreda, J.C., Nick, J.M.A., Mehlenbacher, S.A., Vorsa, N. (1991) Inheritance of isozymes in peach x *Prunus kansuensis* and peach x *Prunus davidiana* Hybrids. *Eupytica*, 54: 161-168.
78. Gogorcena, Y., Parfitt, D.E. (1994) Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Scientia Horticulturae*, 59: 163-167.
79. Goulao, L., Monte-Corvo, L., Oliveira, C.M. (2001) Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 72-77.
80. Graetz, D.K. (2006) Breeding apricot cultivars for drying in Australia. *Acta Horticulturae*, 717: 197-198.
81. Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J. M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., Forster, R. (1997) Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 249–254.
82. Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1996) Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, 70: 45-54.
83. Hagen, L.S., Chaib, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, J.P., Lambert, P., Audergon, J.M. (2004). Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4: 742-745.

84. Hagen, L.S., Khadari, B., Lambert, P., Audergon, J.M. (2002) Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 298-305.
85. Hajósné M. (1999) Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
86. Halász, J. (2007) A kajszi önmeddőségét meghatározó S-allél rendszer molekuláris háttere. Doktori Értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest.
87. Halász, J., Pedryc, A., Hegedűs, A. (2007) Origin and dissemination of the pollen-part mutated Sc-haplotype that confers self-compatibility in apricot (*Prunus armeniaca*). *New Phytologist*, 176: 792-803.
88. Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., Hammerschlag, F. (1997) RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*, 16: 624-627.
89. Hartl, D.L., Clark, A.G. (1997) Principles of population genetics, 2nd edn. Sinauer, Sunderland.
90. He, T.M., Chen, X.S., Xu, Z., Gao, J.S., Lin, P.J., Liu, W., Liang, Q., Wu, Y. (2007) Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 563-572.
91. Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G., Lawson, D.M. (1994) Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity*, 85: 4-11.
92. Hormaza, J.I. (2001) Identification of apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using microsatellite and RAPD markers. *Acta Horticulturae*, 546: 209-215.
93. Hormaza, J.I. (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321-328.
94. Hu, X.Y.; Ohm, H.W., Dweikat, I. (1997) Identification of RAPD markers linked to the gene PM1 for resistance to powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 832-840.
95. Hurtado, M.A., Badenes, M.L., Llácer, G. (1999) Random amplified polymorphic DNA markers as a tool for apricot cultivar identification. *Acta Horticulturae*, 488: 281-288.
96. Hurtado, M.A., Badenes, M.L., Llácer, G., Westman, A., Beck, E., Abbott, G.A. (2001) Contribution to apricot genetic analysis with RFLP, RAPD and AFLP markers. *Acta Horticulturae*, 546: 417-420.
97. Hurtado, M.A., Westman, A., Beck, E., Abbott, G.A., Llácer, G., Badenes, M.L. (2002a) Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica*, 127: 297-301.
98. Hurtado, M.A., Romero, C., Vilanova, S., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L. (2002b) Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 182-191.

99. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (1990) PCR protocols (A Guide to Methods and Application), 3-166. Academic Press, INC., San Diego, California.
100. Jacob, H.J., Linderpaintner, K., Lincoln, S.E., Kusumi, K., Bunker, R.K., Yi-Pei, M., Ganten, D., Dzau, V.J., Lander, E.S. (1991): Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell*, 67: 213-224.
101. Janke, G. (1996) Izoenzimek változékonyságának vizsgálata hagyományos magyar kajszibarack fajtánál. Diplomamunka. Kerészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Budapest.
102. Joobeur, T., Periam, N., de Vicente, M.C., King, G.J., Arús, P. (2000) Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. *Genome*, 43: 649-655.
103. Joobeur, T., Viruel, M.A., de Vicente, M.C., Jáuregui, B., Ballester, J., Dettori, M.T., Verde, I., Truco, M.J., Messeguer, R., Battle, I., Quarta, R., Dirlwanger, E., Arús, P. (1998) Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond x peach F2 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1034-1041.
104. Jun, J.H., Chung, K.H., Jeong, S.B., Lee, H.J. (2002a) Development of RAPD and SCAR markers linked to flesh adhesion gene in peach. Book of Abstracts of the XXVI International Horticultural Congress, Toronto, Canada. p. 335.
105. Jun, J.H., Jeong, S.B., Chung, K.H. (2002b) Selection of species-specific RAPD markers and genetic relationships among *Prunus* taxa. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 43: 517-522.
106. Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A., Main, D. (2008) GDR (Genome Database for *Rosaceae*): integrated web-database for *Rosaceae* genomics and genetics data. *Nucleic Acids Research*, 36: 1034-1040.
107. Kiss, G.B., Csanadi, G., Kalman, K., Kalo, P., Okresz, L. (1993) Construction of a basic linkage map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 238: 129-137.
108. Kiss E.(2005) Molekuláris növénynevelés. 194-210 p. In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (Szerk.): Mezőgazdasági Biotechnológia. Agrofórum Kiadó, Budapest.
109. Kosztina, K.F. (1969) The use of varietal resources of apricots for breeding. *Trud. Nikit. Bot. Sad.* 40: 45-63.
110. Kovalev, N.V. (1970) Ustojcivost abricosa k klajstrosporiozu v svjazi s geografickim i geneticeskim proishozsdeniem. In Ajzenberg, V.J. (Ed.): *Abrikos. Ajasztan, Yerevan, Armenia*. pp. 169-172.
111. Krichen, L., Mnejja, M., Arús, P., Marrakchi, M., Trifi-Farah, N. (2006) Use of microsatellite polymorphisms to develop an identification key for Tunisian apricots. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1699-1706.
112. La Rota, M., Kantety, R.V., Yu, J.K., Sorrells, M.E. (2005) Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. *BMC Genomics*, 6: 23.

113. Lawson, W.R, Goulter, K.C, Henry, R.J, Kong, G.A & Kochman, J.K (1996) RAPD markers for a sunflower rust resistance gene. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 395-401.
114. Lecouls, A.C., Rubio, M.J., Cabetas, J.C., Minot, J.C., Voisin, R., Bonnet, A., Salesses, G., Dirlewanger, E., Esmenjaud, D. (1999) RAPD and SCAR markers linked to the Ma1 root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 328-335.
115. Levinson, G., Gutman, G.A. (1987) High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 15: 5323–5338.
116. Li, X.Y, Su, X.Z, Chen, F. (2002) Rapid extraction of genomic DNA From leaves and bracts of dove tree (*Davidia involucrata*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 185a–185e.
117. Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 991–1007.
118. Lisek, A., Korbin, M., Rozpara E. (2006) Using simply generated RAPD markers to distinguish between sweet cherry (*Prunus avium* L) cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 4: 53-59.
119. Litt, M., Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.
120. Lopes, M.S., Sefc, K.M., Laimer M., Da Câmara Machado, A. (2002) Identification of microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 2: 24–26.
121. Löschnig, J., Passecker, F. (1954) *Die Marille und ihre Kultur*. Öst. Agrarverlag, Vienna.
122. Lu, Z.X., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G., Rajapakse, S. (1996) Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *HortScience*, 31: 127-129.
123. Lu, Z.X., Sosinski, B., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G., (1998) Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, 41: 199-207.
124. Lu, Z.X., Sossey-Alaoui, K., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G. (1999) Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 115-122.
125. Mády, R., Szalay, L. (2003) Kajszi fajták. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.) *Kajszi. Mezőgazda Kiadó, Budapest*. pp. 85-126.
126. Maghuly, F., Fernandez, E.B., Ruthner, Sz., Pedryc, A., Laimer, M. (2005) Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics and Genomics*, 1: 151-165.

127. Manganaris, A.G., Karayiannis, I., Nianiou, E. (1999b) Polymorphism and genetic studies of isozymes in apricots. *Acta Horticulturae*, 488: 303-308.
128. Manganaris, A.G., Mainou, A. Goudaras, A., Ledbetter C. (1999a) Identification of plum x apricot interspecific hybrids using isoenzyme polymorphism. *Acta Horticulturae*, 488: 361-368.
129. Manubens, A., Lobos, S., Jadue, Y., Toro, M., Messina, R. Lladser, M., Seelenfreund, D. (1999) DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(3): 255-267.
130. Marchese A., Tobutt K., Campisi G., Cartabellotta D., Di Martino V., Marrone G., Caruso T. (2006) Peach germplasm in Sicily: variation in phenology, morphology and molecular traits (*Prunus persica* (L.) Batsch); Il germoplasma autoctono del pesco (*Prunus persica* (L.) Batsch) in Sicilia: aspetti fenologici, morfologici e molecolari. *Italus Hortus*, 13: 118-122.
131. Mariniello, L., Sommella, M.G., Sorrentino, A., Forlani, M., Porta, R. (2002) Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnology Letters*, 24: 749-755.
132. Markert, C.L., Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45:753-763.
133. Martin, G.B., Williams, J.G.K., Tanksley, S.D. (1991) Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 2336-2340.
134. Martínez-Gómez, P., Arulsekhar, S., Potter, D., Gradziel, T.M. (2003a) An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica*, 131: 313-322.
135. Martínez-Gómez, P., Arulsekhar, S., Potter, D., Gradziel, T.M. (2003b) Relationships among peach and almond and related species as detected by SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128: 667-671.
136. Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M. (2002) New approaches to almond breeding at the University of California-Davis Program. *Acta Horticulturae*, 591: 253-256.
137. Martínez-Gómez, P., Sánchez Pérez, R., Rubio, M., Dicenta, F., Gradziel, T.M., Sozzi, G.O. (2005) Application of recent biotechnologies to *Prunus* tree crop genetic improvement. *Cienta E Investigacion Agraria*, 32: 73-96.
138. Martins, M., Farinha, K., Ferreira, E., Cordeiro, V., Monteiro, A., Tenreiro, R., Oliveira, M. (2001) Molecular analysis of the genetic variability of portuguese almond collections. *Acta Horticulturae*, 546: 449-456.
139. Mase, N., Iketani, H., Sato, Y. (2007) Analysis of bud sport cultivars of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) by Simple Sequence Repeats. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1: 20-27.

140. Mehlenbacher, S.A., Cociu, V., Hough, L.F. (1991) Apricots (*Prunus*). In: Moore, J.N., Ballington, J.R. (Eds.), Genetic resources of temperate fruit and nut crops. International Society for Horticultural Science, Wageningen, pp. 65-107.
141. Mendel, D. (1886) Versuche über Pflanzenhybriden. Verband der Naturforshung. Verein Brunn, 4: 3-47.
142. Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M. T., Cipriani, G., Testolin, R. (2004) New set of microsatellite loci isolated in apricot. Molecular Ecology Notes, 3: 432-434.
143. Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M. Cavalli-Sforza, L.L. (1997) Microsat v.1.5d: a computer program for calculating various statistics on 145 microsatellite allele data. <http://lotka.stanford.edu/microsat/microsat.html>.
144. Moissy-Cramayel, I. (1994) A molekuláris markerezés: Hatékony eszköz a nemesítők számára. MTA Növénynemesítési Bizottság GKI, Szeged.
145. Mowrey, B.D., Werner, D.J. (1990) Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isoenzyme markers. Theoretical and Applied Genetics, 80: 129-133.
146. Mullis, K.B., Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. Methods in Enzymology, 155: 350-355.
147. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science, 235: 1616–1622.
148. Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. The American Naturalist, 106: 283–292.
149. Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70: 3321-3323.
150. Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
151. Nishitani, C., Kimura, T., Ueda, E., Howad, W., Arús, P., Yamamoto, T. (2007) Tri-/Hexanucleotide microsatellite markers in peach derived from enriched genomic libraries and their application in *Rosaceae*. Breeding Science, 57: 289-296.
152. Ohta, S., Nishitani, C., Yamamoto, T. (2005) Chloroplast microsatellites in *Prunus*, *Rosaceae*. Molecular Ecology Notes, 5: 837-840.
153. Ozaki, T. Shimada, T. Nakanishi, T. Yamamoto, J. Yoshida, M. (1995) RAPD analysis for parentage determination in *Prunus mume* Sieb Zucc. Journal of the Japanese Society For Horticultural Science, 2: 235-242.
154. Ortiz, A., Renaud, R., Calzada, I., Ritter, E. (1997) Analysis of plum cultivars with RAPD markers. Journal of Horticultural Science, 72: 1-9.
155. Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in Biosciences, 12: 357-358.

156. Pairon, M.C., Jacquemart, A.L. (2005) Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (*Rosaceae*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 5: 729-734.
157. Panaud, O., Chaib, A., Sarr, A. (2002) Dynamic conservation of apricot *Prunus armeniaca* in saharian oases: use of AFLP markers to assess genetic diversity in traditional orchards. *Euphytica*, 128: 301-305.
158. Paran, I., Kesseli, R.V., Michelmore, R.W. (1991) Identification of RFLP and RAPD markers to downy mildew resistance genes in lettuce with near isogenic lines. *Genome*, 35: 1021-1027.
159. Paydas, S., Eti, S., Derin, K., Gulcan, R., Yilmaz, K.U. (2006) *In vitro* investigations on pollen quality, production and self-incompatibility of some apricot varieties in Malatya – Turkey. *Acta Horticulturae*, 701: 75-78.
160. Pedryc, A. (2003) A kajszi nemesítése. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.): *Kajszi*, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
161. Pedryc, A., Ruthner, Sz., Bisztray, Gy., Laimer, M. (2002) A Magyarországon termesztett kajsziarack fajták azonosítása RAPD markerekkel. VIII. Növénynevelési Tudományos Napok Összefoglalói, 26.
162. Pedryc, A., Ruthner, Sz., Bisztray, Gy.D., Laimer, M. (2006) Characterization of different apricot cultivars grown in Hungary with SSR markers. *Acta Horticulturae*, 725: 691-698.
163. Pedryc, A., Ruthner, Sz., Hermán, R., Krska, B., Hegedűs, A., Halász, J. (2009) Genetic diversity of apricot revealed by a set of SSR markers from linkage group G1. *Scientia Horticulturae*, 121: 19-26.
164. Phillips, R.L. (1994) *DNA-based markers in plants*. Kluwer Academic Publishers Boston.
165. Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.
166. Pupko, T., Graur, D. (1999) Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 313–316.
167. Qiang, X., Xiaopeng, Deng, X. (2004) A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa raxburghii* Tratt.) for RFLP and PCR Analyses. *Plant Mol. Biol Rep.*, 22: 301-302
168. Quarta, R., Dettori, M.T., Sartori, A., Verde, I. (2000) Genetic linkage map and QTL analysis in peach. *Acta Horticulturae*, 521: 233-241.
169. Quarta, R., Dettori, M.T., Verde, I., Broda, Z., Gentile, A. (1998) Genetic analysis of agronomic traits and genetic linkage mapping in a BC1 population using RFLPs and RAPDs. *Acta Horticulturae*, 465: 51–59.
170. Quiros, C.F., Hu, J., This, P., Chevre, A.M., Delseny, M. (1991) Development and chromosomal localization of genomic specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 627-632.

171. Raddova, J., Beranek, M., Oukropec, I., Vachun, M., Pidra M. (2003) RAPD analysis of peaches within Czech national collection. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39: 113-119.
172. Rajapakse, S., Belthoff, L.E., He, G., Estager, A.E., Scorza, R., Verde, I., Ballard, R.E., Baird, W.V., Callahan, A., Monet, R., Abbott, A.G. (1995) Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 503–510.
173. Regner, F., Kickenweiz, M., Hack, R. (2004) Genotyping apricots (*Prunus armeniaca*) by SSR markers. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 54: 33-42.
174. Resta, P., Corona, M.G., Fanizza, G., Palasciano, M., Godini, A. (1998) Random amplified DNA polymorphisms in *Amygdalus communis* L. *Acta Horticulturae*, 70: 82-90.
175. Reynolds, J., Weir, B.S., Cockerham, C.C. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
176. Ricciardi, L., Giorgio, V., de Giovanni, C., Lotti, C., Gallotta, A., Fanizza, G. (2002) The genetic diversity of Apulian apricot genotypes (*Prunus armeniaca* L.) assessed using AFLP markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 431-436.
177. Rohlf, F.J. (1993) NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8. Exeter Publications, Setauket, N.Y., USA.
178. Rohrer, J.R., Ahmad, R., Southwick, S.M., Potter, D. (2004) Microsatellite analysis of relationships among North American plums (*Prunus sect. Prunocerasus*, *Rosaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 244: 69-75.
179. Romero, C., Pedryc, A., Munoz, V., Llacer, G., Badenes, M.L. (2003) Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome*, 46: 244-252.
180. Romero, C., Llacer, G., Badenes, M.L., Pedryc, A. (2006) Relationship among apricot cultivars from Hungary and a South European pool determined by SSR Markers. *Acta Horticulturae*, 701: 233-240.
181. Ruthner, Sz., Bisztray, Gy.D., Deák, T., Laimer, M., Pedryc, A. (2003) Characterization of apricot varieties with different origin using molecular markers. *Proceedings of the 4th International Conference of PHD Students*, 11-17 August, 2003: 353-357.
182. Ruthner, S., Pedryc, A., Krska, B., Romero, C., Badenes, M.L. (2006) Molecular characterisation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars using cross species SSR amplification with peach primers. *International Journal of Horticultural Science*, 12(3): 53-57.
183. Saghai-Marooif, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5466-5470.

184. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
185. Salava, J., Wang, Y., Kryska, B., Polak, J., Kominek, P., Miller, W., Dowler, W.M., Reighard, G.L., Abbott, A.G. (2001) Identification of molecular markers linked to resistance of apricot (*Prunus armeniaca* L.) to plum pox virus. www.intl-pag.org. Plant & Animal Genome IX Conference. San Diego, USA.
186. Salesses, G., Dirlwanger, E., Esmenjaud, D., Lecouls, A.C. (1998) Root-knot nematode resistance in Myrobalan plum: inheritance and rootstock breeding perspectives using marker-assisted selection. *Acta Horticulturae*, 478: 45-52.
187. Sánchez-Pérez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arús, P., Martínez-Gómez, P. (2006a) Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae*, 108: 310-316.
188. Sánchez-Pérez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., Martínez-Gómez, P. (2005) Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterisation, protection and genetic relationships. *Scientia Horticulturae*, 103: 305–315.
189. Sánchez-Pérez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., Martínez-Gómez, P. (2006b) SSR-based genetic diversity assessment among apricot cultivars and breeding lines, and its relationship with agronomic traits. *Acta Horticulturae*, 717: 243-246.
190. Schlötterer, C., Amos, B., Tautz, D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354: 63–65.
191. Schueler, S., Tusch, A., Schuster, M., Ziegenhagen, B. (2003) Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.
192. Schwartz, D. (1960) Genetic Studies on Mutant Enzymes in Maize: Synthesis of Hybrid Enzymes by Heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(9): 1210-1215.
193. Scorza, R., Melnicenco, L., Dang, P., Abbott, A.G., Johnson, R.S., Chrisosto, C.H. (2002) Testing a microsatellite marker for selection of columnar growth habit in peach [*Prunus persica* (L.) Bastch]. *Acta Horticulturae*. 592: 285-289.
194. Serrano B., Gómez-Aparisi, J., Hormaza, J.I. (2002) Fingerprinting of *Prunus* rootstocks with microsatellites. *Acta Horticulturae*, 591: 77-81.
195. Sharopova, N. (2008) Plant simple sequence repeats: distribution, variation, and effects on gene expression. *Genome*, 51: 79-90.
196. Shimada, T., Haji, T., Yamaguchi, M., Takeda, T., Nomura, K., Yoshida, M. (1994) Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) by RAPD assay. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 63: 543–551.

197. Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M., Yoshida, M. (1999) Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA analysis. *Euphytica*, 109: 143-147.
198. Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle, H.S., Folta, K.M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T M., Gardiner, S.E., Potter, D., Veilleux, R.E. (2008) Multiple models for *Rosaceae* genomics. *Plant Physiology*, 147: 985-1003.
199. Sicard O., Marandel G., Soriano J. M., Lalli D. A., Lambert P., Salava J., Badenes M. L., Abbott A., Decroocq V. (2007) Flanking the major Plum pox virus resistance locus in apricot with co-dominant markers (SSRs) derived from candidate resistance genes. *Tree Genetics & Genomes*, 4: 359-365.
200. Sonneveld, T., Robbins, T.P., Boskovic, R., Tobutt, K.R. (2001) Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1046-1055.
201. Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T.M., Epperson, B.K., Martínez-Gómez, P., Asadi, E. (2007) Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 156(3): 327-344.
202. Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L.D., Beck, L.E., King, G.J., Ryder, C.D., Rajapakse, S., Baird, W.V., Ballard, R.E., Abbott, A.G. (2000) Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 421-428.
203. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.
204. Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., Glössl, J. (1997) Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6: 1189-1194.
205. Stockinger, E. J., Mulinix, C. A., Long, C. M., Brettin, T. S., Iezzoni, A. F. (1996) A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *Journal of Heredity* 87:214-218.
206. Struss, D., Boritzki, M., Glozer, K., Southwick, S.M. (2001) Detection of genetic diversity among populations of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by AFLPs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76: 362-367.
207. Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M., Boritzki, M. (2003) Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6): 904-909.
208. Sturtevant, A.H., (1913) The linear arrangement of six-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14: 43-59.
209. Surányi, D. (2003) A kajszi jelentősége, termesztésének története és helyzete. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.): *Kajszi*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp.11-29.

210. Schwartz, D. (1960) Genetic studies on mutant enzymes in maize synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 46: 1210-1215.
211. Szabó, Z., Nyéki, J. (1991) Blossoming, fructification and combination of apricot varieties. *Acta Horticulturae*, 293: 295-302.
212. Takeda, T., Shimada, T., Nomura, K., Ozaki, T., Haji, T., Yamaguchi, M., Yoshida, M. (1998) Classification of apricot varieties by RAPD analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67: 21-27.
213. Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T.M., Dandekar, A.M., Sugiura, A. (1997) Identification of stelar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant and Cell Physiology*, 38: 304-311.
214. Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
215. Tautz, D., Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10): 4127-4138.
216. Tavaud, M., Zanetto, A., David, J.L., Laigret, F., Dirlewanger, E. (2004) Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity*, 93: 631-638.
217. Tavaud, M., Zanetto, A., Santi, F., Dirlewanger, E. (2001) Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry trees using AFLP markers. *Acta Horticulturae*, 546: 263-269.
218. Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, T., Pancaldi, M., Sansavini, S. (2000) Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43: 512-520.
219. Testolin, R., Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M. T., Huang, W. G., Cipriani, G. (2004) Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Molecular Ecology Notes*, 3: 459-461.
220. Timon, B. (2000) Az őszibarack genetikai bázisa, a fajták származása. In: Timon, B. (Szerk.): *Őszibarack*, Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 42-48.
221. Torres, A.M. (1983) Fruit trees. In: Tanksley, S.D., Orton, T.J. (Eds.): *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam, pp. 401-421.
222. Torress, A.M., Weeden, N.F., Martin, A. (1993) Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers. *Plant Physiology*, 101: 394-452.
223. Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
224. Törjék O. (2001) Különböző nyár, búza és kender genotípusok molekuláris (RAPD, SSR, AFLP, és SCAR) jellemzése. *Doktori Értekezés*, Gödöllő.
225. Vavilov, N.I. (1926) The mountainous districts as the home of agriculture. *Studies on the origin of cultivated plants. Bulletin of Applied Botany in: Plant Breeding*, 16: 218-220.

226. Vavilov, N.I. (1951) Phylogeographic basis of plant breeding. *Chronica Botanica*, pp. 13–54.
227. Verde, I., Quarta, R., Cedrola, C., Dettori, M.T., (2002) QTL analysis of agronomic traits in a BC1 peach population. *Acta Horticulturae*, 592: 291-297.
228. Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L. (2003) An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 239-247.
229. Vilanova, S., Soriano, J.M., Lalli, D.A., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L. (2006) Development of SSR markers located in the G1 linkage group of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using a bacterial artificial chromosome library. *Molecular Ecology Notes*, 6: 789-791.
230. Viruel, M.A., Madur, D., Dirlewanger, E., Pacasl, T., Kervella, J. (1998) Mapping quantitative trait loci controlling peach leaf curl resistance. *Acta Horticulturae*, 465: 79-87.
231. Viruel, M.A., Messeguer, R., de Vicente, M.C., Garcia-Mas, J., Puigdomenech, P., Vargas, F., Arús, P. (1995) A linkage map with RFLP isozyme markers for almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 964-971.
232. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
233. Wang, D., Karle, R., Brettin, T.S., Iezzoni, A.F. (1998) Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1217–1224.
234. Wang, D., Karle, R., Iezzoni, A.F. (2000) QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 535-544.
235. Wang, Y., Georgi, L.L., Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Scorza, R., Abbott, A.G. (2002) High-throughput targeted SSR marker development in peach (*Prunus persica*). *Genome*, 45: 319-328.
236. Warburton, M.L., Bliss, F.A. (1996) Genetic Diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *Journal of the American Horticultural Science*, 12: 1012-1019.
237. Weber, J.L. (1990) Informativness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 4: 524-530.
238. Welsh, J., McClelland (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
239. Welsh, J., Honeycutt, R. McClelland, J.M., Sobral B.W.S. (1991) Parentage determination in maize hybrids using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl. Genet.* 82:473-476.
240. Wen, X.P, Deng X.X. (2002) The extraction of genomic DNA from five species of *Rosa*. *Seed*, 126: 18-21.

241. White, K.D. (1970) Roman farming. Cornell University Press, Ithaca State, USA.
242. Wierdl, M., Dominska, M., Petes, T.D. (1997) Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*, 146: 769-779.
243. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
244. Wu, J., Shu, H.R., Zhang, X.N., Zhang, K.C., Wang, L.J. (2004) Cloning and sequence analysis of AFLP-specific fragment related to fruit non-acid/acid trait of peach. *Journal of Fruit Science*, 21(6): 526-529.
245. Wünsch, A., Carrera, M., Hormaza, J.I. (2006) Molecular characterization of local spanish peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 5: 925-932.
246. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2002a) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125: 59-67.
247. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2002b) Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Heredity*, 89: 56-63.
248. Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y., Ma, R.C. (2006) SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 366-372.
249. Xu, Y., Ma, R.C., Xie, H., Liu, J.T., Cao, M.Q. (2004) Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome*, 47: 1091-1104.
250. Yamamoto, T., Hayashi, T. (2002) New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. *Scientia Horticulturae*, 96: 81-90.
251. Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Shi, I.Z., Ogiwara, I., Hayashi, T. (2002) Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes*, 2: 298-302.
252. Yamamoto, T., Shimada, T., Imai, T., Yaegaki, T., Haji, T., Matsuta, N., Yamaguchi M., Hayashi, T. (2001) Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach. *Breeding Science*, 51: 271-278.
253. Yon, M., RongCai, M. (2004) Identification of genetic relationship among almond accessions by AFLP. *Journal of Fruit Science*, 21(6): 552-555.
254. Yu, M.L., Ma, R.J., Xu, J.L., Shen, Z.J., Zhang, Z. (2004) Identification of genetic relationship of peach species by SSR. *Journal of Fruit Science*, 21: 106-112.
255. Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Gorina, V.M., Abbott, A.G., (2003) Microsatellite (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 435-444.
256. Zhebentyayeva T., Reighard G., Gorina V., Abbott A. (2004) Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 435-444.

257. Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Lalli, D., Gorina, V.M., Krška, B., Abbott, A.G. (2008) Origin of resistance to plum pox virus in apricot: what new AFLP and targeted SSR data analyses tell. *Tree Genetics and Genomes* 3: 403-417.
258. Zhebentyayeva, T.N., Sivolap, Y.M. (2000) Genetic diversity of apricot determined by isoenzyme and RAPD analyses. *Acta Horticulturae*, 538: 525-529.
259. Zhou, L., Kappel, F., Hampson, C., Viersma, P.A., Bakkeren, G. (2002) Genetic analysis and discrimination of sweet cherry cultivars and selections using amplified fragment length polymorphism fingerprints. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 786-792.
260. Zohary D., Hopf, M. (1994) *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press.

M2. DNS-kivonási protokollok

DNS-kivonás protokoll 1 /javított amerikai bab módszer/

1. 0,5 g fiatal levél
2. hozzáadni 200 µl extrakciós puffert
3. dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel eldörzsölni
4. hozzáadni 200 µl extrakciós puffert
5. 1,5 ml-es eppendorf csőbe áttölteni
6. 100 µl extrakciós pufferrel átmosni a dörzsmozsarat
7. összerázni a csövet, ha kétfázisú
8. 65°C-on, 45 perc-1 óra vízfürdőben inkubálás
9. centrifuga 10000 fordulat/perc, 10 perc szobahőmérséklet
10. felülúszót eppendorf csőbe átönteni
11. + kétszeres mennyiségű (kb. 1ml) 95% alkohol+ 7,5 M ammónium-acetát (6/1 arány) cső átforgatása
12. -20°C-ra 30 perc inkubálás
13. centrifuga 5000 fordulat/perc, 5 perc 0°C
14. felülúszót kiönteni óvatosan másik eppendorf csőbe majd itatós papírra
15. üledéket meglazítani + 300 µl TE puffer
16. a feloldódott üledékhez +10 µl RN-áz
17. 37°C-on 1 óra inkubálás centrifugálás 14000 fordulat/perc, 10 mp. 0 °C
18. ha van üledék→új csőbe
19. +1 ml 95% etanol+1 M Na-acetát (20/1)⇒tárolható
20. -20°C 30 perc inkubálás
21. centrifugálás 5000 fordulat/perc, 5 perc, 0°C
22. felülúszó leöntése (biztos módszerrel)
23. üledékhez +1 ml 70%-os alkohol
24. vortex (pár másodpercig)
25. centrifugálás 14000 fordulat/perc, 15 mp. 0°C
26. leöntés biztos módszerrel
27. lépések ismétlése: 24.+25.+26.+27.
28. steril papírvattára fülkében lecsöpögtetni
29. a kapott DNS-t 200 µl (0,1)TE pufferben feloldani

DNS-kivonás protokoll 2 /kajszira optimalizált CTAB -módszer/

1. 0,1 g fiatal levelet folyékony nitrogénben eldörzsölni 1ml extrakciós pufferrel, eppendorf csőbe rakni
2. 30 percig inkubálni, 60°C-on
3. kloroform/butanol (24/1) keverékkel összerázni, annyival, hogy az eppendorf tele legyen
4. 4500 fordulat/perc, 5 perc centrifuga
5. Üledék feletti folyékony fázist óvatosan átöntjük egy másik eppendorfba
6. 0,8-1 ml hideg 95%-os alkoholt adunk hozzá
7. 5 percig, -20°C-ra rakjuk
8. 4500 fordulat/perc, 3 perc centrifuga
9. felülúszó eltávolítása óvatosan pipettával
10. üledékhez 600 µl 1 M NaCl oldat (gyengéden feloldjuk)
11. 60°C-on, 10 perc inkubálás
12. 300 µl tisztított fenollal finoman összevegyítjük
13. 4500 fordulat/perc, 3 perc centrifuga
14. felülúszó óvatosan pipettával másik eppendorfba
15. 500 µl kloroformmal keverjük
16. 4500 fordulat/perc, 5 perc centrifuga
17. felülúszó másik eppendorfba
18. 1 ml hideg 95%-os alkoholt adunk hozzá
19. 30 percig, -20°C-on inkubáljuk
20. 4500 fordulat/perc, 5 perc centrifuga, felúszó eltávolítása óvatosan pipettával
21. 75%-os alkohollal mossuk (alkohol leöntése óvatosan), egyszer, ha koszos, kétszer
22. steril boxban 10-15 percig szárítom, de nem hagyom teljesen kiszáradni
23. 300 µl vízben oldom

DNS-kivonás protokoll 3 /Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit módszer/

1. 0,5 g levél eldörzsölés folyékony nitrogénben
2. mintát eppendorfbba helyezni
3. 400 µl AP1 puffer hozzáadása
4. 4 µl RN-áz hozzáadása
5. rázatás vortex-szel
6. 65°C 10 perc inkubálás, 2-3-szori átforgatással
7. 130 µl AP2 puffer hozzáadása, összekeveredni és 5 perc inkubálás jégen
8. lila eppendorfbba (QIAshredder) átönteni a lizátumot
9. 2 perc centrifugálás max. sebességgel
10. a szűrlet új eppendorfbba kerül kb. 450 µl
11. 225 µl AP3 puffer hozzáadása
12. 450 µl etanol hozzáadása
13. keverés vágóthegyű pipettával
14. ebből 650 µl üledékkel együtt a fehér DNS-szűrő eppendorfbba pipettával átvinni
15. 1 perc centrifugálás 8000 fordulat/perc
16. 14. és 15. lépés megismétlése a maradék lizátummal
17. DNS-szűrő áthelyezése új 2 ml-es gyűjtőcsőbe
18. 500 µl AW puffer és alkohol hozzáadása
19. 1 perc 8000 fordulat/perc (folyadék kiöntése)
20. 500 µl AW puffer hozzáadása
21. 2 perc centrifugálás maximum sebességgel (membrán kiszáradjon)
22. DNS-szűrőt új eppendorfbba helyezzük
23. 100 µl 65°C AE puffert a membránra juttatva átmoszuk
24. 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk
25. 1 perc centrifugálás 8000 fordulat/perc
26. 23., 24., 25. lépések megismétlése.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőm, **Dr. Pedryc Andrzej** segítségét és támogatását, hogy ilyen hosszú idő elteltével is hitt abban, hogy be fogom fejezni a megkezdett munkát.

A felkészülésem és a munkám során számos segítséget kaptam itthon és külföldön egyaránt, amiért sok köszönettel tartozom a következő Kollégáknak:

Dr. Amy Iezzoni (MSU)
Dr. Nathanael Hauck (MSU)

Dr. Margit Laimer (BOKU)
Dr. Fatemeh Maghuly (BOKU)

Dr. Marissa Badenes (IVIA)
Dr. José Miguel Soriano (IVIA)

Dr. Bordács Sándor (MgSzH)
Szani Zsolt (MgSzH)
Dr. Bisztray György (BCE)
Deák Tamás (BCE)
Németh Noémi (VSZT)

Szeretném megköszönni a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszék valamennyi munkatársának segítőkészségét és kedvességét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom feleségemnek, aki türelemmel és megértéssel viselte az értekezés megírásának időszakát.