

Különböző nyár, búza és kender genotípusok molekuláris (RAPD, SSR, AFLP és SCAR) jellemzése.

Doktori értekezés

Törjék Ottó

Gödöllő 2001.

Doktori iskola:	Növénytudományi Doktori Iskola
Vezetője:	Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár, az MTA doktora SZIE, Növényvédelem Tanszék
Tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
Program:	Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel
Programvezető:	Dr. Heszky László tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA levelező tagja SZIE, Genetika és Növénynemesítés Tanszék
Témavezető:	Dr. Kiss Erzsébet egyetemi tanár, a mezőgazdaságtudomány kandidátusa SZIE, Genetika és Növénynemesítés Tanszék

Dr. Heszky László programvezető Dr. Kiss Erzsébet témavezető

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	
Rövidítések jegyzéke	
1. Bevezetés és célkítűzés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. Genetikai markerek	3
2.2. PCR alapú molekuláris markerek	5
2.2.1. RAPD és AP-PCR analízis	5
2.2.2. Mikroszatellit (SSR) polimorfizmus	6
2.2.3. AFLP anlízis	8
2.3. Kapcsolt markerek azonosítására alkalmas növényi populációk	8
2.3.1. Közel izogén vonalak vizsgálata	9
2.3.2. Fenotípusos csoportok vizsgálata	9
2.3.3. Rekombináns beltenyésztett vonalak	10
2.3.4. DH vonalak vizsgálata	11
2.4. Nyár (<i>Populus sp</i> .) fajok molekuláris vizsgálata	11
2.5. A búza molekuláris vizsgálata	13
2.6. Molekuláris vizsgálatok kétlaki növényekben	18
2.6.1. Ivardetermináció kétlaki növényekben	18
2.6.2. Ivarspecifikus markerek azonosítása kétlaki növényekben	20
3. Anyag és módszer	23
3.1. Növényanyag	23
3.1.1. Nyárminták	23
3.1.2. Búzaminták	23
3.1.3. Kenderminták	24
3.2. DNS-izolálás	24
3.2.1. DNS-izolálás nyárból	24
3.2.2. DNS-izolálás búzából és kenderből	25
3.3. A DNS minőségének ellenőrzése	26
3.4. RAPD, AP-PCR, SSR, STS és SCAR analízis	26
3.5. A PCR-termékek gélelektroforézise	27
3.6. AFLP analízis	27
3.7. Klaszter- és MDS-analízis	29
3.8. DNS-fragmentumok izolálása alacsony olvadáspontú gélből	30
3.9. Klónozás plazmid vektorba	31
3.10. Kompetens sejtek előállítása	32
3.11. Kompetens sejtek transzformálása és szelekciója	32
3.12. Kolónia-PCR	33
3.13. Plazmid-DNS izolálás	33
3.14. Plazmid-szekvenálás	34
3.15. A klónozott fragmentumok kinyerése plazmidból	34
3.16. Szekvencia-analízis	34
3.17. RAPD mintázatok Southern analízise	34

	•
3.17.1. Gélek blottolása	34
3.17.2. A próba DNS-ek digoxigenines jelölése	35
3.17.3. Prehibridizáció és hibridizáció	35
3.17.4. Színreakció	36
3.18. Genomiális Southern analízis	36
3.19. SCAR markerek tervezése	36
3.20. Pufferek és oldatok	36
3.21. A vizsgálatok során felhasznált kit-ek	38
4. Eredmények	39
4.1. Államilag elismert hazai nyár klónok molekuláris polimorfizmusa	39
4.2. Búzafajták és DH származékaik RAPD, SSR, STS és AFLP analízise	42
4.2.1. RAPD analízis	42
4.2.2. SSR és STS analízis	44
4.2.3. AFLP analízis	46
4.3. Ivari markerek azonosítása és vizsgálata kenderben	47
4.3.1. RAPD analízis	47
4.3.2. Az ivarhoz kapcsolt markerek klónozása	50
4.3.3. Southern analízis	51
4.3.4. Szekvencia analízis	52
4.3.5. SCAR analízis	54
4.3.6. F_2 nemzedék SCAR analízise	55
4.4. Új tudományos eredmények	56
5. Megvitatás	58
5.1. Nyár genotípusok RAPD és AP-PCR analízise	58
5.1.1. A nyár genotípusok közötti genetikai távolságok becslése a RAPD	
és AP-PCR fragmentumok alapján	58
5.1.2 Faj- és hibrid specifikus mintázatok	59
5.2. Búzafajták és dihaploid származékaik homogenitásának vizsgálata	
molekuláris módszerekkel	60
5.2.1. A különböző markerezési technikák alkalmasságának értékelése a	
fajtákon vagy DH vonalakon belüli különbségek kimutatásában	60
5.2.2. A különböző csoportok homogenitásának megítélése a molekuláris	
markerek alapján	62
5.3. Ivarhoz kapcsolt RAPD markerek azonosítása és vizsgálata egy- és	
kétlaki kenderben	63
5.3.1. RAPD analízis	63
5.3.2. Szekvencia-analízis és Southern vizsgálatok	66
5.3.3. SCAR markerek, F_2 vizsgálat	67
6. Összefoglalás	71
Summary	73
Irodalomjegyzék	75
Függelék	85
Köszönetnyilvánítás	93

Rövidítések jegyzéke

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
APS	Ammóniumperszulfát
bp	Bázispár
BSA	Bulked Segregant Analysis
cDNS	copy DNS
СТАВ	Cetil-trimetil-ammónium-bromid
DH	Doubled Haploid
EDTA	Etiléndiamintetraecetsav
EST	Expressed Sequence Tags
H_2Odd	Steril bidesztvíz
HMW	High Molecular Weight
IPTG	Izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
cpDNS	Kloroplasztisz DNS
LMP	Low Melting Point
LMW	Low Molecular Weight
MDS	Multidimensional analysis
mtDNS	Mitokondriális DNS
NILs	Near-Isogenic Lines
OD	Optikai denzitás (sűrűség)
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RILs	Recombinant Inbred Lines
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	Fordulatszám/perc
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SDS	Nátriumdodecilszulfát

SM	Simple matching
SSR	Simple Sequence Repeat
STS	Sequence Tagged Site
THC	Tetra-Hidro-Cannabinol
Temed	N,N,N',N'-tetrametiléndiamin
Tris	Tris (hidroximetil) aminometán
U	Egység (unit)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method of Arithmetic means
UV	Ultraibolya
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
v/v	Térfogat/térfogat
w/v	Tömeg/térfogat
WMS	Wheat microsatellites
X-gal	5-bróm-4-klór-3-indolil-8-D-galaktopiranozid

BEVEZETÉS ÉS CÉLKÍTŰZÉS

A termesztett növények genetikai variabilitásának növelésére irányuló genetikai kutatások évtizedeken keresztül a fenotípus megfigyelésén és elemzésén alapultak. A fenotípus-genotípus kölcsönhatás vizsgálatán szelekció hatékonyságát alapuló befolyásolja a környezet, a kvantitatív nagymértékben tulajdonságok poligénes öröklésmenete, a teljes vagy részleges dominancia viszonyok, amelyek a génexpressziót módosítják és a genetikai analízist megnehezítik. Ezzel magyarázható, hogy a DNS elemzésen alapuló genetikai markerek egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert a ma és a jövő növénynemesítésében. A PCR-en (Polymerase Chain Reaction; Saiki et al. 1985) alapuló módszerek a nukleotid szekvenciában tapasztalható különbségek, azaz az allélpolimorfizmusok kimutatására alkalmas technológiát kínálnak.

A dolgozat három kutatási területen végzett eredményeket foglalja össze nyár, búza és kender fajokban. Az egyes területek fő célkitűzései a következők voltak:

Államilag elismert nyár klónok molekuláris analízise.

Hazánkban az összes erdősültségben 9,5 %-os területarányt képviselő nyárültetvények az éves fakitermelés egy ötödét szolgáltatják ma. A keresztezéses nyárfanemesítés rendkívül hosszú időt igényel, egy-egy új hibrid előállítása több évtizedig is eltarthat. Heterózishatás a beltenyésztett és egymással nem közeli rokon genotípusok keresztezésével érhető el. A megfelelő szülői partnerek kiválasztása ezért rendkívül fontos feladat, amelyhez plusz információt adhatnak a nyárfajok és hibridek klónjaiban végzett molekuláris vizsgálatok.

Vizsgálataink célja ezért a Magyarországon államilag elismert nyár (*Populus sp.*) klónok közötti genteikai távolságok becslése és a nyárfajok valamint hibridek klónjainak megkülönböztetésére alkalmas RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA; Wiliams et al. 1990) és AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR; Welsh and McClelalland 1990) markerek azonosítása volt.

Hagyományos és DH búzafajták összehasonlító molekuláris elemzése

Az androgenetikus eredetű "Doubled Haploid" (DH) vonalak nemesítési értékét a genetikai stabilitásuk adja. A DH vonalak és fajták, valamint a hagyományos módszerekkel

előállított fajták a több éve folytatott szántóföldi kisparcellás kísérletekben hasonló teljesítményűnek és alkalmazkodó képességűnek bizonyultak (Kertész et al. 1998). Szignifikáns különbségeket citológiai vizsgálatokkal sem sikerült kimutatni (Mázikné Tőkei et al. 1999).

A GK Góbé (hagyományos nemesítéssel előállított) és GK Délibáb (androgenetikus eredetű) fajták, valamint a belőlük előállított DH vonalak (egyszeres és kétszeres DH vonalak) molekuláris polimorfizmusát RAPD, SSR (Simple Sequence Repeat; Jacob et al. 1991), STS (Sequence Tagged Site; Olson et al. 1989) és AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al. 1995) technikákkal vizsgáltuk és hasonlítottuk össze abból a célból, hogy adatokat kaphassunk az egyes csoportok molekuláris hátteréről.

Ivarspecifikus molekuláris markerek azonosítása és vizsgálata kenderben

A növények ivarát az ivari dimorfizmus hiánya miatt, fenotípus alapján a legtöbb kétlaki növényfajban virágzás előtt nem lehet megállapítani. Ezekhez a növényfajokhoz tartozik a kétlaki kender is, amelyben az ivardetermináció mechanizmusa sincs tisztázva. Ezeknek a problémáknak a megoldásában nyújthatnak segítséget a molekuláris technikák. Megfelelő markerek segítségével lehetővé válik a korai ivarmeghatározás, amely a markerre alapozott szelekcióban használható. Ezek a markerek plusz információt jelentenek az ivardetermináció mechanizmusának tanulmányozásában is.

Kísérleteinkben ivarhoz kapcsolt molekuláris markerek azonosítását tűztük ki célul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Genetikai markerek

A genetikai marker olyan fenotípusos vagy genotípusos jelzés, amely kísérletes próbaként használható az egyed, a sejtmag, a kromoszóma vagy a DNS jelölésére. A genetikai marker kapcsolódhat a fenotípushoz (pl. morfológiai marker), vagy a genotípushoz (molekuláris marker). A molekuláris markerek két nagy csoportját a fehérje-, valamint a nukleinsav markerek jelentik. A genomnak valószínűleg valamennyi allélformája alkalmazható genetikai markerként (Moissy-Cramayel 1994). Segítségükkel feltárhatók a növénypopulációkban meglévő változatosságok, amelyeket a növénynemesítők a fajta-előállítás során felhasználhatnak.

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 (*Drosophila melanogaster*) X-kromoszómájának kapcsoltsági térképét készítette el 5 morfológiai marker alapján. Hasonló vizsgálatokat növényekben először Bridges (1914) folytatott *Lathyrus* (lednek) és *Primula* (kankalin) növényfajokban. A 60-as évek végéig morfológiai, agronómiai és élettani tulajdonságokat meghatározó alléleket használtak genetikai markerként.

A morfológiai markerek monogénes, fenotípusosan megjelenő, domináns/recessziv úton öröklődő tulajdonságok. A korai szelekcióhoz legtöbbször nem elég informatívak, és a tulajdonságok gyakran erősen korrelálnak egymással. Ezenkívül a környezeti kölcsönhatások (termőhely, évjárat) is jelentősen csökkentik a morfológiai markerek megbízhatóságát (Moissy-Cramayel 1994). A morfológiai markerek alapján a gabonafélék közül árpában végezték a legszélesebb körű kapcsoltsági vizsgálatokat (von Wettstein-Knowles 1992). Búzában ezeknek a markereknek az alkalmazhatóságát jelentősen csökkenti az allohexaploid genom, mert a recesszív gének fenotípusos expresszióját a másik két genom homeológ lókuszain található allélek gyakran elfedik (Gale et al. 1990).

A 70-es évek elejétől kezdődően a biokémiai markerek csopotjába tartozó izoenzim (Markert-Moller 1959) és tartalékfehérje markerek terjedtek el. Ezek a transzlációs termékek rendszerint kodominánsan öröklődnek és gyakran már csíranövény-korban is kimutathatóak. Izoenzim markerekkel Koebner et al. (1988) szoros kapcsoltságot mutatott

ki a szártörő rozsda (*Pch1*) rezisztencia és az endopeptidáz (*Ep-D1b*) lókusz között. Rousset et al. (1992) és Dachkevitch et al. (1993) búza tartalékfehérjék és a sütési paraméterek között találtak szoros kapcsoltságot. Az izoenzim és tartalékfehérje markerek száma kevés, ezért a növénynemesítésben ezeket a markereket csak kismértékben, elsősorban a szelekcióban alkalmazzák (Tanksley 1983). Nemzetközi hivatalos fajtakísérletekben kiegészítő adatként ugyancsak használatosak a fajtajelöltek megkülönböztethetőségének, homogenitásának és származásának bizonyításában.

A 80-as évek elejétől a nukleinsav alapú (DNS) markerek terjedtek el a genomanalízisben. Segítségükkel az örökítő anyag közvetlen vizsgálata vált lehetővé. A fenotípusos, izoenzim és tartalékfehérje markerekkel szemben a nukleinsav markerek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek (Hartl et al. 1995): a) számuk elvileg korlátlan, b) a DNS szekvenciák fajok között és fajon belül is nagyfokú variabilitást mutatnak, c) a genomnak nemcsak a kódoló részeit reprezentálják, d) környezeti és episztatikus hatások nem befolyásolják.

A nukleinsav markerek közül korábban az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein et al. 1980), az utóbbi évtizedben pedig a PCR alapú technikák terjedtek el. Az RFLP vizsgálatokkal kapott különbségeket a restrikciós endonukleáz hasítóhelyek szekvenciáiban végbement mutációk következtében fellépő fragmentumok hosszúságának polimorfizmusa eredményezi, amelyeknek a detektálásához jelölt DNS-próbákat használnak. A polimorfizmust a hasítóhelyekben bekövetkező pontmutációk, vagy a hasítóhelyek közötti szekvenciákat érintő inverziók, deléciók, inszerciók, duplikációk és transzlokációk okozzák. A kimutatáshoz felhasznált próbák lehetnek klónozott gének, cDNS szekvenciák, genomikus klónok vagy szintetikus oligonukleotidok (Beckmann és Soller 1986). Búzában Devos et al. (1992) és Dvorak et al. (1993) és rokonsági viszonyok vizsgálatára használta az RFLP módszert.

A másfél évtizedel ezelőtt felfedezett PCR analízis (Saiki et al. 1985) számos új markerezési technika kidolgozását tette lehetővé, amelyek az eddig ismertetett genetikai markereknél sok tekintetben előnyösebbek (Kiss 1999, Nagy 1999). Ebben a kéziratban csak a disszertáció témája keretein belül alkalmazott PCR alapú markerezési módszereket mutatjuk be.

2.2. PCR alapú molekuláris markerek

2.2.1. RAPD és AP-PCR analízis

A RAPD az egyik legismertebb PCR alapú technika, amelyet felfedezése óta (Williams et al. 1990) a genetikai vizsgálatokban széleskörűen alkalmaznak. Ezzel a módszerrel a genom ismeretlen DNS szekvenciái szaporíthatók fel egyetlen random oligonukleotid primer felhasználásával. Az AP-PCR analízis elve a RAPD módszer elvével megegyezik és ugyanabban az évben írták le (Welsh és McClelland 1990). A két módszer lényegében csak a felhasznált primerek hosszúságában különbözik egymástól. A RAPD primerek rendszerint 10 bp hosszúságú random szekvenciák (tervezésükkor bizonyos szabályokat figyelembe vesznek: GC tartalom 50 és 80 % közötti, palindrom részeket nem tartalmaznak). Az AP-PCR reakcióban alkalmazott oligonukleotidok hosszabbak (általában célszekvencia felszaporítására alkalmas primerpárok valamelyik tagját használják fel random primerként). Ennek megfelelően, amíg a RAPD módszernél legtöbbször 36–40 °C kapcsolódási hőmérsékletet állítanak be, az AP-PCR reakcióban ez a hőmérséklet a primer hosszúságától

A RAPD és AP-PCR módszerekkel legtöbbször 2-10 fragmentum amplifikálható, melyek mérete 200 és 2000 bp közötti (Gassen 1996, Kiss 1999). A genomiális (templát) DNS mentén akkor szintetizálódnak fragmentumok, ha a primerkötőhelyek amplifikálható távolságban vannak egymástól és az ellentétes DNS szálon helyezkednek el. A kapott fragmentumokat rendszerint agaróz gélelektroforézissel választják el és detektáláshoz a fragmentumokat etidium-bromiddal festik. A RAPD és AP-PCR technikák előnye, hogy a reakciók kivitelezése egyszerű, a templát DNS igényük kicsi és viszonylag gyorsan lehet velük eredményekhez jutni. A RAPD és AP-PCR technikák legtöbbször domináns markereket eredményeznek. А különböző genotípusok mintázataiban fellelhető polimorfizmusokat a primerkötőhelyekben vagy az amplifikált régióban meglévő különbségek (deléciók, inszerciók és inverziók) eredményezik. A RAPD és AP-PCR módszerek kiválóan alkalmasak kapcsolt markerek azonosítására, kapcsoltsági térképek készítésére viszont már kevésbé. Ennek okai, hogy: a) a RAPD reakciók ismételhetősége gyakran problémát okoz, b) a kapott markerek csak korlátozott mértékben alkalmazhatók egy másik populáció vizsgálatára és c) a domináns markerekkel kapott információk értéke hasadó (F₂) nemzedékben kb. fele akkora, mint a heterozigóták detektálását is lehetővé tevő

kodomináns markereké (Allard 1956). Rekombináns *Arabidopsis* beltenyésztett vonalak (Reiter et al. 1992) vagy erdei fenyő DH populációk (Neale és Sedorf 1991) vizsgálatakor viszont a domináns markerek ugyanolyan értékűnek bizonyultak, mint a kodomináns markerek.

A RAPD és AP-PCR reakciókkal kapott véletlenszerű fragmentumok lehetnek kis ("single copy") közepes vagy nagy kópiaszámban ismétlődő genomszekvenciák részei is (Williams et al. 1990).

Az eredmények ismételhetősége gyakran problémát okoz, mivel ezek a technikák a beállított reakciókörülményekre, valamint a DNS mennyiségére és minőségére különösen érzékenyek. Az utóbbi években egyre több kutatócsoport számolt be arról, hogy a reakciók összehasonlíthatósága szempontjából az is fontos, hogy a genomiális DNS-t ugyanabból a növényi részből izolálják-e. A különböző növényi szöveteknek nemcsak a metilezettsége lehet eltérő (Arnholdt-Schmitt et al. 1995), hanem többek szerint "szervspecifikus polimorfizmusok" is okozhatnak különbségeket a PCR mintázatokban. Donini et al. (1997) AFLP technikával akkor is talált konzekvensen jelentkező szervspecifikus polimorfizmust, ha metilezésre nem érzékeny enzimeket használt fel a genomiális DNS hasítására. A RAPD és AP-PCR rekciók metilezésre nem érzékenyek, de az előző kísérlethez hasonlóan Bitonti et al. (1996) polimorf fragmentumokat mutatott ki különböző fejlettségű (differenciálódott) *Trapa natans* levelek RAPD mintázataiban. Egy másik kísérlet során Bogani et al. (1996) különböző fiziológiai állapotban lévő szövettenyészetekben mutatott ki különbségeket RAPD módszerrel.

А RAPD és AP-PCR módszerek felhasználhatók: intraspecifikus interés polimorfizmusok kimutatására, genetikai különbözőség és/vagy rokonsági fok megállapítására, tulajdonságok térképezésére, fajták és beltenyésztett vonalak homogenitásának vizsgálatára és kapcsolt markerek azonosítására. Hátrányaik miatt azonban a kapott markereket célszerű SCAR (Sequence Characterized Amplified Region, Paran és Michelmore 1993) vagy STS markerekké konvertálni (Kurata et al. 1994).

2.2.2. Mikroszatellit (SSR) polimorfizmus

A mikroszatellit elnevezést először Litt és Luty (1989) alkalmazta. A mikroszatellitek a miniszatellitekhez hasonlóan (Jeffreys et al. 1985) elsősorban az eukarióta genomban

előforduló és nagy variabilitást mutató szekvenciák, amelyek ismétlődő bázispármotivumokból (mikroszatellitek 2-8 bp; miniszatellitek 16-64 bp) épülnek fel. A különböző genotípusokban fellelhető variabilitás mindkét esetben az ismétlődő motívumok számából adódik. Ezeket a markereket összefoglaló néven VNTR-nek (Variable Number of Tandem Repeats) nevezik. Kimutatásuk egyik lehetséges módja, hogy az ismétlődő szekvenciákra specifikus, jelölt szintetikus oligonukleotid próbákkal Southern analízist végeznek. Másik lehetőség, hogy a szatellitek határrégióira - amelyek fajon belül általában konzervatív szekvenciák - tervezett specifikus primerekkel PCR analízist végeznek. Az oligonukleotid primerek szintéziséhez az ismétlődésekkel először egy adott génkönyvtár klónjait tesztelik, majd a detektált pozitív klónok szekvenálása után a szatellitek határszekvenciáira specifikus a primerekkel primereket terveznek. Az ezekkel indított PCR reakció után, ismétlődő szekvenciák motivumai számából gélelektroforézissel adódó az hosszpolimorfizmus mutatható ki a kérdéses lókuszra polimorf genotípusoknál. A miniszatellitek elsősorban a szubtelomérás régiókban fordulnak elő (Armour at al. 1989), a mikroszatellitek pedig a genomban szétszórtan helyezkednek el (Weber 1990). A mikroszatellitek általában rövidebbek, ezért PCR reakcióval könnyebben amplifikálhatók (Jeffreys et al. 1998). Mivel a mikroszatellitek nagyfokú polimorfizmust mutatnak kapcsoltsági térképek készítéséhez ezeket gyakran használják.

A növényekben mikroszatellitekkel először Condit és Hubell (1991) végzett kísérleteket. Kukorica és trópusi fafajok genomjait vizsgálták, melyekben az AC és AT ismétlődések gyakorisága 5 x 10^3 és 3 x 10^5 kópiaszám közötti. Adatbanki szekvenciák analízisével (Wang et al. 1994; Morgante és Olivieri 1993) és szójában végzett vizsgálatokkal megállapították, hogy a növényekben az emlősökkel ellentétben nem az AC, hanem az AT ismétlődések fordulnak elő gyakrabban, átlagosan 32 kb-onként egyszer (Wang et al. 1994).

Ujjlenyomat analízisekhez a mikroszatelliteket növényekben először Weising et al. (1991) és Beyermann et al. (1992) alkalmazta fajták és vonalak megkülönböztetésére. A mikroszatellit markerek multialléles és kodomináns jellegét szójában (Akkaya et al. 1992) és rizsben (Zhao és Kochert 1992) is bizonyították. Vizsgálataik megerősítették, hogy a mikroszatellit lókuszok a genomban szétszórtan helyezkednek el (Zhao és Kochert 1992) és bizonyították, hogy a már elkészített RFLP térképeken a markerek közötti üres helyeket töltik ki (Wu és Tanksley 1993).

Az RFLP vizsgálatokhoz képest a mikroszatellitek egy nagyságrenddel több polimorfizmus kimutatását teszik lehetővé (Wu és Tanksley 1993), a RAPD vizsgálatokhoz képest pedig 20–40 %-kal adnak több információt (Rus-Kortekaas et al. 1994). Hátrányuk közé tartozik, hogy a kifejlesztésük költséges és az esetek többségében csak egy adott faj vizsgálatára alkalmasak (ritkán konvertálhatók át egy másik faj analíziséhez).

2.2.3. AFLP analízis

A PCR alapú markeres vizsgálati módszerek közül az AFLP az egyik legújabb és leghatékonyabb technika, amelyet Zabeau és Vos (Keygene, Hollandia) szabadalmaztatott 1993-ban. Lényege, hogy a DNS emésztése (2 enzimmel) után, a kapott fragmentumokhoz adaptereket kapcsolnak, és ezeket használják fel a reakcióban templátként olyan oligonukleotid primerekkel, amelyek szelektív bázist/bázisokat (az amplifikált fragmentumok számának csökkentése) és az adapterekre és a hasítóhelyekre komplementer szekvenciákat tartalmaznak. A felszaporított fragmentumokat 5-6 %-os denaturáló poliakrilamid gélen választják el és detektálásukhoz autoradiográfiás, ezüstfestéses vagy digoxigenines jelölést használnak.

A fragmentumok várható számát a $2R/4^n$ képlettel lehet megbecsülni (Hajósné Novák 1999), amelyben az R = a jelölt hasítási helyek (szekvenciák), n = szelektív nukleotidok összes száma. Ezt a számot ezenkívül még a genom mérete és a szelektív nukleotidok genomon belüli gyakorisága is befolyásolják. Célszerű az amplifikált fragmentumok számát 100 alatt tartani, mert ellenkező esetben már romlik az elválasztás minősége.

Az AFLP technikával egyszerre 20-100 fragmentum azonosítható, amelyek a a RAPDhoz hasonlóan legtöbbször domináns jellegűek. A fragmentumok a genom ismeretlen és rendszerint egymástól független lókuszain amplifikálódnak. Az AFLP ismételhetősége jó. Előnyt jelent még az is, hogy a különböző restrikciós enzimek és primerek nagy számban kombinálhatók.

2.3. Kapcsolt markerek azonosítására alkalmas növényi populációk

A molekuláris markerezési technikákkal a növényi genom egésze vizsgálható, ezért kiválóan alkalmasak polimorfizmus kimutatására és génekkel kapcsolt markerek azonosítására. A molekuláris markerek többek között a markerre alapozott szelekcióban

használhatók vagy kapcsoltsági viszonyaik alapján géntérképek készíthetők, amelyek egyben információt adnak a markerek genomon (kromoszómán) belüli helyéről is (Hartl et al. 1995). Kapcsolt markerek azonosítására széleskörben a következő 4 stratégiát alkalmazzák (Gupta et al. 1999): 1. Közel izogén vonalak vizsgálata (Near-Isogenic Lines – NILs, Young et al. 1988); 2. Fenotípusos csoportok vizsgálata (Bulked Segregant Analysis – BSA; Arnheim et al. 1985, Michelmore et al. 1991); 3. Rekombináns beltenyésztett vonalak (Recombinant Inbred Lines – RILs, Mohan et al. 1994); 4. DH vonalak vizsgálata (Graner et al. 1991). A rendelkezésre álló növényi anyag és a meglévő háttér-információk alapján dönthető el, hogy melyik stratégia a célravezetőbb.

2.3.1. Közel izogén vonalak vizsgálata

Közel izogén vonalakat gyakran használnak rezisztenciagének azonosítására. A rezisztenciaforrás sok esetben vad rokonfajokban található. Rekurrens szülővel (értékes fajta) történő többszöri visszakeresztezéssel és a donor génre történő szelekcióval közel azonos genetikai hátterű vonalakat kapnak.

Az első közel izogén vonalak vizsgálatával azonosított rezisztenciagén a paradicsommozaik vírusrezisztenciáért felelős *Tm-2a* gén volt (RFLP; Young et al. 1988). Búzában Purnhauser et al. (1999) rozsdarezisztenciával kapcsolt molekuláris markerek azonosítására használt közel izogén vonalakat. RAPD technika felhasználásával azonosították az *Lr9* és *Lr24 Puccinia recondita* rezisztenciagéneket *Aegilops umbellulata* és *Agropyron elongatum* növényfajokkal előállított izogén vonalakban (Schachermayr et al. 1994). Myburg et al. (1998) *Diuraphis noxia* Mordvilko levéltetű rezisztenciára előállított közel izogén vonalainak (6x visszakeresztezés) vizsgálatakor (300 RAPD primer) 4 db a *Dn2* rezisztencia-lókusszal kapcsolt RAPD markert azonosított.

2.3.2. Fenotípusos csoportok vizsgálata

Ennél a módszerénél olyan genotípusok DNS-ét keverik össze (csoportokat képeznek), melyek valamilyen fenotípusos tulajdonságban megegyeznek, azaz ezekről a vonalakról/egyedekről azt feltételezik, hogy a kérdéses tulajdonság tekintetében azonos alléllel/allélekkel rendelkeznek (Michelmore et al. 1991). A szabadon hasadó genetikai háttér (a kérdéses tulajdonság kivételével) nincsen kitéve szelekciós nyomásnak, ezért az

adott tulajdonság alapján összeállított csoportok is csak a kérdéses lókuszban és az azzal kapcsolt DNS régiókban különböznek egymástól. Ezt a stratégiát alkalmazva Arnheim et al. (1985) RFLP próbákkal mutatott ki polimorfizmust a cukorbetegségért (*Diabetes mellitus*) felelős HLA II lókuszon beteg és egészséges emberekben. Michelmore et al. (1991) salátában hasadó F₂ nemzedék lisztharmat- (Bremia lactuca) rezisztens és -fogékony egyedeinek DNS mintáiból alakított ki csoportokat, amelyek különböző rezisztenciagéneket hordoztak. A vizsgálatok során 100 tesztelt primerből 3 rezisztencia-lókusszal kapcsolt markert azonosítottak. Ha a csoportok kialakításánál nagyszámú genotípus áll rendelkezésre, akkor a kapcsolt polimorf markerek legtöbbször a kérdéses génhez közeli, szimmetrikus, 10-30 cM nagyságú DNS régión belül helyezkednek el (Michelmore et al. 1991). Ezzel ellentétben a közel izogén vonalakban a markerek gyakran a gén körüli aszimmetrikus DNS régióban találhatók meg (Young and Tanksley 1989). Amíg pl. az ötszörös visszakeresztezéssel előállított közel izogén vonalakban azonosított polimorf markereknek kb. csak 50 %-a kapcsolt a kérdéses tulajdonságot meghatározó lókusszal (Muehlbauer et al. 1988), addig fenotípus alapján csoporosított DNS mintákban azonosított polimorf markerek az esetek többségében ténylegesen kapcsoltak a tulajdonságot meghatározó lókusszal. Arnheim et al. (1985) és Michelmore et al. (1992) által alkalmazott stratégiák annyiban különböztek egymástól, hogy az első esetben a csoportok nem rokon egyedek DNS mintáit tartalmazták, a második esetben pedig a fenotípus alapján kialakított csoportok egyedei egy keresztezésből származtak.

2.3.3. Rekombináns beltenyésztett vonalak

A RIL-ek egy adott keresztezésből származó beltenyésztett vonalak. Mohan et al. (1994) ezt a stratégiát rizsben alkalmazta a Gm2 (*Orseolia oryzae*) rezisztenciagén térképezésére. A vizsgálatban szereplő 40 RIL (F₅ és F₆ nemzedék) a Phalguna (rezisztens) és ARC6650 (fogékony) genotípusok keresztezésből származott. A nagyfokú homogenitást mutató rekombináns beltenyésztett vonalak közül 17 rezisztens, 23 pedig fogékony volt. A vonalak 20-20 egyedéből kialakított csoportok képezték az RFLP és RAPD vizsgálatok alapját, amelyek vizsgálatakor összesen 231 polimorfizmust kaptak. Ezek közül 2 marker hasadt a Gm2 rezisztenciagénnel kapcsoltan. A Gm2 gén helyét ezután kapcsoltsági analízissel határozták meg. A rekombináns beltenyésztett vonalak több termőhelyen és egymást követő évjáratokban történő vizsgálatokat tesznek lehetővé, ezért ezt a stratégiát QTL analízisre (Quantitative Trait Loci; Lander és Botstein 1989) is gyakran használják. Mivel a RIL-ek a rekombináció termékeit több nemzedéken keresztül is reprezentálják, nagyobb felbontású géntérképek készíthetők ezekkel a vonalakkal, mint bármilyen más populációkkal (Melchinger 1990). Messmer at al. (2000) pl. 8 levélrozsda QTL-t azonosított rekombináns beltenyésztett búzavonalak vizsgálatával.

2.3.4. DH vonalak vizsgálata

A DH módszerrel egy nemzedék alatt lehet homozigóta utódokat létrehozni (Nei 1963). A DH populációk előnye a RIL-ekkel szemben, hogy segítségükkel beltenyésztés nélkül homogén utódpopulációk hozhatók létre. Karsai et al. (1997) a QTL elemzés módszerével vizsgálta az árpa kalászolási idejét befolyásoló *Ppd-H1* (nappalhossz-érzékenység) és *Sh2* lókuszok hatását a Dicktoo és Morex fajtákban, valamint az ezekből előállított 19 DH vonalban.

2.4. Nyár (Populus sp.) fajok molekuláris vizsgálata

A fafajok hagyományos nemesítése magába foglalja a szelekciót, a keresztezést, az utódok tesztelést és a kedvező genotípusok (megfelelő növekedési erély, fa- és rostminőség, biotikus és abiotikus stressz tolerancia) felszaporítását (Dinus és Tuskan 1997). A gyors genetikai előrehaladást nehezíti, hogy a fafajok generációs ideje hosszú (10–100 év), a vegetatív fázis rendszerint kitolódik és a növekedés lassú (Fladung 1998). A javítandó tulajdonság gyakran csak több év után detektálható fenotípusosan, így a szelekció is csak ezután válik lehetségessé. A kultúrnövényekkel szemben a fafajok kevésbé domesztikáltak, a természetben előforduló "vad populációk" pedig nagyfokú genetikai variabilitást mutatnak (Fladung 1998). A molekuláris technikák alkalmazásával az elérhető genetikai előrehaladás javítható. A különböző DNS-ujjlenyomat vizsgálatok lehetővé teszik a populációk genetikai variabilitásának meghatározását és molekuláris jellemzésüket. Segítségükkel nagy felbontású genetikai térképek készíthetők. A molekuláris markerek hatékony eszközt jelenthetnek a korai szelekcióban, a keresztezési partnerek kiválogatásában és a nagy mennyiségű növényi anyag gyors tesztelésében.

A mérsékelt égövben a termesztett fafajok közül a nyárnak (*Populus* sp.) kiemelkedő jelentősége van. Ennek a gyors növekedésű és rövid rotációs idejű fajnak a fáját többek között épületfa, deszka, furnérlemez, csomagolóanyag, gyufa, evőpálcika és papír gyártására használják (Castiglione et al. 1993). Magyarországon a kitermelt fa 20%-a nyár eredetű (Kiss 1999b). A nyár jelentős rost és bioüzemanyag forrás, továbbá a kutatásokban modellnövénynek számít, ezért a leginkább tanulmányozott fafajok közé tartozik (Stettler et al. 1996).

A fafajok közül először nyár esetében használtak biokémiai markereket a genotípusok azonosítására. Bortitz (1962) és Boccone (1975) papir kromatográfiával különböztettek meg néhány nyárfajt és hibridet. Greenway et al. (1989) gázkromatográfiát alkalmazott introgressziós nyárfajok és klónok azonosítására. A *Populus* nemzettségbe tartozó klónok megkülönböztetésére izoenzim vizsgálatot használt Cheliak és Dancik (1982), Hyun et al. (1987), Liu és Furnier 1993), Lund et al. (1992), Rajora et al. (1988, 1989), és Rajora és Zsuffa (1989). A sikeres izoenzim vizsgálatok ellenére elmondható, hogy az izoenzim allélek és lókuszok száma kevés, ezért nem alkalmasak minden nyár klón azonosítására (Lin et al. 1997).

Az RFLP analízis viszonylag nagyfokú polimorfizmust eredményez a különböző populációkban. Nyár géntérképek létrehozásához Bradshaw et al. (1994) Liu és Furnier (1993) RFLP, RAPD és STS vizsgálatokat alkalmaztak. Keim et al. (1989) és Liu és Furnier (1993) fajok közötti és fajon belüli különbségeket mutattak ki RFLP analízissel. A genomiális RFLP vizsgálatokon kívül a kloroplasztisz: cpDNS RFLP (Mejnartowicz 1991, Rajora és Danick 1995) és mitokondriális: mtDNS RFLP (Barrett et al. 1993, Radetzky 1990) technikák is alkalmasnak bizonyultak az inter- és intraspecifikus különbségek kimutatására. Az RFLP vizsgálatok technikai bonyolultsága, az egységnyi mintára jutó magas költségek és az izotóp jelölés használata miatt újabban a PCR alapú vizsgálatok kerültek előtérbe (Rani et al. 1995).

Villar et al. (1996) nyár genotípusok analízisével levélrozsda (*Melampsora larici-populina* Kleb.) rezisztenciához kapcsolt RAPD markert azonosított. Castiglione et al. (1993) valamint Liu és Furnier (1993) *Populus* genotípusok taxonómiai vizsgálatára továbbá inter- és intraspecifikus variabilitás kimutatására használták sikerrel ezt a módszert. Különbségeket lehetett kimutatni *P. deltoides* Marsh.–ból származó mikroszaporított (Rani

et al. 1995) és szomaklón eredetű (Kiss et al. 2000) növények között is. Lin et al 55 különböző nyár klónt különített el (fajok és hibridek) RAPD és AP-PCR módszerekkel.

Nyár genotípusok megkülönböztetésére Dayanandan et al. (1998) SSR primereket fejlesztett ki. A különböző földrajzi helyekről gyűjtött 36 *P. tremuloides* egyedből létrehozott genomiális könyvtárakat di-, tri- és tetra nukleotid próbákkal hibridizáltatták és összesen 4 funkcionális SSR primerpárt kapott. A 4 lókusz mindegyike többallélesnek (5-11) bizonyult és az SSR primerpárok közül kettő a *P. nigra, P. x canadensis* és *P. maximowiczii* klónokban is reprodukálható mintázatot eredményezett.

Az RFLP markerek PCR alapú STS markerekké konvertálhatók, ha a próbák szekvenciája ismert (Olson et al. 1989). Az STS–el kapott különbségek hosszúság alapú polimorfizmusok, melyek közvetlenül vagy pedig restrikciós emésztés után válnak láthatóvá. Ha a szekvenált klónok (próbák) cDNS-ek, az STS markereket EST (Expressed Sequence Tags) markereknek nevezik. Bradshaw et al. (1994) vizsgálatai során 29 PCR primerpárral különbségeket mutatott ki az interspecifikus keresztezésből származó F_2 nemzedékben.

Az utóbbi években egyre több növényfaj vizsgálatára használják az AFLP technikát, amellyel rövid idő alatt nagyszámú genetikai marker azonosítható. Cervera et al. (1997) nyár klónok azonosítását végezte AFLP technikával. Wu et al. (1998) AFLP fragmentum alapján a *P. deltoides* faj genetikai térképet készítette el, mely 19 fő kapcsoltsági csoportot (megegyezik a nyár haploid kromoszómaszámával) tartalmazott és összesen 2927 cM távolságot fedett le.

2.5. A búza molekuláris vizsgálata

A búza a legfontosabb gabonafajok közé tartozik és az emberi táplálkozásban a szénhidrátforrás 55 %-át adja világviszonylatban (Gupta et al. 1999). A termesztett kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) allohexaploid, kromoszómaszáma 2n = 6x = 42 és 3 homeológ genomból áll (Sears 1966). A homeológ kromoszómák párosodását az 5BL kromoszómán található *Ph* gének (*pairing homeologous genes*) akadályozzák meg. A hexaploid búza kora 9-10 ezer évre becsülhető és a citológiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a *T. turgidum* (AABB genom) és az *Aegilops squarrosa* (DD genom) fajok allopoliploidizációjával jött létre (McFadden és Sears 1946). Mivel a búzának hexaploid vad

formái nem léteznek, a búzanemesítés számára egyedüli forrást a búza ősei jelentenek (Miller 1987). Génforrásként elsősorban azok a vadfajok jöhetnek számításba, melyeknek egy vagy két genomja megegyezik a búzáéval. A monoszómás (Sears 1954), teloszómás és izoszómás (Sears és Sears 1978), valamint nulliszómás (Sears 1966) búzavonalak nemcsak a gének azonosításában jelentősek, hanem a nemesítésben is kiválóan alkalmazhatók. Lutz et al. (1995) pl. Ae. squarrosa-ból vitt be lisztharmat-rezisztenciagéneket hexaploid búzába. Újabban Ae. squarrosa-ból a rezisztenciagének mellett a sütési paraméterekkel kapcsolt gének búzába történő átvitele is potenciális lehetőségként merült fel (Lafiandra et al. 1992). A termesztett búza homeológ kromoszómáinak azonos lókuszain a gének gyakran többféle formában fordulnak elő. Ezeket a géneket homeoalléleknek nevezik. Nemcsak a búzagenom A, B és D kromoszómái között figyelhető meg homeológia, hanem más Triticeae fajok kromoszómái is homeológok lehetnek, így a vadfajokon kívül a búzanemesítés számára ezek is génforrásként jöhetnek számításba. Búza-rozs transzlokációkból származnak pl. a Pm 20 (Friebe et al. 1994) és más lisztharmat-rezisztenciagének. A búza és rozs kromoszómák nagyfokú homeológiájára utalnak pl. az előállított búza-rozs szubsztitúciós vonalak (Zeller és Hsam 1983). Az 1R rozskromoszóma és a homoeológ búzakromoszómák 1. csoportjának teljes kolinearitását összehasonlító térképezéssel bizonyították (Devos et al. 1993).

A búza genommérete rendkívül nagy. Néhány Triticeae faj haploid genommérete a következő: hexaploid búza = 17×10^9 bp, árpa = 4,9 x 10^9 bp, kukorica = 2,5 x 10^9 bp és rizs = 10^9 bp (Arumuganathan and Earle 1991). Egy átlagos nagyságú búzakromoszóma kb. 25 x nagyobb a rizskromoszómánál (Moore et al. 1995). Búzában a nagy genomméret a poliploidizáció és duplikáció következménye - a genom több mint 80 %-át repetitív szekvenciák teszik ki. A citológiai vizsgálatokkal ellentétben a búza molekuláris vizsgálata több nehézségbe ütközik. Búzában viszonylag kevés használható molekuláris polimorfizmus azonosítható, amelyek a markerre alapozott szelekció és a géntérképezés alapját is képezik (Gupta et al. 1999).

Az allohexaploid búzagenomban a növény károsodása nélkül fordulhatnak elő duplikációk, deléciók vagy transzlokációk, amelyek a géntérképezést nehezítik. Schlegel és Schlegel (1989) 171 búzafajta citológiai vizsgálata során a fajták 50%-ban 1, 24 %-ában 2 és 4 %-ban pedig 3 transzlokációt mutattak ki. A nehézségek ellenére a búza különböző kromoszómáira (RFLP: Chao et al. 1989; Devos és Gale 1993; SSR: Röder et al. 1998; RFLP + RAPD: Hohmann et al. 1995) vagy a teljes genomra (pl. RFLP: Liu és Tsunewaki 1991, SSR: Röder et al. 1988) is több géntérképet készítettek.

Búzában kevés a morfológiai (Gale et al. 1990), izoenzim és tartalékfehérje markerek száma (Tanksley 1983), ezért a megfelelő szintű polimorfizmus kimutatására a nukleinsav alapú molekuláris markerezési technikák adnak lehetőséget. A különböző molekuláris technikákat eddig többen is összehasonlították. Bohn et al. (1999) 11 búzafajta vizsgálatakor a következő eredményeket kapta: 470 RFLP fragmentumból (191 próba) 113, 559 AFLP fragmentumból (11 primer kombináció) 117 és 47 SSR fragmuntumból (21 SSR primerpár) 33 volt polimorf. Búzában az RFLP módszerrel kevesebb polimorfizmus detektálható, mint más gabonanövényekben (Chao et al. 1989). Az RFLP lókuszok kevesebb, mint 10 %-a polimorf (Röder et al. 1998), ezért a genomiális egykópiás vagy cDNS RFLP módszer Ahn et al. (1993) és Moore et al. (1995) szerint összehasonlító géntérképezésben ugyan hatékony, azonban kevésbé alkalmas fajon belül agronómiai tulajdonságokhoz kapcsolt markerek azonosítására. Az alacsony polimorfizmus-szint és egyéb hátrányai ellenére a legtöbb géntérkép RFLP vizsgálatok alapján készült és számos agronómiai tulajdonsághoz kapcsolt RFLP markert is izoláltak. Korzun et al. (1997) pl az Rht12 törpésség és a Vrn1 vernalizáció génjével kapcsolt RFLP és SSR markereket azonosított. Sutka et al. (1997) mennyiségi jellegek vizsgálatával a vernalizációban (Vrn1) szerepet játszó nagyhatású QTL-t (Quantitative Trait Loci) azonosított az 5A kromoszóma hosszú karján, amely 3 RFLP markerrel szegregált és szoros kapcsoltságot mutatott a fagyállóság (Fr1) génjével.

A RAPD módszer az RFLP-hez hasonlóan alacsony színtű polimorfizmust eredményez (Gupta et al. 1999). Shah et al. (2000) pl. a Cheyenne és Wichita búzafajták összehasonlításakor, 40 RAPD primerből nyolc esetében (20 %) kapott polimorfizmust. Egy másik vizsgálatban 10 citoplazmásan hímsteril és 10 resztorer búzavonal RAPD analízisénél 60 primerből 9 eredményezett polimorfizmust (Liu et al. 1998). Genotípusosan és fenotípusosan is hasonló fajták vizsgálatában He et al. (1992) a RAPD módszer és denaturáló gélelektroforézis kombinált alkalmazását javasolja.

A búzafajták inter- és intraspecifikus vizsgálatában az egyik leghatékonyabb módszert a mikroszatellit markerek jelentik (Plaschke et al. 1995). Annak ellenére, hogy az SSR

markerek kifejlesztése rendkívül költséges és időigényes (mikroszatellitekre tervezett SSR primerpárok 30 %-a használható genetikai vizsgálatokban, Röder et al. (1988)), ma már nagyszámú mikroszatellit marker áll rendelkezésre. A teljes genomot lefedő 230 WMS (Wheat Microsatellites) polimorfizmust adó primerpár szekvenciáit és az ezekhez tartozó géntérképet Röder et al. 1998-ban közölte. A WMS261 primerpár lókusza pl. a 2D kromoszóma rövid karján helyezkedik és az Rht8 törpeség génjével van kapcsolva (Korzun et al. 1998). Rekombináns vonalak összehasonlításakor a WMS261-165 bp allélt hordozó Ciano 67 vonalak növénymagassága 3-4 cm-rel volt kisebb a Cappelle Desprez vonalaknál, melyek a WMS261-174 bp allélt tartalmazták. Ez utóbbiaktól 7-8 cm-rel voltak magasabbak a WMS261-192 bp allélt tartalmazó Mara fajta rekombináns vonalai. Devos et al. (1995) γgliadin pszeudogénre és LMW (Low Molecular Weight) glutenin gén mikroszatellit határrégióira tervezett primerekkel mutatott ki fajták között polimorfizmust. Búzában a vízoldhatatlan glutén fontos szerepet játszik a sütőipari minőség (tészta nyújthatóság, elaszticitás) kialakításában. A sikér rugalmasságát meghatározó HMW (High Molecular Weight) glutenin alegységek génjei az 1. csoport kromoszómáinak hosszú karjain találhatók. Ezek közül a D kromoszómán a Dx5-Dy10 allélkombináció a jó, a Dx2-Dy12 pedig a gyenge sütőipari tulajdonságokkal korrelál (Ahmad 2000). A B kromoszómán a GlyB1 komplex Bx7, By8 vagy By9 alegységek génjei befolyásolják a sütőipari minőséget. Ezeknek az alegységeknek a szekvenciáira terveztt STS-PCR primerekkel (Dx2, Dx5: Anderson et al. 1989; Dy10, Dy12: Smith et al. 1994; Bx7: Anderson and Greene 1989) Ahmad (2000) sikeresen különített el 5 különböző sütőipari értékkel rendelkező búzafajtát és a primerek használatát a markerre alapozott szelekcióban javasolja.

Az AFLP módszer a leghatékonyabb markerezési technikák közé tartozik. Mivel ezzel a módszerrel nagyszámú marker detektálható és a reakció ismételhetősége is jó, kiválóan alkalmas polimorfizmus kimutatására és hasadó nemzedékek kapcsoltsági analízisére. Eddig több agronómiai szempontból fontos tulajdonsághoz kapcsolt AFLP markert azonosítottak, pédául *Pm4b* lisztharmat (Hartl et al. 1998), vagy a *Septoria tritici* rezisztenciagénhez (Goodwin et al. 1998) kapcsolt markereket.

Az önbeporzó növények nemesítése a következő stratégiai lépéseket tartalmazza: 1) a variabilitás növelés keresztezéssel; 2) az agronómiai szempontból fontos rekombináns genotípusok azonosítása és szelekciója; 3) a tulajdonságok rögzítése homozigóta

genotípusokban. A hagyományos nemesítés a tulajdonságok rögzítésére a pedigré módszert alkalmazza, amely azonban korántsem egyszerű, mivel a keresztezést követő néhány generációban a heterozigótaság mértéke nagy, így a megfelelő rekombináns genotípusok azonosítása és szelekciója nem könnyű feladat. A pedigré szelekció ismétlésével a homozigótaság mértéke növelhető, de ez sok nemzedéket igényel.

A búzanemesítésben DH vonalak előállítására portokkultúrát és búza x kukorica beporzásos haploid indukciót alkalmaznak eredményesen (Ma et al. 1999). Ezeknek a módszereknek a segítségével heterozigóta szülőkből egy nemzedék alatt lehet homozigóta rekombináns genotípusokat előállítani (Nei 1963). A DH előállítás előnye továbbá, hogy felhasználásával növelhető a szelekció hatékonysága, mivel a domináns/recesszív allélkölcsönhatások és a szegregáció kiküszöbölhetők (Snape et al 1989). A haploid indukció lehetséges módszereit és felhasználásának lehetőségeit Dudits és Heszky (2000) részletesen összefoglalták. Búza DH vonalak előállítására Magyarországon portok kúltúrát alkalmaznak rutinszerűen. Az első DH eredetű köztermesztésben szereplő fajta a GK Délibáb volt (Pauk et al. 1995). A DH vonalak spontán rediploidizációval vagy mesterségesen kémiai kezeléssel is előállíthatók. Búza sejtek tenyészetek és rediploidizációjára Barnabás munkacsoportja (1991) in vitro kolchicines eljárást dolgozott ki. A DH vonalak nemcsak a fajta-előállításban használhatók, hanem géntérképezésre és kapcsolt markerek azonosítására is (Torp et al. 1998) kiválóan alkalmasak.

Az androgenetikus vonalak közötti különbségeket elsősorban a gametoklonális (a mikrospórában végbemenő meiotikus rekombináció) variabilitás okozza. Paprika DH vonalakban Gyulai et al. (2000) mutatott ki különbségeket. A szövetkultúrákból előállított növényeknél a különbségek oka sok esetben a szomaklonális variabilitás (Brown et al. 1991), de a kolhicines rediploidizáció mutagén hatása is ismert. Ahhoz, hogy a fajtaelőállítás során a megfelelő DH vonalakat emeljék ki, megfelelő szelekciós eljárásra van szükség. Agronómiai tulajdonságokban (Kertész et al. 2000) és citológiai vizsgálatok (Mázikné Tőkei et al. 1999) alapján a DH vonalak alig különböznek egymástól.

2.6. Molekuláris vizsgálatok kétlaki növényekben

2.6.1. Ivardetermináció kétlaki növényekben

A növényvilágban viszonylag kevés a kétlaki növényfajok száma. A zárvatermők kb. 4 %-a kétlaki faj (Yampolski és Yampolski 1922), amelyekben az ivardetermináció rendkívül változatos lehet. Öt növénycsaládon belül találhatók olyan fajok, amelyek heteromorfikus, azaz morfológiailag eltérő ivari kromoszómákkal rendelkeznek (Parker 1990). Ezen a csoporton belül 2 típus lehetséges: a) az aktív Y kromoszómával rendelkező fajokban (XX/XY) az Y kromoszómán expresszálódó gének határozzák meg a hímivart, b) a heteromorfikus kromoszómákkal rendelkező növények másik csoportjában az X kromoszóma és az autoszómák aránya (X/A) határozza meg az egyedek ivarát.

Az aktív Y kromoszómával rendelkező fajok közé tartozik pl. a Silene latifolia Poiret (mécsvirág), amelynek Y kromoszómáját eddig a legrészletesebben jellemezték (Scutt et al. 1997, Matsunaga et al. 1999). Ennek a fajnak a hím virágaiban a porzók teljesen kifejlődnek termő fejlődése pedig korai stádiumban megáll. A nővirágokban viszont a a porzókezdemények továbbfejlődése gátolt és a termő fejlődik ki teljes egészében (Grant et al. 1994). A S. latifolia és a S. dioica fajok 22 autoszómával és XX (nőivar) vagy XY (hímivar) ivari kromoszómákkal rendelkeznek. Az Y kromoszóma metacentrikus és 50 %-al nagyobb (a diploid genom 9 %-at teszi ki), mint a szubmetacentrikus X kromoszóma. Mindkét ivari kromoszóma nagyobb az autoszómáknál (Scutt et al. 1997, Matsunaga et al. 1994, Ciupercescu et al. 1990). Az Y kromoszóma hosszabb karjának végén pszeudoautoszomális régió található, amely az X kromoszómában is megvan és ott a teljes kromoszóma ¹/₄-ét teszi ki. A pszeudoautoszomális régión keresztül párosodnak az ivari kromoszómák a hím virágokban a meiozis I ciklus során, azaz meiotikus rekombináció is csak ezen a részen lehetséges (Westergard 1958). Az Y kromoszómán a párosodó régión kívül korai anthera fejlődéséért, anthera éréséért (Westergard et al. 1958) és gynoecium szupressziójáért (Matsunaga et al 1999) felelős régiókat határoztak meg.

Az ivardetermináció másik típusánál (X/A) a *Drosophila melanogaster*-hez hasonló mechanizmus figyelhető meg. Abban az esetben, ha az X kromoszóma/autoszóma arány nagyobb, mint 1 a növény nőivarú, ha 0,5 vagy kisebb hímivarú lesz. A 0,5 és 1 közötti arányok hermafrodita fenotípust eredményeznek (Parker és Clark 1991). Ebbe a csoportba tartozik pl. a komló (*Humulus lupulus*) és az egynyári komló (*H. japonicus*). A komló hím

és nővirágai nagymértékben különböznek egymástól. A hímvirágoktól eltérően a nővirágok kevésbé tipikusak. A komló virágaira jellemző, hogy a többi kétlaki fajtól eltérően a virágokban kezdettől fogva csak az egyik ivar szervei fejlődnek ki (Ainshworth et al. 1998). Az Európában termesztett komló kromoszómaszáma 20 (2n = 20). A hímek XY, a nőegyedek XX ivari kromoszómákkal rendelkeznek (Polley et al. 1997). Annak ellenére, hogy az ivari jelleget a X kromoszóma és az autoszómák aránya határozza meg (Park és Clark 1991), a hím fenotípus teljes expressziójához szükség van az Y kromoszómára. A fajták egy részében az ivari kromoszómák heteromorfikusak, másikakban nem (Haunold 1991). A H. lupulus fajban legkevesebb ötféle kromoszómarendszer van. Az európai típusban, ahogyan már említettük a nőegyedek XX a hímek pedig XY ivari kromoszómákkal rendelkeznek. A Japánból származó H. lupulus subsp. cordifolius X/autoszóma transzlokációt tartalmaz, amely multikromoszómás ivardeterminációt eredményez (nőivar = $X_1X_1X_2X_2$, hímvar $X_1X_2Y_1Y_2$) (Ainsworth et al. 1998). A H. *japonicus* fajban a nőivarú egyedek kariotípusa 2n = 14 + XX, a hímivarúaké pedig 2n = XY₁Y₂ Komlóban szintetikus auxin vagy alfa 2-klórfeniltio-propionsav hatására a nőivarú egyedeken hímvirágok fejlődése indukálható (Weston 1960).

A kender (*Cannabis sativa* L) a komlóval egy családba tartozó faj. Diploid kromoszómaszáma 20 (hímivar: 2n = 18 +XY, nőivar: 2n = 18 + XX; Yamada 1943) és virágaira a komlóhoz hasonlóan nem jellemző a korai hermafrodita stádium (Mohan Ram és Nath 1964). A kender ivardeterminációjának mechanizmusa egyelőre még nincs tisztázva. Warmke és Davidson (1944) szerint autoszomális gének nem játszanak szerepet az ivar kialakulásában, azaz tipikus aktív Y kromoszómás ivari determinációt feltételezett. Az utóbbi években ezt az elméletet többen megkérdőjelezték (Mohan Ram és Sett 1985). Durand és Durand (1990) hímivart indukáló alléleket (Xm) feltételezett az X kromoszómán. Néhány genotípusban kémiai kezelés vagy környezeti tényezők hatására a nőivarú egyedeken is megjelenhetnek a hím virágok, amelyek fertilis pollent termelnek (Clarke 1991). Növényi hormonok közül az auxin és az etilén a nő (Heslop-Harisson 1956, Mohan Ram és Jaiswal 1970), a citokinin és a gibberellin pedig a hímivart indukálja (Chailakhan 1979, Atal 1959). A kender ivari kromoszómái heteromorfikusak. Sakamoto et al. (1998) áramlásos citométeres mérésekkel különbséget mutatott ki a két ivar genommérete között: a diploid nőivarú egyedek genommérete 1636, a hímivarúaké pedig 1683 Mbp volt. Citológiai

vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy az Y kromoszóma (legnagyobb kromoszóma) szubtelocentrikus, az X kromoszóma pedig szubmetacentrikus és mindkettő rövid karjának végén szatellita található.

2.6.2. Ivarspecifikus markerek azonosítása kétlaki növényekben

A növények ivarát az ivari dimorfizmus hiánya miatt fenotípus alapján csak néhány növényfaj esetében lehet megállapítani virágzás előtt. A kultúrfajként használt kétlaki fajok egyik részében a hím, másik részében a nő egyedek hordozzák a gazdaságilag fontos tulajdonságokat. A hímivarú spárga (*Asparagus officinalis* L) például többet terem, korábban érik és hosszabb ideig él, mint a nőivarú (Prickett és Walker 1989). A magjukért vagy termésükért termesztett gazdaságilag fontos kétlaki növényfajoknál (pl. kivi, pisztácia, komló és papaja) legtöbbször a nőivarú egyedek az értékesebbek (Ainsworth et al. 1998). Ezzel ellentétben pl. a fatermelés szempontjából a hímivarú nyár klónok előnyösebbek, ezek ugyanis nagyobb szárazanyag hozamot adnak (Tschaplinski és Tuskan 1994). A korai ivarmeghatározás lehetősége különösen az évelő növények esetében eredményezhet időmegtakarítást és ezzel együtt gazdasági hasznot (Alstrom-Rapaport et al 1998). Az ivarhoz kapcsolt molekuláris markerek a kétlaki növények ivarának gyors és hatékony megkülönböztetését tennék lehetővé. Az utóbbi években azonosított, ivarhoz kapcsolt molekuláris markereket az 1. táblázat tartalmazza.

Növényfaj	Hivatkozás	Marker típusa	Primer - marker mérete	Ivar	Populáció
		(primerek száma)			-
Actinidia	Harvey et al.	RAPD (500)	OPAL20 - 950 bp	Q	BSA
chinensis	1997.		(SCAR: SMX 950	I	F_1 12 család
Actinidia	Gill et al 1998		OPAI12 – 870 bp	3	klónok
deliciosa			(SCAR: SMY – 870 bp	Ŭ	
Asparagus	Jiang and Sink	RAPD (760)	OPC15-98 –980 bp	3	BSA
officinalis	1997		OPC15-30 – 300 bp	3	63 F ₂ (XY x XX)
			(SCAR: SCC15-980 bp)	8	
	Reamon-	AFLP (253)	AAA/CGC – 100 bp	3	BSA
	Büttner et al.	(EcoRI/MseI)	AAC/CCA – 300 bp	3	$22 F_1 (XX x YY)$
	1998		AAG/CCG - 200 bp	8	$38 F_1 (XX \times XY)$
			ACC/CTC – 150 bp	8	$69 F_2 (XY \times XY)$
			AGA/CAT – 300 bp	8	
			AGG/CAT - 250 bp	8	
			ATC/CAA – 200, 300 bp	8	
			ATT/CCT – 150 bp	8	

1. táblázat. Kétlaki növényfajokban azonosított ivarhoz kapcsolt molekuláris markerek.

Cannabis	Flachowsky et	AFLP (39)	ACC/AAG –112, 124, 250 bp	8	Pool (2 változat)
sativa	al. 2000	(HindIII/MseI)	ACC/AGA –323 bp	8	BSA
			ACC/ATC – 87, 292 bp	8	80 F ₁
			ACT/ACA – 76, 317 bp	8	
			AGA/ACT – 323 bp	8	
			AGA/AGG – 70, 165, 275 bp	3	
	Mandolino et	RAPD (20)	OPA08 – 400 bp	3	Pool (7 fajta és 7
	al. 1999.		(SCAR390 – 390 bp)	Ũ	változat)
					167 egved
	Mandolino et	RAPD (179)	OPA08 - 400 bp	3	Pool (12 faita és
	al. 1998.		OPA12 - 700 bp	3	15 változat)
			OPC04 – 1600 bp	3	398 egved
			OPC08 - 2700 bp	3	
			OPC10 - 700 bp	3	
			OPC14 - 1400 bp	3	
			OPD05 - 900 bp	3	
			OPE02 - 1000 bp	3	
			OPE14 - 400 bp	3	
			OPI01 - 1600 bp	3	
			OPII - 1400 bp	3	
	Sakamoto et al	RAPD(15)	$N_0 8 - 500 \text{ bn}$	3	Hím és nőivarú
	1995.		$N_{011} - 730 \text{ bp}$	3	egvedek
Carica	Parasnis et al.	RAPD (80)	OPF02 – 800 bp	ð	Pool (3 faita)
papava	2000	()	(NAPF-2: 831 bp)	0	(''''
Humulus	Pollev et al.	RAPD (1000)	OPA07 – 1700 bp	3	BSA
lupulus	1997.		OPJ09 – 1200 bp	ð	20 F ₁
1			(OPJ09-STS1200)	3	Pool (8 fajta)
			OPU08 – 1400 bp	8	· · ·
	Seefelder et al.	RAPD (3)	OPA07 – 1700 bp	8	68 F ₁
	2000	RAPD-STS (1)	OPJ09 – 1200 bp	8	
		STS (3)	(OPJ09-STS1200)	8	
		AFLP (23)	OPU08 – 1400 bp	8	
			UBC533 – 970 bp	8	
			E33/M61 –450 bp	GR09M	
			E49/M40 – 148 bp	GR09M	
			E41/M55 – 383, 144 bp	GR09M	
			E49/M39-192 bp	GR09M	
			E49/M38 – 297 bp	GR09M	
			E49/M40 – 211 bp	GR09M	
			E53/M45 – 220 bp	GR09M	
			E38/M59 –266 bp	GR09M	
			E37M54 – 130 bp	GR09M	
Pistacia	Hormaza et al.	RAPD (700)	OPO08 – 945 bp	Ŷ	BSA
vera	1994.				F ₁ 45
~ 1				0	Pool (14 fajta)
Salix	Alstrom-	RAPD (380)	UBC354 – 560 bp	Ŷ	BSA
viminalis	Rapaport et al.				4 x4 diallel
C·1	1998. D' Guille de l		00400 0101	0 1	keresztezés
Silene	Di Stilio et al.	RAPD (80)	OPA09 -810 bp	¥ď.	BSA
dioica	1998		OPA09 – 590 bp	(PAR)	33 F ₁
C'1	M-1-1 (1		00402	O.	DCA
Silene	Nucany et al.	KAPD (60)	OPA03 OPD05	d' N	BSA 26
iaiijolla	1992.			0	30
			OPD12 = 800 dp	0	
			01100	0	

Silene Zha latifolia 199 S. dioica S. diclinis	ang et al. 98.	RAPD (340)	OPB07 (SCAR: ScB07 – 750 bp) OPD05 – (SCAR: ScD05 – 1350) OPD12 – (SCAR: ScD12 – 800 bp) OPK02 – (SCAR: ScK02 – 850 bp) OPQ14 – (SCAR: ScQ14 – 700 bp) OPX11 – (SCAR: ScX11 – 400 bp) OPX18 – (SCAR: ScX18 – 1000 bp)	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	BSA 7 Silene faj
			(SCAR: SCA18 – 1000 bp)	0	

Kenderben a korai ivar-meghatározás és a kapcsolt, agronómiai szempontból fontos tulajdonságok kombinált detektálása (THC tartalom, rost minőség és mennyiség stb.) nagy jelentőségű lehet a molekuláris markerre épülő növénynemesítési programban (Mandolino et al. 1999). Egylaki (\mathcal{F}) és kétlaki (\mathcal{F}) kender keresztezésével nagy magtermőképességű hibridet lehet előállítani, mivel az F₁ nemzedék nagy százalékban (97 % fölött) tartalmaz nőivarú egyedeket (80 %-kal nagyobb magtermés, mint a kétlaki Kompolti fajtában, amelynek F₁ állományában 40-50 % a hímkender). Az F₁ magot elvetve, még az F₂ állományban is a nőivarú egyedek vannak túlsúlyban. A F2 nemzedék magját már rostkender termesztésére használják. Az egylaki kender nemesítésénél a legnagyobb problémát az öntermékenyítés jelenti, mivel itt kisebb a kóróhozam és nemesítéssel kisebb genetikai előrehaladás érhető el, mint a kétlaki kendernél (Bócsa 1994), amelynél lehetőség van a nagy rosttartalmú hímnövények kiválogatására és ezek porzónövényként történő felhasználására (Bredemann 1938). А hímnövények fenotípus alapján történő megkülönböztetése a virágzás előtt nem lehetséges, így állományban a nem megfelelő hím növények okozta nem kívánatos megporzás (kontamináció) veszélye nem elhanyagolható. A keresztezésre felhasznált állomány egyedeinek ivara molekuláris markerek segítségével már a virágzás előtt, a vegetatív fázisban megállapítható és így a nemkívánatos hímivarú egyedeket még virágzás előtt el lehet távolítani (Mandolino et al. 1999).

Kenderben először Sakamoto et al. (1995) azonosított ivarhoz kapcsolt markereket. Tizenöt tesztelt primerből 2 eredményezett olyan fragmentumot, amelyek csak a hímivarú növényi egyedek RAPD mintázatában voltak jelen. Később Mandolino et al. (1999) azonosított egy 800 bp nagyságú hímivarhoz kapcsolt RAPD fragmentumot az OPA08 primerrel, amelyre SCAR primert tervezett.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növényanyag

3.1.1. Nyárminták

Molekuláris vizsgálatainkhoz 19 Magyarországon előforduló nyár klónból izoláltunk DNS-t. Ezek a klónok a *P. euramericana* (15 klón) és *P. alba* (1 klón) fajokhoz, valamint a *P. trichocarpa x P. deltoides* (2 klón) és *P. pyramidialis x P. berolinensis* (1 klón) keresztezésből származtak. A növényi anyagot a Sárvári Kutató Intézet (Magyar Erdészeti Kutató Intézet) biztosította számunkra. A klónok nevét, kísérleteinkben használt sorszámát és rövidítését, továbbá a származásukat és előállítási helyüket az 2. táblázat tartalmazza. A kifejlett növényekről származó fiatalabb leveleket DNS-izolálásig –70°C-on tároltuk.

 táblázat: A molekuláris taxonómiai vizsgálatokhoz használt nyár klónok eredete, előállítási helyük, a kísérleteink során használt rövidítéseik és sorszámaik. Az 1-10. sorszámú nyár klónok hím-, a 11-19. sorszámú klónok pedig nőivarúak.

Sorszám	A klónok	Rövidítés	Fajhibrid	Sorszám	A klónok	Rövidítés	Fajhibrid
	neve				neve		
1	Robusta ¹	ROB	P.euramericana	11	I214 ²	121	P.euramericana
2	Blanc.Poitou ¹	BDA	P.euramericana	12	Agathe ³	AGA	P.euramericana
3	I154 ²	I15	P.euramericana	13	Pannónia ⁴	PAN	P.euramericana
4	1273^{2}	127	P.euramericana	14	Parvifol ²	PAR	P.euramericana
5	I45/41 ²	145	P.euramericana	15	H328 ⁴	H32	P.euramericana
6	Kopecky ³	KOP	P.euramericana	16	Bl^2	BL	P.euramericana
7	Tripló ²	TRI	P.euramericana	17	Komik ⁶	KOR	P.pyramidialis x P.
							berolinensis
8	Sudár ³	SUD	P.euramericana	18	Raspalje ⁵	RAS	P. trichocarpa x P.
							deltoides
9	Koltay ⁴	KOL	P.euramericana	19	Villa.franca ²	VIF	P. alba
10	Unal ⁵	UNA	P.trichocarpa x				
			P.deltoides				

Az előállítás helye: ¹-Franciaország, ²-Olaszország, ³- Hollandia, ⁴- Magyarország, ⁵- Belgium, ⁶-Lengyelország

3.1.2. Búzaminták

Vizsgálataink során a fajtafenntartásból származó, klasszikus (GK Góbé) és haploid (portokkultúra) nemesítéssel előállított Doubled Haploid (DH) búzafajta (GK Délibáb), valamint az ezekből származó "doubled-haploid" utódpopulációk összehasonlító analízisét végeztük PCR-alapú módszerekkel. А vizsgálatokhoz az említett csoportok véletlenszerűen kiválasztott növényegyedeiből (4 18) izoláltunk DNS-t. А növényanyagot Szegedi Х а

Gabonatermesztési Kutató KHT biztosította számunkra. A felhasznált mintákat a 3. táblázat tartalmazza. A GK Góbé és GK Délibáb fajták esetében a mintavétel fajtafenntartásból származó törzsekből történt (a fajták minősítésének éve: 1992). A DH vonalakat 1997-ben állították elő. A minták begyűjtésének éve egységesen 2000 volt.

3. táblázat: A molekuláris összehasonlító vizsgálatokhoz felhasznált búzaminták előállításuk módja és

jel	Ô	lés	sü	K.	

Fajta, csoport	Előállítás módja	DH lépések száma	Jelölés	Mintaszám
GK Góbé	Köztermesztésben szereplő hagyományos fajta	-	A1-A18	18
GK Góbé DH	Portokkultúrával előállított DH vonal	1x	B1-B18	18
GK Délibáb	Köztermesztésben szereplő DH technikával előállított fajta	1x	C1-C18	18
GK Délibáb DH	Portokkultúrával előállított DH vonal	2x	D1-D18	18

3.1.3. Kenderminták

A kísérleteinkben tesztelt növényanyagot a 4. táblázat tartalmazza. A vizsgált fajták között 4 magyar származású kétlaki fajta (Unikó B, Fleischmann, Tiborszállási és KFF), egy dél-afrikai kétlaki kenderfajta (SA) és egy egylaki magyar fajta (Fibrimon) szerepelt. Az azonosított markerek szekvenciáira tervezett SCAR primereket hasadó nemzedékben teszteltük. A növényi anyag felnevelése és az ivar bonitálása (virágzás idején) a Kompolti Fleischmann Rudolf Kutatóintézetben történt.

4. táblázat: A RAPD és SCAR vizsgálatokhoz felhasznált kenderminták.

Fajta vagy keresztezés	Hímivarú növények	Nőivarú növények Egylaki növények		Összesen
	száma	száma	száma	
Sa	7	5	-	12
Unikó	6	5	-	11
Kff	4	6	-	10
Fleischmann	5	4	-	9
Tiborszállási	5	5	-	10
Fibrimon	-	-	4	4
Fleischmann \bigcirc x Fibrimon	31	42	2	75
(F2)				
Összesen	58	73	6	137

3.2. DNS-izolálás

3.2.1. DNS-izolálás nyárból

Nagy molekulatömegű DNS izolálásra Aitchitt et al. 1993 módszerét alkalmaztuk, amelyet kismértékben módosítottunk. Ezt a módszert eredetileg rostos növényekből történő

DNS-kivonásra dolgozták ki. 200-300 mg -70° C-on tárolt fiatal levelet porítottunk el dörzsmozsárban. A finom porrá őrölt növényi anyaghoz 5 ml 2 %-os CTAB kivonó puffert adtunk és 1 órán keresztül 60°C hőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat ezután 5 ml kloroform/izoamil-alkohol (24:1 v/v) keverékével extraháltuk, majd a DNS-t a felülúszóból 2/3 térfogatú izopropanollal csaptuk ki. Centrifugálást követően a DNS-t 70 %-os alkohollal mostuk és szárítás után TE₁ pufferban oldottuk fel. Az egyszálas RNS molekulák emésztése céljából a mintákat ezután 5 µl 1µg/µl koncentrációjú RN-áz oldattal kezeltük 37°C-on 30 percen keresztül. Kétszeres térfogatú 96 %-os alkohol és 1/10 térfogatú 3 M-os Na-acetát hozzáadása után a kicsapódó DNS-t centrifugálással ülepítettük ki, majd mosás után ismét TE₁ pufferben oldottuk fel. Kellő tisztaságú DNS kinyerése céljából a 96 %-os alkohollal történő DNS-kicsapást és 70 %-os alkoholos mosást 2-3 alkalommal ismételtük meg.

3.2.2. DNS-izolálás búzából és kenderből

Tíz napos búza csíranövényekből Benito et al. (1993) módszerével izoláltunk DNS-t. Ezt a módszert magból történő DNS-kivonásra dolgozták ki, de módosításokkal alkalmassá vált nagy molekulatömegű és tisztaságú DNS-izolálására zöld növényi részekből is. 100 mg levelet cseppfolyós nitrogénben porítottunk el és 240 μ l EB extrakciós pufferben szuszpendáltuk. 60 μ l 10% -os SDS és 4 μ l 10 mg/ml Proteinase K oldat hozzáadása után a mintákat 20 percig inkubáltuk 65°C-on. A következő lépésben 4 μ l 10 mg/ml RN-áz oldattal kezeltük a mintákat szobahőmérsékleten 10 percen keresztül. Ezután 160 μ l 3 M-os káliumacetátot (pH: 4,8) adtunk a mintákhoz és 20 percig jégen tartottuk őket. Centrifugálás után (13000 rpm, 4°C, 20 perc) a DNS-t a felülúszóból 0,1 térfogatú Na-acetáttal (pH: 5,2) és kétszeres térfogatú 96%-os etanollal csaptuk ki. A csapadékot centrifugálás után 70%-os etanollal mostuk, és TE₁ pufferben oldottuk fel.

Kender DNS-izolálásra ugyanazt a módszert használtuk, mint a búzánál. A leveleket itt azonban nem csíranövényekről, hanem kifejlett (virágzó) növényekről gyűjtöttük. A DNS-minősége szempontjából a fiatalabb levelek bizonyultak jobbnak. A kenderlevelekből több színanyag marad vissza a DNS-oldatban, ezért ebben az esetben több tisztítási lépésre volt szükség (96 %-os alkohollal történő kicsapás, 70 %-os alkohollal történő mosás és visszaoldás TE₁ pufferben).

3.3. A DNS minőségének ellenőrzése

Az izolált DNS minőségét agaróz gélelektoforézissel ellenőriztük. A DNS-mintákat 0,8-1 %-os agaróz gélen futtattuk és detektáláshoz etidiumbromidos festést alkalmaztunk.

3.4. RAPD, AP-PCR, SSR, STS és SCAR analízis

A RAPD, AP-PCR, SSR, STS és SCAR reakciót Perkin-Elmer GeneAmp 9700 és BIO-RAD Termocycler készülékekben végeztük. A reakció előtt a DNS-törzsoldatokat a szükséges mértékben hígítottuk. A felhasznált reakciókeverék komponenseit és a reakciókörülményeket az 5. táblázat tartalmazza. A reakció végtérfogata minden esetben 25 μl volt, amelyet 0,2 ml-es PCR csövekben mértünk össze. A reakció után a mintákat a gélelektroforézisig 4°C –on tároltuk. A különböző vizsgálatokban felhasznált RAPD, AP-PCR, SSR, STS és SCAR primerek/primerpárok a 6. táblázatban találhatók.

5. táblázat: A RAPD, AP-PCR, SSR, STS és SCAR reakciókeverékek összetétele és az alkalmazott reakciókörülmények.

¹A RAPD és AP-PCR vizsgálatokhoz egy, az SSR, STS és SCAR analízishez két primer került a reakciókeverékbe.

²A felsorolt enzimek koncentrációjától függően változott a reakciókeverékhez hozzáadott víz mennyisége.

Komponensek	Végleges koncentráció		
Templát DNS →	4-8 ng∕µl		
PCR puffer \rightarrow	1x koncentráció		
$MgCl_{2\rightarrow}$	2 -2,1 mM		
$dNTP$ -keverék $(1:1:1:1) \rightarrow$	0,3 mM	RAPD, AP-PCR, SSR, STS és S	SCAR reakciókörülmények
¹ Primer:		Előciktus	94°C – 2 perc
RAPD és AP-PCR→	12 nM	(1 ciklus)	
SSR, STS és SCAR \rightarrow	6nM+6nM		
² Taq DNS-polimeráz		Denaturálás	94°C – 10 másodperc
Promega→	1,5U25µl	Primerkapcsolódás	5. tábl. – 30 másodperc
Westteam →	1,5 U⁄25 µl	DNS-szintézis	$72^{\circ}C - 1$ perc
Sigma →	1,2 U/25 µl	(40 ciklus)	
$Gibco \rightarrow$	1 U/25 µl		
$^{2}\text{H}_{2}\text{Odd}$	szükséges mennyiség	Terminális DNS - szintézis	$72^{\circ}C-2$ perc
-		(1 ciklus)	Å

3.5. A PCR-termékek gélelektroforézise

Az amplifikátumok elválasztásához TAE puffert használtunk. A PCR csövecskékből 10 μl reakcióterméket pipettáztunk az agarózgél-zsebekbe. A RAPD, AP-PCR és SCAR reakciók termékeit horizontális gélelektroforézis kádban (BIO-RAD), 1,2-1,8 %-os agarózgéleken (Sigma, Reanál, Gibco, FMC), az SSR és STS amplifikátumokat pedig több esetben vertikális kádban (BIO-RAD), 2,5–3,5 %-os NuSieve 3:1 (FMC) agaróz felhasználásával választottuk el. A fragmentumok láthatóvá tételéhez a gélekhez 0,5 µg/ml koncentrációban etidiumbromidot adtunk. Ha a fragmentumok túlságosan halványak voltak a fragmentumok utófestéséhez SYBR Gold (Molecular Probes) festést alkalmaztunk. A géleket UV fény alatt (254 nm) polaroid kamerával fényképeztük le. A fragmentumok nagyságának megállapítása céljából a minták mellett molekulatömeg markert futtattunk (Fermentas, Promega).

3.6. AFLP analízis

Az AFLP analízishez (Vos et al. 1995) a genomiális búza DNS-t 40 µl végtérfogatban EcoRI és MseI enzimpárral emésztettük (0,5 µg templát DNS, 5 U Mse enzim, 5 U EcorI enzim, 1x enzimpuffer, 10 µl BSA) egy órán át 37°C hőmérsékleten, majd adaptereket ligáltunk a DNS-fragmentumokhoz (végtérfogat: 100 µl, 50 pmol MseI és 50 pmol EcoRI biotin-adapter, 2 U T4 ligáz/Promega, 1x ligáz-puffer). Három órán át tartó inkubálás után a ligátumot felhasználásig -20°C-on tároltuk. A ligátumból indított preszelektív amplifikáció (20 µl végtérfogat, 5µl ligátum, 30 ng E0 és M0 primer, 0,8 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 0,5 U Taq polimeráz/Fermentas, 1x PCR-puffer) után a kapott terméket 1/30 arányban H₂Odd-vel hígítottuk. Ezeket a hígított mintákat használtuk fel később templátként a szelektív amplifikációban, amelynek végtérfogata a preszelektív amplifikációéhoz hasonlóan 20 µl volt. A szelektív amplifikációhoz a következő komponenseket mértük össze: 5 ng EcoRI jelölt szelektív primer, 30 ng szelektív MseI primer, 8 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 0,5 egység Tag polimeráz (Fermentas), 1 x-es töménységű PCR-puffer. A második (szelektív) amplifikáció előtt az EcoRI primert y-33-P-ATP-vel (Amersham) végjelöltük (5 ng EcoRI primer, 0,1 U T4PNK enzim, 0,1 µl γ-33-P-ATP, 0,5x T4PNK puffer). A preszelektív és szelektív amplifikációt Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékben végeztük el, és mindkét esetben a következő reakciókörülményeket állítottuk be: 13 ciklus: 94°C – 30 másodperc;

 65° C – 30 másodperc; 72°C – 1 perc, majd 23 ciklus: 94°C – 30 másodperc; 56°C – 30 másodperc; 72°C – 1 pec. Futtatás előtt az AFLP amplifikátumokhoz azonos térfogatú AFLP gél-puffert pipettáztunk, majd három percig 90°C-on történő denaturálás után a mintákat gyorsan jégre helyeztük. Az így előkészített AFLP termékek elválasztásához 6 %-os 40 x 30 x 0,4 cm (magasság x szélesség x vastagság) méretű denaturáló poliakrilamid géleket öntöttünk (50 % urea, 1 x TBE puffer AFLP-hez, 600 µl APS, 30 µl TEMED). A mintákat (~5 µl) 30 perces melegítés után pipettáztuk a gélek zsebeibe. A gélelektroforézist (1800 V, 70 W, 35 mA) követően a géleket Wattmann papírra vittük át, majd vákuum alatt történő szárítás után a detektálás autoradiográfiával történt. Az AFLP elemzéshez három szelektív bázist tartalmazó szelektív primereket használtunk fel (6E táblázat) és összesen a következő 8 primer-kombinációval teszteltük a búzamintákat: E31/M35, E33/M40, E35/M57, E38/M47, E38/M60, E39/M34, E44/M44 és E44/M55.

6. táblázat: A RAPD, AP-PCR, SSR, STS és SCAR vizsgálatokban felhasznált primerek.

¹ - nyár-, ² búza- és ³ kender analízis során felhasznált primerek; Kapcs.: Primerek kapcsolódásának hőmérséklete;

_a - Operon Technologies/1000-T Atlantic Ave. Suite 108, Alameda, CA 94501-1147, USA, _b – UBC/University of British Columbia, _c – Tanszékünkön tervezett primerek, d – Sakamoto et al. (1995), _e – Röder et al. (1998), _f – Devos et al. (1995), _g – Mandolino et al. (1999), _h – Vos et al. (1995), _i – Smith et al. (1994), _i – Anderson et al. (1989).

Primerek	Szekvencia 5'-3'	Primerek	Szekvencia 5'-3'	Primerek	Szekvencia 5'-3'
OPA01 ² _a	CAGGCCCTTC	$OPA19^{1,2}_{a}$	CAAACGTCGG	OPK02 ^{1,2,3}	GTCTCCGCAA
$OPA02^{1,2}_{a}$	TGCCGAGCTG	$OPB05^{1}_{a}$	TGCGCCCTTC	OPO08 ^{1,2,3}	CCTCCAGTGT
$OPA03^{2,3}_{a}$	AGTCAGCCAC	$OPB06^{1,2}_{a}$	TGCTCTGCCC	$OPP08^{1,2,3}_{a}$	GTCCCGTTAC
$OPA04_a^2$	AATCGGGCTG	$OPB07^{1,3}_{a}$	GGTGACGCAG	$OPQ14^{1,2,3}_{a}$	GGACGCTTCA
$OPA05_a^2$	AGGGGTCTTG	$OPC15^{1,2,3}_{a}$	GACGGATCAG	$OPU08^{1,2,3}_{a}$	GGCGAAGGTT
$OPA07^{2,3}_{a}$	GAAACGGGTG	OPD05 ^{1,2,3}	TGAGCGGACA	$OPX11^{1,2,3}_{a}$	GGAGCCTCAG
OPA08 ^{1,2,3}	GTGACGTAGG	$OPD12^{1,3}_{a}$	CACCGTATCC	OPX18 ^{1,2,3}	GACTAGGTGG
$OPA09^{1,3}_{a}$	GGGTAACGCC	OPH11 ² _a	CTTCCGCAGT	OPAB09 ^{1,2}	GGGCGACTAC
$OPA11^{1,2}_{a}$	CAATCGCCGT	$OPJ01_{a}^{1}$	CCCGGCATAA	$OPAI21^{1,2,3}_{a}$	CACGCGAACC
$OPA12_a^2$	TCGGCGATAG	OPJ05 ¹ _a	CTCCATGGGG	$OPAL20^{1,2,3}$	AGGAGTCGGA
$OPA13^{1,2}_{a}$	CAGCACCCAC	OPJ06 ¹ _a	TCGTTCCGCA	UBC354 ^{1,3}	CTAGAGGCCG
$OPA14^{1,2}_{a}$	TCTGTGCTGG	$OPJ09^{1,3}_{a}$	TGAGCCTCAC	$NO08^{1,2,3}_{d}$	ATCCGCGTTC
$OPA16_a^2$	AGCCAGCGAA	OPJ17 ¹ _a	ACGCCAGTTC	$NO11^{1,2,3}_{d}$	ACGGCATATG
OPA17 ¹ _a	GACCGCTTGT	OPJ19 ¹ _a	GGACACCACT	$PAL2_{c}^{1}$	CCAGGTGGACC
$OPA18^{1,2}_{a}$	AGGTGACCGT	$OPJ20^{1}_{a}$	AAGCGGCCTC		

6A: RAPD primerek.

(D		n ' 1	
ムロ・		U nrimaralz	
	AF-FU	N DEHECK	
\mathbf{D} .	III I C	it primeren.	

Primerek Szekvencia 5'-3'		Kapes. °C	Primerek	Szekvencia 5'-3'	Kapes. °C	
$E9^{1}_{c}$	GACGAGATCTACGC	44°C	$E11^{1}_{c}$	ATGGGTCTTGCAGAG	44°C	
$E10^{1}_{c}$	CAAACTCGGAACCA	44℃	$E12^{1}_{c}$	GCGTAGATCTCGTC	44°C	

6C: SSR és STS primerek.

Primerek	Szekvencia 5'-3'	Kapes°C	Primerek	Szekvencia 5'-3'	KapesºC
WMS3 ¹ _e	GCAGCGGCACTGGTACATTT	55°C	$WMS410^{1}_{e}$	GCTTGAGACCGGCACAGT	55°C
3DL	AATATCGCATCACTATCCCA		2D5A	CGAGACCCTGAGGGTCTAGA	
WMS5 ¹ _e 3A	GCCAGCTACCTCGATACAACTC	50°C	GlyF1/R1 ¹ f1B	GCAGACCTGTGTCATTGGTC	55°C
	AGAAAGGGCCAGGCTAGTAGT		-	GATATAGTGGCAGCAGGATACG	
WMS55 ¹ _e 2B	GCATCTGGTACACTAGCTGCC	60°C	$GlyF2/R1_{f}^{1}1B$	GATCTGGCCACAAAGCGC	55°C
2B	TCATGGATGCATCACATCCT		-	GATATAGTGGCAGCAGGATACG	
6D					
$WMS174^{1}_{e}$	GGGTTCCTATCTGGTAAATCCC	55°C	$P1/P2_{f}^{1}1A$	TCCCGCCATGAGTCAATC	60°C
5D	GACACACATGTTCCTGCCAC		-	TTGGGAGACACATTGGCC	
WMS186 ¹ _e	GCAGAGCCTGGTTCAAAAAG	60°C	P3/P4 ¹ _i 1D	GTTGGCCGGTCGGCTGCCATG	63°C
5A	CGCCTCTAGCGAGAGCTATG		-	TGGAGAAGTTGGATAGTACC	
WMS261 ^{1} _e	CTCCCTGTACGCCTAAGGC	55°C	$DX51/Dx52^{1}$	GCCTAGCAACCTTCACAATC	63°C
2D	CTCGCGCTAGCCATTG		1D	GAAACCTGCTGCGGACAAG	

6D: SCAR primerek.

Primerek	Szekvencia 5'-3'	Kapes°C	Primerek	Szekvencia 5'-3'	Kapes.ºC
$SCAR119_{c}^{3}$	TCAAACAACAACAAACCG	52°C	SCAR323 [°] _c	GAGCGGACATCATTGCCT	55℃
	GAGGCCGATAATTGACTG			ATCACCCCACCGTTTAGG	
$SCAR145_{c}^{3}$	CTAGAGGCCGAGGATATC	55℃	SCAR390 ³ g	GTGACGTAGAGTTGAA	55 ℃
	GATATCCTCGGCCTCTAG		Ũ	CTCTCATAGCCTACGTCACA	

6E: AFLP primerek.

EcoRI-adapter : CTCGTAGACTGCCTACC CTGACGCATGGTTAA MseI-adapter: GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT

Primerek	CORE	ENZ	EXT	Primerek	CORE	ENZ	EXT
$E0_{h}^{2}$	5-GACTGCGTACC	AATTC		$M0_{h}^{2}$	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	
$EcoRI-31^{2}_{h}$	5-GACTGCGTACC	AATTC	AAA	MseI- 34^2_h	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	AAT
EcoRI-33 ² _h	5-GACTGCGTACC	AATTC	AAG	MseI-35 ² _h	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	ACA
EcoRI-35 ² _h	5-GACTGCGTACC	AATTC	ACA	$MseI-40^2_h$	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	AGC
EcoRI-38 ² _h	5-GACTGCGTACC	AATTC	ACT	MseI-44 $^{2}_{h}$	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	ATC
EcoRI-39 ² _h	5-GACTGCGTACC	AATTC	AGA	$Msel-47^2_h$	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	CAA
$EcoRI-44^{2}_{h}$	5-GACTGCGTACC	AATTC	ATC	MseI-55 ² _h	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	CGA
				MseI-57 ² _h	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	CGG
				$MseI-60^2_h$	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	CTC

3.7. Klaszter- és MDS-analízis

A RAPD és AP-PCR mintázatok kiértékelésénél csak a fő sávokat vettük figyelembe (fragmentum megléte: 1; hiánya: 0). Kiértékeléshez a SYN-TAX Version 5.0 (Podani,

1993) statisztikai szoftvercsomagot használtuk fel (UPGMA: Unweighted Pair Group Method of Arithmetic means). A genetikai távolságok becslésére a Jaccard indexet (Jaccard 1908) és a Simple matching (SM) egyezési koefficienst (Sokal and Michener 1958) használtuk:

Jaccard index:
$$J_{ab} = n_{ab}/(n_{ab} + n_a + n_b)$$

 $(J_{ab} = az a \text{ és b objektumok összehasonlításával kapott hasonlósági koefficiens; } n_{ab} = az a \text{ és b objektumokban}$ előforduló fragmentumok száma; $n_a \text{ és } n_b = \text{csak } az a vagy \text{csak } a \text{ b objektumban előforduló fragmentumok}$ száma)

SM koefficiens:

SM = (a+d)/n

(SM = két objektum összehasonlításával kapott hasonlósági koefficiens; a = mindkét objektumban előforduló fragmentumok száma; d = a két objektumból együttesen hiányzó fragmentumok száma; n = az összes fragmentum száma)

A nyár klónok páronkénti összehasonlításával kapott egyezési koefficienseket félmátrix táblázat tartalmazza. A klaszter analízisen kívül a fragmentumok alapján az SPSS 0.8 programmal elkészítettük a klónok többdimenziós (Multidimensional analysis, MDS) analízisét is. Az MDS analízis a megfigyelt objektumok (genotípusok vagy populációk) közötti hasonlóság/különbözőség bemutatását teszi lehetővé n-dimenziós (pl. n = 2 vagy n = 3), euklideszi térben. Az MDS analízis a klaszter analízistől jobb felbontást tesz lehetővé, mivel minden egyes objektum közötti távolság láthatóvá válik a 2 vagy 3 dimenziós térben.

Euklideszi távolság: $ED=(\sqrt{b+c})$

(ED = euklideszi távolság; b = az első objektumban meglévő és a második objektumból hiányzó fragmentumok száma; c = a második objektumban meglévő és az első objektumból hiányzó fragmentumok száma.

3.8. DNS-fragmentumok izolálása alacsony olvadáspontú gélből

A hím-ivarhoz kapcsolt RAPD fragmentumok klónozása céljából a RAPD amplifikátumokat 1 %-os alacsony olvadáspontú gélen (LMP, FMC) futtattuk, majd a hímivarhoz kapcsolt fragmentumokat kivágtuk a gélből és Eppendorf csövekbe helyeztük.
A fragmentumokat tartalmazó géldarabokhoz 5 x térfogatú 20 mM Tris (pH 8.0) és 1 mM EDTA (pH 8.0) oldatot adtunk. Öt perc 65°C hőmérsékleten történő inkubáció után a mintákat szobahőmérsékletűre hűtöttük, majd azonos térfogatú 0.1 mM Tris-szel (pH 8.0) telített fenolt mértünk hozzá. Ezután a mintákat 20 másodpercig rázattuk, majd 10 percig centrifugáltuk (20°C, 4000 rpm). A vizes fázist újra extraháltuk azonos térfogatú fenol-kloroform 1:1 arányú keverékével, majd ismét azonos térfogatú kloroformmal. A vizes fázist tiszta Eppendorf csövekbe pipettáztuk, 0,1 térfogat 3 M–os Na-acetátot és 2 x térfogat 4°C-os etil-alkoholt (96 %) adtunk hozzá és ezután a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Centrifugálás után (4°C, 5000 rpm, 20 perc) a csapadékot szárítottuk és végül a DNS-t 10 μl steril bidesztvízben oldottuk fel.

3.9. Klónozás plazmid vektorba

Az alacsony olvadáspontú gélből izolált fragmentumok klónozásához a pCR[®] 2.1 klónozó kitet (INVITROGEN) használtuk. A kereskedelemben kapható DNS-polimerázok (az általunk használt Taq-polimerázok is) többsége 90 %-ban olyan fragmentumokat eredményeznek, amelyek 3' végei egy túlnyúló timin nukleotidot tartalmaznak. A pCR[®] 2.1 klónozó vektor (1. ábra) a visszaizolált fragmentumok végeinek feltöltése nélkül is lehetővé teszi a klónozást, mivel a kitben található linearizált vektor végei túlnyúló adenin nukleotiddal rendelkeznek. A hímivarhoz kapcsolt fragmentumok ligálásához a következő komponenseket mértük össze egy mintához: 2 µl pCR[®] 2.1 vektor, 1 µl T₄ ligáz, 1 µl T₄ puffer, 1 µl desztillált víz és 5 µl inszert. A keveréket egy éjszakán át 16°C-on inkubáltuk.



1. ábra: A pCR[®] 2.1 klónozó vektor felépítése

3.10. Kompetens sejtek előállítása

Kompetens sejtek azok a baktériumsejtek, amelyek a baktériumot körülvevő közegből képesek DNS-t felvenni. Ez annak köszönhető, hogy a kompetens sejtek fala a DNSmolekulák számára átjárható (plazmid-DNS felvételre képes). SOB táptalajon a szélesztett és egy éjszakán át 37°C hőmérsékleten tenyésztett, néhány 2-3 mm átmérőjű Escherichia coli DH5α kolóniával 1 ml SOB tápoldatot oltottunk be és 2 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A szuszpenziót 1000 ml-es Erlenmayer lombikban 100 ml SOB oldathoz adtuk. A szuszpenziót 37°C-on inkubáltuk addig, amíg sejtkoncentráció 600 nm-en a 0,08-0,10 abszorpciós értéket el nem érte (az OD₆₀₀=0,08-0,10 érték 6-9 x 10⁷ sejt/ml koncentrációnak felel meg). A tenyészetet centrifuga csövekbe osztottuk szét, 10-15 percig jégen tartottuk, majd centrifugáltuk (4°C, 12-15 perc, 2000-3000 fordulat/perc). A felülúszót leöntöttük a csapadékról és a tenyésztő oldat 1/3-ának megfelelő térfogatú FSB oldatban szuszpendáltuk fel a baktériumokat. Jégen történő inkubáció (10-15 perc) után az oldatot centrifugáltuk (4°C, 12-15 perc, 2000-3000 fordulat/perc), eltávolítottuk a felülúszót, majd a sejteket az eredeti térfogat 1/12,5 részének megfelelő térfogatú FSB oldatban szuszpendáltuk (2,5 ml tenyészethez 200 µl FSB oldatot adtunk). Ezután 3,5 térfogat % DMSO oldatot adtunk a szuszpenzióhoz, jól elkevertük és a csöveket 5 percig jégen inkubáltuk. Újabb adag DMSOt adtunk az oldathoz (3,5 V %), a csöveket 10-15 percig jégen inkubáltuk. Az így kezelt E. coli szuszpenziót 200 µl-enként előhűtött 1.5 ml-es Eppendorf csövekbe pipettáztuk és felhasználásig -70°C-on tároltuk (Sambrook et al 1989).

3.11. Kompetens sejtek transzformálása és szelekciója

Kompetens sejtek transzformálásához a fent említett módon előkészített és -70°C-on tárolt DH5 α *E. coli* törzset (a) és a TA klónozó kit INV α F'(b) kompetens sejtjeit használtuk fel:

a) DH5α kompetens sejtek transzformációja: 200 µl DH5α kompetens sejthez 1-2 µl ligátumot adtunk. Egy órás jégen történő inkubáció után hősokkot alkalmaztunk (másfél perc, 42°C), majd a mintákhoz 800 µl SOC tápoldatot adtunk. Egy órás 37°C-on történő tenyésztés után a mintákat 1 percig centrifugáltuk. A sejteket 100 µl friss SOC tápoldatban szuszpendáltuk, majd szilárd, kanamicint (100 µg/ml) és

szelekciós markert (10 μl X gal/50 mg/ml; 40 μl 0,1M IPTG) tartalmazó táptalajra szélesztettük.

b) INVoF' kompetens sejtek transzformációja: A kompetens sejtekhez 2 μl 0.5 M βmerkaptoetanolt és 2 μl -20°C-on tárolt ligátumot kevertünk pipettaheggyel. A mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd ezt fél perces (42°C) hősokk követte. Ezután 250 μl SOC tápoldatot adtunk a mintákhoz. Egy órás 37°C-on történő inkubációt követően a sejteket szilárd, kanamicint (100µg/ml) és szelekciós markert (10 µl X gal/50 mg/ml; 40 µl 0,1M IPTG) tartalmazó táptalajra szélesztettük.

3.12. Kolónia-PCR

A fehér (transzformáns) baktérium kolóniákból kolónia-PCR-t indítottunk (Gassen 1996). Ez a reakció lehetővé teszi annak a megállapítását, hogy a kolóniák a megfelelő inszertet tartalmazzák-e. A tesztelt és kiszélesztett kolóniákból fogpiszkálóheggyel baktériumsejteket mostunk 100 µl steril bidesztvízbe. 10 perc forralás után a mintákat szobahőmérsékletre hűtöttük, majd a felülúszót a PCR reakcióban templátként használtuk fel (Kiss 2001). A kolónia-PCR reakciókörülményei és a reakciókeverék összetétele megegyezett a RAPD reakció során alkalmazottakkal. A megfelelő fragmentumokat tartalmazó kolóniákból plazmidot izoláltunk.

3.13. Plazmid-DNS izolálás

A nagy mennyiségű, kiváló minőségű és tisztaságú plazmid DNS-izoláláshoz a Quantum Prep®/Bio Rad Plazmid Miniprep Kit-et használtuk. LB folyékony táptalajon nevelt (éjszakán át rázatott) baktérium tenyészetekből 1-1 ml baktérium szuszpenziót Eppendorf csövekbe pipettáztunk. Harminc másodpercig tartó centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk. (megjegyzés: minden centrifugálási lépést maximális fordulatszámmal hajtottunk végre). A csapadékhoz 200 µl szuszpendáló oldatot mértünk és pipettaheggyel teljesen szuszpendáltuk. Ezután 250 µl lizáló oldatot adtunk a mintákhoz. Ebben a lépésben történik a sejtek lízise és maximum 10 percig tarthat. 250 µl semlegesítő oldat hozzáadása után az elegyet óvatosan összekevertük. Öt percig tartó centrifugálással választottuk el a csapadékot a plazmid DNS-től, melyet a felülúszó tartalmazott. Amíg a centrifugálás tartott, a Spin filtert 2 ml-es mosóedénybe helyeztük és összekevertük a Quantum Prep Matrixot.

Miután a felülúszót a filterbe pipettáztuk a Quantum Prep Matrix-ból is 200 μ l-t a filterbe mértünk. Az elegyet ezután 30 másodpercig centrifugáltuk. A mosó pufferhez 1/2 térfogatnyi 95 %-os etanolt adtunk. Kivettük a Spin filtert a csőből és kiöntöttük a szűrletet, majd visszatettük a filtert ugyanabba a csőbe. Hozzáadtunk 500 μ l mosó puffert, és 30 másodperces centrifugálás után ismét kiöntöttük a szűrletet, majd újra 500 μ l mosó puffert adtunk hozzá. Két perc elteltével a Spin filtert kivettük a csőből és 1.5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük át. Hozzáadtunk 100 μ l H₂Odd-t. A DNS-t 1 perces centrifugálással választottuk el, majd –20°C-on tároltuk.

3.14. Plazmid-szekvenálás

Az inszerteket tartalmazó, nagy mennyiségben felszaporított és baktériumokból kinyert plazmidok szekvenálását az MTA Szegedi Biológiai Központjában végezték univerzális (T7 és M13) primerek felhasználásával.

3.15. A klónozott fragmentumok kinyerése plazmidból

A pCR2.1 plazmidba (1. ábra) klónozott RAPD fragmentumok kivágásához 5 μ l (~ 10 μ g) plazmid-DNS-t, 2 μ l EcoRI enzimet (12U/ μ l), 3 μ l 10x H puffert és 20 μ l H₂Odd-t mértünk össze, majd 1-2 órára 37°C-ra helyeztük a mintákat.

3.16. Szekvencia-analízis

A DNS-szekvenciák kiértékeléséhez (hasítóhelyek és leolvasási keretek meghatározása) és adatbanki összehasonlításához (homológia keresése más szekvenciákkal) a Blast szoftvercsomagot használtuk.

3.17. RAPD mintázatok Southern analízise

3.17.1. Gélek blottolása

Az hím-ivarhoz kapcsolt markereket eredményező RAPD amplifikátumokat 1 %-os agaróz gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra vittük át (Sambrook et al. 1989). A géleket 10 percig 0.25 M HCl oldatban enyhén rázattuk, H₂Odd-vel leöblítettük és 30 percre 0.5 M NaOH/0.5 M NaCl oldatba helyeztük. Ezután gélek méretével megegyező nagyságú membránokat vágtunk ki, amelyeket desztillált vízzel megnedvesítettünk és 5 x

SSC oldatba mártottunk, majd végül összeállítottuk a blottot. Egy éjszakán át tartó blottolás után a blottot szétszedtük és a membránokat 5x SSC (5 perc) oldatban történő mosás után UV-lámpán szárítottuk.

3.17.2. A próba DNS-ek digoxigenines jelölése

A membránra blottolt RAPD mintázatok hibridizlásához 11-digoxigenin-dUTP –vel (Boehringer Mannheim) jelölt próbákat használtunk. A próba DNS-ek (plazmidból kiemésztett inszertek) nem radioaktív jelölését random primer módszerrel végeztük: a próba DNS-eket (3–10 μ g) 10 percig forró vízben denaturáltuk, majd sós jégre helyeztük. A mintához hozzáadtunk 2 μ l hexanukleotid primert és 2 μ l dNTP-t, amely tartalmazta a digoxigeninnel jelölt dUTP-t is. Ezt követően 9 μ l desztillált vizet és 1 μ l Klenow enzimet adtunk a mintákhoz. Húsz órás 37°C-on történő inkubáció után a reakciót 2 μ l 0,2 M EDTA (pH 8,0) hozzáadásával állítottuk le. A DNS kicsapása 2,5 μ l 4 M LiCl-dal, valamint 75 μ l - 20°C hőmérsékletű 96 %-os etanollal történt. Ezután a mintát 2 órán keresztül –20°C-on tartottuk, majd 15 percig centrifugáltuk (12000 g) és 50 μ l 70 %-os etanollal (4°C) mostuk. A DNS-t vákuum alatt szárítottuk, majd 50 μ l TE₁ pufferben oldottuk fel (37°C, 30 perc).

3.17.3. Prehibridizáció és hibridizáció

A zárt fóliatasakokba helyezett (az előbbiek szerint előkészített) nylon membránokra hibridizációs puffert öntöttünk (20 ml/100 cm² membrán). A tasakok lezárása után a membránokat 1 órán keresztül 68°C-on inkubáltuk (prehibridizáció). Ezután a puffert eltávolítottuk és a membránokra a megfelelő hibridizációs puffert öntöttük (2,5 ml/100 cm² membrán), amelyek már tartalmazták a denaturált, digoxigeninnel jelölt próba DNS-eket is (5 μ l/2,5 ml hibridizációs puffer). A membránokat legkevesebb 6 órán keresztül inkubáltuk 68 °C-on. Az inkubáció után a membránokat kétszer 5 percig 2 x SSC/0,1 % SDS oldattal, majd kétszer 15 percig (68°C-on) 0,1 x SSC/0,1 % SDS oldattal mostuk. Ezután a membránt rövid ideig mosó pufferrel mostuk, majd 30 percig blokkoló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten.

3.17.4. Színreakció

A membránokra puffer II-t öntöttünk (20 ml/100 cm² membrán) és hozzáadtunk 4 μ l anti-DIG AP konjugátumot. Harminc percig tartó inkubálás után a membránokat kétszer 15 percig mosópufferrel mostuk, majd 2 percig detektáló pufferben inkubáltuk. Ezt követően 45 μ l NBT (nitro kék tetrazólium klorid) és 35 μ l BCIP (5-bróm-4-klór-3-indolil foszfát) oldatot összekevertünk 10 ml detektáló pufferrel és ezt az oldatot a detektáló puffer leöntése után a membránhoz adtuk. A membránokat a színreakciót adó oldattal együtt sötét helyre helyeztük. A színreakciót a megfelelő színintenzitás elérése után a membránok TE₁ pufferbe helyezésével állítottuk le.

3.18. Genomiális Southern analízis

A különböző ivarú kenderegyedekből izolált DNS-t (10 μg) külön – külön EcoRI, HindIII és DraI restrikciós enzimekkel emésztettük. Futtatás után az előzőekben leírtak szerint nylon membránra (Amersham) vittük át a gélelektroforézissel elválasztott fragmentumokat. A genomiális Southern analízishez a DNS-próbákat α-32-P-dCTP –vel jelöltük random primer jelölési módszerrel (Bucherna et al 1999.). A hibridizációhoz szigorú körülményeket (68°C) választottunk. Az eredmények detektálása autóradiográfiával történt.

3.19. SCAR markerek tervezése

A hímivarhoz kapcsolt klónozott és szekvenált fragmentumokra SCAR primereket terveztünk. A primerek tervezése részben manuálisan és részben az Oligo 4.1 program (National Biosciences) felhasználásával történt. A primer-párokat az ivarhoz kapcsolt RAPD szekvenciák következő pontjaira terveztük:

OPD05₉₆₁/forward 2.- 19., reverse 307. – 324. pozíció; UBC354₁₅₁/forward 30.- 47., reverse 131. – 148. pozíció és UBC354₁₇₂/forward 1.- 18., reverse 125. – 145. pozíció.

3.20. Pufferek és oldatok

DNS-izolálás:

CTAB kivonó puffer

100 mM Tris-HCl, pH: 8; 1,4 mM NaCl; 20 mM EDTA;

	2% CTAB (w/v); 0,2 % 2-merkaptoetanol							
EB puffer	10 mM Tris pH: 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl							
SDS törzsoldat	10% SDS (w/v) H ₂ Odd -ben oldva							
Na-acetát oldat	3 M Na-acetát; jégecet pH 5,2							
K-acetát oldat	3 M K-acetát; jégecet pH 4,8							
Proteináz K-oldat	10 mM Tris-HCl, pH: 8; 10 mM EDTA; 1 mM NaCl; 0,5							
	% SDS (w/v) 100 µg/ml Proteináz K							
RN-áz oldat	10 mg/ml RN-áz A; 10 mM Tris-HCl, pH: 7,5; 15 mM							
	NaCl; 15 percig 100°C-ra felmelegítve, majd szobahőmérsékletre hűtve							
TE ₁ -puffer	10 mM Tris-HCl pH: 8; 1 mM EDTA							
DNS-vizsgálat:								
50xTAE puffer	2 M Tris-HCl, pH: 8; 50 mM EDTA							
Etidium-bromid oldat	10 mg/ml							
10x TBE puffer AFLP-hez	1 M Tris-aminometán; 1 M bórsav; 25 mM EDTA pH 8							
AFLP gél-puffer	98 % formamid; 10 mM EDTA pH 8; 1 mg/ml							
	brómfenolkék; 1 mg/ml xilén-cianol							
Klónozás:								
LB-tápoldat	1 % Bacto Tripton; 0,5 % élesztőextraktum; 0,5 % NaCl;							
	1,5 % agar							
FSB-oldat	KCl 100mM; MnCl ₂ 4 H_2O 45mM; MnCl ₂ 4 H_2O 10 mM;							
	Hexammin-kobaltklorid 3mM; Kálium-acetát 10 mM; Glicerin 10 %							
	w/v							
SOB-tápoldat	Bakto Tripton 2%; élesztő kivonat 0,5 %; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM;							
	MgCl ₂ 10 mM; MgSO ₄ 10mM							
SOC táptalaj	A SOB tápoldat plusz 20 mM glükóz.							
Hibridizálás:								
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrát; pH 7 HCl-al beállítva							

3 M NaCl; 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ; 20 mM EDTA; pH 7,4
NaOH-val beállítva
2 % Polivinilpirrolidon; 2% BSA; 2% Ficoll
5x SSPE; 5x Denhardt; 0,2 % SDS; 0,25 mg/ml denaturált
heringsperma
0,5x SSC; 0,1 % SDS

3.21. A vizsgálatok során felhasznált kit-ek

TA klónozó kit	pCR® 2.1 (Invitrogen)
Plazmidizoláló miniprep kit	Quantum Prep® (Bio Rad)
Digoxigenines jelölő kit	Boehringer Mannheim

4. Eredmények

4.1. Allamilag elismert hazai nyár klónok molekuláris polimorfizmusa

Vizsgálatainkban 19 Magyarországon államilag elismert nyár klón RAPD és AP-PCR analízisét végeztük. A klónok két fajhoz: *P. euramericana* (15 klón) és *P. alba* (1 klón), és két keresztezéshez: *P. trichocarpa* x *P. deltoides* (2 klón) és *P. pyramidialis* x *P. berolinensis* (1 klón) tartoztak (2. táblázat). A 19 klón DNS-mintáit összesen 40 mintázatot eredményező primerrel (36 RAPD és 4 AP-PCR; 6. táblázat) teszteltük. A primerek közül 35 eredményezett polimorfizmust. A fragmentumok száma 1 (OPJ06) és 16 (OPB05, OPJ08), a méretük pedig 250 és 2500 bp között volt. A 2. ábrán az OPK02 (A) és OPX11 (B) és primerekkel kapott RAPD mintázatok láthatók.



2. ábra. A 19 nyár genotípus (2. táblázat) OPK02 és OPX11 primerekkel kapott RAPD mintázatai. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

18 polimorfizmust eredményező pimer 162 jól értékelhető fragmentuma alapján klaszteranalízist végeztünk (a klaszter analízisbe vont RAPD mintázatok közül néhány a függelékben, az I. ábrán látható). A gélekről készült polaroid képek kiértékelésekor a fragmentumok megléte (1) és hiánya (0) alapján bináris adattáblázatot készítettünk. A klaszter analízishez a SYN-TAX (Podani 1993) software-t használtuk. A genetikai távolságok meghatározására a Jaccard indexet és az SM egyezési koefficienst választottuk. Az SM egyezési koefficiens az egyezéseket és a közös hiányokat figyelembe vevő, a Jaccard index pedig a közös hiányokat figyelmen kívül hagyó hasonlósági koefficiens. A kétféle hasonlósági koefficienssel kapott dendrogramok a 3. ábrán láthatók.



3. ábra. A nyár klónok klaszter analízisével kapott dendrogramok. Jaccard (bal oldali ábra) és SM (jobb oldali ábra) hasonlósági koefficienssel mért genetikai távolságok.

A nyár klónok ugyanazokba a klaszterekbe kerültek mindkét hasonlósági koefficiens alapján és ezek egymáshoz viszonyított helyzete is megegyezik (3. ábra). Különbségeket a mért genetikai távolságok relatív viszonyában találtunk. A dendrogramokon (3. ábra) jól látszik, hogy a 19 nyár genotípus közül a VIF tért el leginkább. A vizsgálatban 4 fő klaszter csoport különült el, amelyek közül az elsőbe tartozik a már említett VIF (*P. alba*) klón. A második csoportot a *P. trichocarpa x P. deltoides* klónok (UNA és RAS) alakítják. Külön csoportba került a KOR (*P. pyramidialis x P. berolinensis*) klón. A negyediket pedig a *P. euramericana* klónok alkotják, melyen belül további alcsoportok figyelhetők meg. Egy alcsoportba tartoznak a ROB, SUD, PAN, I21, H32, BL, I45 és AGA klónok és külön-külön alcsoportot alkotnak az I15, TRI és I27, valamint a KOP és KOL genotípusok. A negyedik klaszterben a BDA és PAR klónok különállnak és a legkisebb hasonlóságot mutatják a többi klónnal. A Jaccard indexel kiszámított hasonlósági koefficienseket a 7. táblázat tartalmazza.

	ROB	BDA	115	127	145	KOP	TRI	SUD	KOL	UNA	121	AGA	PAN	PAR	H32	BL	KOR	RAS	VIF
ROB	1																		
BDA	,703	1																	
115	,724	,770	1																
127	,724	,735	,813	1															
145	,793	,680,	,717	,717	1														
KOP	,777	,690	,664	,649	,720	1													
TRI	,707	,718	,832	,794	,735	,679	1												
SUD	,815	,716	,737	,737	,750	,738	,792	1											
KOL	,723	,625	,705	,721	,716	,771	,772	,718	1										
UNA	,618	,573	,619	,532	,596	,573	,560	,556	,522	1									
121	,753	,745	,768	,699	,781	,750	,750	,696	,698	,660	1								
AGA	,787	,722	,726	,726	,798	,712	,745	,761	,673	,600	,793	1							
PAN	,800	,673	,743	,760	,773	,743	,778	,776	,740	,623	,788	,766	1						
PAR	,694	,657	,693	,660	,740	,667	,660	,690	,600	,606	,720	,713	,680,	1					
H32	,789	,745	,733	,750	,745	,783	,768	,784	,714	,583	,778	,774	,806	,720	1				
BL	,796	,733	,792	,720	,750	,738	,773	,789	,670	,600	,802	,761	,758	,724	,821	1			
KOR	,623	,565	,566	,553	,602	,632	,595	,606,	,611	,479	,589	,561	,613	,568	,604	,591	1		
RAS	,660	,582	,583	,527	,621	,637	,555	,579	,558	,637	,607	,626	,587	,600	,578	,625	,568	1	
VIF	,414	,387	,409	,385	,374	,419	,397	,391	,415	,350	,370	,369	,378	,383	,393	,416	,460	,445	1

7. táblázat: A Jaccard indexel kiszámított hasonlósági koefficienseket tartalmazó félmátrix táblázat (a legkisebb és legnagyobb értékeket kiemeltük).

A hasonlósági koefficiensek értéke 0,350 és 0,832 között volt. A VIF értékei a legkisebbek (0,350–0,460) voltak, a legnagyobb hasonlóságot pedig az I15 és TRI klónok között kaptuk (0,832).

A dendrogramokon kívül a klónok közötti egyezőség ill. különbözőség jobb szemléltetése céljából a bináris adattáblázat alapján az SPSS 8.0 programmal MSD analízist végeztünk (algoritmus értékek: max. iteráció – 30; konvergencia kritériuma – 00100; min. S – stressz –00500). A kétdimenziós (n = 2) MDS rajz a 4. ábrán látható.



4. ábra: Az MDS analízis eredménye a 19 nyár genotípusban kapott 162 RAPD és AP-PCR fragmentum alapján.

A 35 polimorfizmust adó primerből 19 faj- vagy hibrid-specifikus mintázatot eredményezett. Az OPX18 primerrel egy a *P. euramericana* klónokra specifikus fragmentumot sikerült felszaporítanunk. Tíz primer eredményezett olyan fragmentumot (fragmentumokat), amelyek csak a VIF (*P. alba*) klón mintázatában voltak jelen. Csak az UNA és RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*), valamint KOR (*P. pyramidialis x P. deltoides*) klónokra specifikus fragmentumot 4-4 primer adott. Ezek közül az eredmények közül szemléltet néhányat az 5. ábra.



5. ábra. A: Az OPX18 primerrel kapott *P. euramericana* (csillaggal jelölt minták) klónokra specifikus fragmentum. B: Az OPU08 primerrel kapott VIF (*P. alba*) klónra specifikus fragmentum. A specifikus sávokat a nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

A vizsgált 19 nyár klón közül (2. táblázat) az első 10 klón hím-, az utolsó 9 pedig nőivarú volt. A tesztelt 40 primer közül egyik sem eredményezett ivarhoz kapcsolt markert.

4.2. Búzafajták és DH származékaik RAPD, SSR, STS és AFLP analízise

4.2.1. RAPD analízis

A RAPD vizsgálatok során első lépésben olyan primereket kerestünk, melyekkel a két alapfajta (GK Góbé és GK Délibáb) elkülöníthető egymástól. A tesztelt 30 RAPD primerből (6. táblázat) 6 (OPAB09, NO11, OPH11, OPA16, OPQ14 és OPX11) tette

lehetővé a fajták és a hozzájuk tartozó DH vonalak megkülönböztetését. A tesztelt primerek 2-10 fragmentumot amplifikáltak 200-2500 bp között. A 6 primer 7 polimorf fragmentumot eredményezett a két fajtában.

A teljes mintaszámot (3. táblázat) az AB09, OPX11, OPA16 és NO11 primerekkel vizsgáltuk meg. A két fajta megkülönböztetésére alkalmas polimorf fragmentumok az alapfajta (GK Góbé vagy GK Délibáb) és a hozzá tartozó DH vonalak minden egyedében jelen voltak. Az NO11-es és OPX11–es primerrel kapott RAPD mintázatokat a 6. és 7. ábra szemlélteti. Egyedi különbségeket egyik RAPD primerrel sem kaptunk.



6. ábra: Az NO11-es primerrel kapott RAPD mintázat. A1-A18: GK Góbé fajta, B1-B18: GK Góbé DH vonalai, C1-C18: GK Délibáb és D1-D18: GK Délibáb DH vonalai. M = molekulatömeg marker 100 bp (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp. A polimorf fragmentumot a nyilak jelzik.



7. ábra: Az OPX11-es primerrel kapott RAPD mintázat. A1-A6: GK Góbé fajta, B1-B10: GK Góbé DH vonalai, C1-C10: GK Délibáb és D1-D18: GK Délibáb DH vonalai. M = molekulatömeg marker 100 bp (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp. A polimorf fragmentumot a nyilak jelzik.

4.2.2. SSR és STS analízis

A tesztelt 12 SSR primerpár (6. táblázat) közül a WMS5, WMS261 és P1/P2 mikroszatellit, valamint a Dx51/52 STS primerek nem eredményeztek különbséget a GK Góbé és GK Délibáb fajták, valamint az ezekből származó DH vonalak között. A P1/P2 primer (Devos et al. 1995) LMW glutenin mikroszatellit szekvenciára tervezett specifikus primerpár, amelynek lókusza az 1A búzakromoszómán található. A Dx51/Dx52 STS primerpár (Anderson et al. 1989) a HMW glutenin Dx5 alegység kimutatására alkalmas. Az x (Dx5 és Dx2) és y (Dy10 és Dy12; Smith et al. 1994) típusú HMW glutenin alegységek meghatározó jelentőségűek a sikér minőségében (rugalmasság). A vizsgálatainkban szereplő genotípusok (GK Góbé, GK Délibáb és DH vonalaik) mintázatában a kedvezőbb Dx5 génnel kapcsolt 450 bp nagyságú fragmentum amplifikálódott (8/C. ábra).



8. ábra: A WMS 5 (A), P1/P2 (B) mikroszatellit és Dx51/52 STS (C) primerekkel kapott monomorf PCR mintázatok. A lókusz-specifikus fragmentumokat a nyilak jelzik. A8 és A9: GK Góbé fajta, B10 és B11: GK Góbé DH vonalai, C10 és C11: GK Délibáb, D10-D11: GK Délibáb DH vonalai. M = molekulatömeg marker 100 bp (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

A WMS3, WMS55, WMS174, WMS410, GlyF1/R1 GlyF2/R1 mikroszatellit és P3/P4 STS primerek egy-egy polimorf fragmentumot eredményeztek, amelyekkel a GK Góbé fajtát és a belőlük előállított DH származékokat a GK Délibáb fajtától és annak DH vonalaitól lehetet megkülönböztetni. Egyedi különbségeket ezekkel a primerekkel sem kaptunk (9. ábra).

Az y típusú HMW glutenin alegységre specifikus P3/P4 STS primerpárral (Smith et al. 1994) a GK Góbé fajtában és DH vonalaiban 576 bp nagyságú fragmentum szaporodott fel,

amely a kedvezőbb 1Dy10 allél jelenlétére utal. Ezzel ellentétben, a Délibáb fajtában és DH vonalaiban egy nagyobb feltehetően a kedvezőtlenebb 1Dy12 allélal kapcsolt 612 bp nagyságú fragmentum amplifikálódott (10. ábra).



9. ábra: A GK Góbé (A1-A6), a GK Góbé DH vonalai (B1-B10), a GK Délibáb (C1-C10) és a GK Délibáb DH (D1-D10) vonalainak mintázata az F2/R1 primerpárral, amelyek a γ-gliadin pszeudogén mikroszatellita régió határszekvenciáira specifikusak. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.



10. ábra: A P3/P4 primerekkel kapott STS mintázat. Az 1Dy10 génnel kapcsolt 576 bp nagyságú (A8 és A9: GK Góbé fajta, B10 és B11: GK Góbé DH vonalai) és 1Dy12 génnel kapcsolt 612 bp (C10 és C11: GK Délibáb, D10-D11: GK Délibáb DH vonalai)
fragmentumokat nyilak jelzik. M = molekulatömeg marker 100 bp (Fermentas): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

A tesztelt 12 SSR és STS primerek közül egyedi különbségeket egyedül a WMS186-os primerpárral kaptunk. A WMS186-os SSR lókusz az 5A kromoszómán található GA ismétlődő szekvencia, amelynek mérete a GK Góbé fajta egyedeiben és GK Góbé DH vonalaiban ~130 bp volt. A GK Délibáb fajta 10 egyede közül 4-ben ~130 bp, 1 egyedben ~100 bp és 5 növényben pedig mindkét (~130 és ~100 bp) allél jelen volt. A GK Délibáb fajta DH vonalainak összes egyedében felszaporodott a ~130 és ~100 bp fragmentum is (11. ábra).



11. ábra: A WMS186 SSR primerpárral kapott SSR mintázat. A1-A6: GK Góbé fajta,
B1-B10: GK Góbé DH vonalai, C1-C10: GK Délibáb és D1-D10: GK Délibáb DH vonalai.
A különbségeket a nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 3000,
2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

Az SSR és STS vizsgálat néhány további eredménye a függelékben, a II. ábrán található.

4.2.3. AFLP analízis

A búzamintákat 8 AFLP primerkombinácóval vizsgáltuk (E31/M35, E33/M40, E35/M57, E38/M47, E38/M60, E39/M34, E44/M44 és E44/M55), amelyek közül (az E35/M57 primerkombináció kivételével) 7 eredményezett különbségeket. A primerkombinációkkal 100-150 fragmentum szaporodott fel. Összesen 81 polimorf fragmentumot kaptunk, amelyet az ezekre szerkesztett fragmentumtérkép ábrázol (12. ábra). A szelektív AFLP primerpárra jutó polimorf sávok száma 4 és 20 között volt. Negyvenhét olyan fragmentumot találtunk, amelyek csak az egyik, vagy a másik alapfajta egyedeiben (GK Góbé, DK Délibáb) és azok DH vonalaiban voltak jelen. A GK Góbé és a DH vonalai között 9 marker mutatott különbséget, ezzel szemben a GK Délibáb és DH vonalainak elkülönítésére a vizsgált primer kombinációk nem adtak lehetőséget.

Összesen 23 olyan fragmentumot azonosítottunk, amelyek a 4 csoport között és a csoportokon belül egyedi eltéréseket adtak. Az egyes csoportokon belül a polimorf fragmentumok száma a következő volt: GK Góbé (hagyományos fajta): 4, GK Góbé DH vonal: 11, GK Délibáb (DH fajta): 12 és GK Délibáb DH vonal: 3. Az AFLP elemzés néhány eredményét a függelékben, a III., IV és V. ábrán mutatjuk be.

A RAPD, SSR, STS és AFLP primerekkel végzett vizsgálatok összesítő táblázata a függelékben tekinthető meg.



12. ábra: A hét polimorfizmust eredményező AFLP primerkombinációval kapott markerek fragmentumtérképe (81 sáv). A1-A6: GK Góbé fajta, B1-B10: GK Góbé DH vonalai, C1-C10: GK Délibáb és D1-D10: GK Délibáb DH vonalai.

4.3. Ivari markerek azonosítása és vizsgálata kenderben

4.3.1. RAPD analízis

Három kenderfajta (Sa, Unikó, Kff, 4. táblázat) egyedi DNS– mintáiból hím- és nőivarú csoportosított mintákat alakítottunk ki. Az így kapott 6 mintát (3 \bigcirc és 3 \eth) 21 olyan RAPD primerrel teszteltük, amelyek már más növényfajokban ivari polimorfizmust eredményeztek (1. és 6. táblázat). A vizsgált 21 primer közül mindegyik értékelhető mintázatot eredményezett és összesen 160 fragmentum szaporodott fel. A primerenként kapott fragmentumok száma 2 (OPD12) és 19 (No8), mérete pedig150 és 2500 bp között változott. A csoportosított minták analízise során a 160 fragmentumból kettő (1,25 %) csak hímivarú minták mintázatában jelent meg. Ezt a két fragmentumot az OPD05 és UBC354 primerek eredményezték, a nagyságuk pedig ~950 és ~150 bp volt (13. ábra).



13. ábra. Az OPD05 (A) és UBC354 (B) primerekkel kapott RAPD mintázatok ivar szerint kialakított csoportos mintákban. Nyilak jelzik azokat a fragmentumokat, amelyek csak a hímivarú mintákban jelentek meg. U2n: Unikó kétlaki diploid, K2n: KFF kétlaki diploid, Sa2n: Sa kétlaki diploid; m: hímivarú minták, f: nőivarú minták, M: PCR molekulatömeg marker (Promega): 1000, 750, 500, 300, 150.

Sakamoto et al. (1995) a CBDA kender törzs RAPD vizsgálatával (15 primer) két hímivarhoz kapcsolt fragmentumot azonosított (500 bp/No8 és 730 bp/No11). Ezzel a két primerrel azonban többszöri ismétléssel sem tudtuk az 500 ill. 730 bp nagyságú markerek jelenlétét a hímivarú egyedekben kimutatni.

A csoportosított minták RAPD analízise után az OPD05 és UBC354 primereket a 4. táblázatban szereplő fajták egyedi DNS mintáin teszteltük. A ~950 (OPD05) és ~150 (UBC354) bp nagyságú fragmentumok minden hímivarú egyed RAPD mintázatában megjelentek, a nőivarú egyedekéből pedig hiányoztak. Kontrollként a Mandolino et al. (1999) által azonosított és MADC2 szekvenciára tervezett SCAR primerpárt (6. táblázat) használtuk fel. Ez a hímivarhoz kapcsolt marker is csak azokban a mintákban amplifikálódott, amelyekben a ~950 (OPD05) és ~150 (UBC354) bp nagyságú fragmentumok is felszaporodtak. A 14. ábrán az Sa és KFF fajták OPD05 és UBC354 RAPD, valamint a SCAR₃₉₀ szekvenciaspecifikus primerekkel kapott PCR mintázatai láthatók. A vizsgálatok további eredményeit a függelékben, a VI. ábrán mutatjuk be. Az UBC354 primer az Unikó fajta nőivarú egyedek mintázatából hiányzott (15. ábra), és melyet később a hímivarhoz kapcsolt fragmentumokhoz hasonlóan klónoztunk és szekvenáltunk.



14. ábra. Hímivar-specifikus markerek egyedi növénymintákban. Az SA fajta hím– (1-7) és nő– (8-12), valamint a KFF nő– (25-30) és hímegyedeinek (31-34) mintázata az OPD05 (A, D) és UBC354 (B, E) RAPD és SCAR₃₉₀ (C, F) szekvenciaspecifikus primerekkel. Az ivarspecifikus fragmentumokat a nyílak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.



15. ábra. Az Unikó fajta nő– (13-18) és hímivarú (19-23) egyedeinek mintázata az OPD05 (A) és UBC354 (B) RAPD, valamint a SCAR₃₉₀ (C) szekvenciaspecifikus primerekkel. Az ivarspecifikus fragmentumokat a nyílak jelzik. Az UBC354 primer (B) a nőivarú egyedekben is felszaporított egy ~170 bp nagyságú fragmentumot, amely a hímivarú egyedekből hiányzott. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

Kísérleteinkben egy egylaki fajta a Fibrimon is szerepelt, amelynek egyedeit szintén vizsgáltuk a hímivarhoz kapcsolt fragmentumokat eredményező OPD05 és UBC354 RAPD, valamint a kontrollként felhasznált SCAR₃₉₀ szekvenciaspecifikus primerekkel. Az egylaki fajta egyedeiben egyik hímivarhoz kapcsolt marker sem szaporodott fel (16. ábra).



16. ábra. Az egylaki Fibrimon minták OPD05, UBC354 RAPD és SCAR₃₉₀ szekvenciaspecifikus primerekkel kapott mintázatai. 15: nőivarú kétlaki minta az Unikó B fajtából, 20: hímivarú kétlaki minta az Unikó fajtából és 67-70: egylaki Fibrimon minták. A hímivar-specifikus fragmentumokat a nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

4.3.2. Az ivarhoz kapcsolt markerek klónozása

Az OPD05 és UBC354 RAPD primerekkel kapott reakciótermékeket alacsony olvadáspontú gélen futtattuk, majd az ivarhoz kapcsolt fragmentumokat a gélből izoláltuk. A ~950 (OPD05) és ~150 (UBC354) bp nagyságú fragmentumokon kívül az Unikó fajta nőivarú egyedeinek mintázatában megjelenő ~170 bp nagyságú fragmentumot is izoláltuk. Ezeket a fragmentumokat plazmid vektorba klónoztuk, majd a bakteriális transzformáció után a szelektált kolóniákat kolónia–PCR–rel ellenőriztük (17. ábra).



17. ábra. Az UBC354 primerrel indított reakciók eredményei különböző templát DNS mintákkal (Unikó fajta): az első 4 minta: hímivarú és nőivarú genomiális DNS, a középső 4 minta: az izolált fragmentumokból indított doppel-PCR reakció és az utolsó 4 minta: kolónia PCR.

A megfelelő inszerteket tartalmazó kolóniákból ezután plazmidot izoláltunk, amelyekből a digoxigenines vagy radioaktív jelöléshez az inszerteket EcoRI enzimmel vágtuk ki (18. ábra).



18. ábra. A ~950 (A), ~170 (B) és ~150 (C) bp inszerteket tartalmazó intakt (A₁, B₁ és C₁) és EcoRI enzimmel emésztett (A₂, B₂ és C₂) plazmidok. A kivágott fragmentumokat a nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

4.3.3. Southern analízis

RAPD termékek Southern analízise:

A plazmidokból kivágott inszerteket szekvenálás előtt Southern analízissel ellenőriztük. Az ivari polimorfizmust eredményező primerekkel RAPD reakciót indítottunk néhány hímés nőivarú egyed DNS-mintáival. A RAPD mintázatokat ezután membránra blottoltuk, majd ehhez hibridizáltattuk a digoxigeninnel jelölt inszerteket. A 19. ábrán látható, hogy a jelölt ~950 (OPD05) és ~150 (UBC354) bp nagyságú fragmentumok a RAPD mintázattal hibridizáltak. Ezzel a lépéssel bizonyítottuk, hogy a plazmidba a megfelelő inszerteket klónoztuk. A hibridizációs mintázaton az is látszik, hogy nemcsak a hímivarú egyedek mintázatában jelent meg a hibridizációs jel, hanem a nőivarú egyedekében is, de ezeknek az intenzitása sokkal kisebb volt.



19. ábra. Az Unikó kenderfajta hím- és nőivarú egyedeiből származó RAPD termékekkel (A: OPD05 és B: UBC354) végzett Southern analízis eredménye. A RAPD mintázat a képek bal, a hibridizációs mintázat pedig a képek jobb oldalán látható. A DIG-11-UTP-vel jelölt szekvenciák erős hibridizációs jelet adtak a hímivarú egyedek mintázatában és gyenge jelet a nőivarú egyedekében. Nyilak jelzik a jelölt fragmentumokkal kapott hibridizációs jeleket. Genomiális Southern analízis:

Genomiális Southern analízishez a DIG-11-UTP-vel történő jelölés kevésbé érzékenynek bizonyult, ezért a Southern analízishez radioaktív jelölést alkalmaztunk. Véletlenszerűen kiválasztott hím- és nőivarú egyedek DNS mintáit EcoRI, HindIII és DraI enzimekkel emésztettük. A ~950 bp nagyságú fragmentum nem eredményezett különbségeket a különböző ivarú egyedek hibridizációs mintázatában egyik enzimmel sem, viszont a ~150 bp nagyságú, radioaktívan jelölt fragmentummal eltéréseket kaptunk. Ennek eredményét mutatjuk be a 20. ábrán. Az EcoRI enzimmel, a hímivarú egyed mintázatában, a HindIII és DraI enzimekkel pedig a nőivarú egyed mintázatában jelent meg plusz hibridizációs jel.



20. ábra. Az Sa fajta véletlenszerűen kiválasztott hím- és nőivarú egyedének Southern mintázata a ~150 bp nagyságú, radioaktívan jelölt, hímivarhoz kapcsolt fragmentummal. A hibridizációs mintázatok közötti különbségeket a nyilak jelzik.

4.3.4. Szekvencia analízis

A klónozott hímivarhoz kapcsolt szekvenciákat a Szegedi Biológiai Központban szekvenáltattuk. A három szekvencia mérete a következő volt: 961 (OPD05), 151 (UBC354) és 172 (UBC354) bp. A kenderben eddig azonosított hímivarhoz kapcsolt szekvenciákat MADC1 (Sakamoto et al. 1995) és MADC2 (Mandolino et al. 1999) névvel illették, amely a "male-associated DNA sequence" rövidítésből származik. Ezt a terminológiát követve neveztük el az általunk azonosított két hímivarhoz kapcsolt szekvenciát: OPD05₉₆₁ = MADC3, UBC354₁₅₁ = MADC4. A szekvenciák bázissorrendje a 21. ábrán látható.

OPD05 ₉₆₁					
TGAGCGGACA	TCATTGCCTC	GGTGGAGGAT	CGGTATCAAA	AGTACCTCTT	TAGGAGGGAA
CAGGATTTAG	CCTACATCAA	GGCCCAAGTT	GCTGCTGAGA	GAACCCTTCG	GATAGAAGTG
CAGAAAGAAT	GGGCGCCCTC	TCGGCCTAAG	ATGCTTCTCT	CGGTCCCCAA	CACTGGGGCT
CTTGATGCCA	GCACATCCGG	ATCCGGTAAG	TTTCCCTTAA	TGGTCCATCA	TGTTCCTTCT
GCTCAAGATT	ATTCCCGGTG	TAGGCCTATA	GAATTTGACG	AACGTCTCCT	TAGATTTAGA
ATGCTCCCTA	AACGGTGGGG	TGATCATGCC	AAATGCTTTT	ATTTTTCCAA	CTTAGGTCAT
TTTCTAGGCC	GGTCCCGAAT	GGGGTCCGGA	CCTCATGAAC	CTATTCCTCT	ANATCATTCA
GCTTATCTGT	CTTCCAACTG	GTTTCTCCCC	TCAGACAGCT	TTCTTGGGGA	TGACAAAGCT
AGTATTATAG	TACAAGACTT	TGCTAGGGCT	GAATTAGATA	GTCATGGTAG	GACTAGTTTT
ACGGGCTATG	TTTTCGTGTG	CATATTCTCT	CGTGGTCACT	TNTGAGACTT	GATGATTTGT
TTGTCTTTNT	GAAGCAACTA	GGCCAATGGA	GGAGCTCTTG	GCGACTCTTG	CCCGGACCTA
TAGTCCAGAC	TCTGCTCTTC	CTNTGATGCC	TGATCAGATG	GTGACCCCAG	GGAGATCTTC
TTCTAGCATC	CCCTTAGGCC	GAATCGTCTT	AATTGACGAA	GACAGGGAGG	TCAAGGAGGA
AGACGAAGGC	AAGATCCTGG	GCCCCTTGGA	CCAAAAACGC	AAGGGAAAAA	TGGTGGAGGC
CAAGTCTTCT	AAAAGGCCTA	GGTGGATTGA	TACTCCGGCT	GCCAACTCTA	ACTCGGGGAT
TCAACCTGAA	GCAGAGGAAT	ACACTATTCC	TCTCGACATC	ATCCTTACAC	GTGTCCGCTC
А					
UBC354151					
CTAGAGGCCG	TGGACGCGGC	GGAGGACGAT	CAAACAACAA	CAAACCGATA	TGTCAGCTTT
GCAGCAGACC	TGGGCATATA	GCTTCAAAAT	GTTACCACCA	GTTTGACATC	TCATTTCAAG
CTCCAGGTTC	CAGTCAATTA	TCGGCCTCTA	G		
UBC354172					
CTAGAGGCCG	AGGATATCCA	GGATGCACAT	GTTGCCAGCA	GCTACTATCA	AAGTTTAAGG
TAATCTGGGG	AATACTGATC	CCCCTAGGTG	AAGATCTTCA	TAGCTCAGAG	ТТТСАТСАТА
GCATAAATTA	ТСТТАТСАСТ	ACTTCATCAG	AGTACTGCTA	TGCGGCCTCT	AG

21. ábra. Az OPD05₉₆₁, UBC354₁₅₁ és UBC354₁₇₂ szekvenciák bázissorrendje. A RAPD primerek kapcsolódási helyeit félkövér betűk jelölik, a tervezett SCAR primerek szekvenciái pedig árnyékolt háttérben láthatók.

A 3 szekvencia számítógépes analízise során kapott hatféle lehetséges leolvasási mód közül szekvenciánként hármat a 22. ábra szemléltet. Az OPD05₉₆₁ (MADC3) szekvenciában egy viszonylag nagyobb ~550 bp nagyságú és több kisebb nyílt leolvasási keret figyelhető meg. Az UBC354₁₅₁ (MADC4) és UBC354₁₇₂ szekvencia kevés stop kodont tartalmaz és ezekben az előző szekvenciához hasonlóan nagyobb nyílt leolvasási keretek lehetségesek, amelyekről fehérje íródhat át. A szekvenciák mindenesetre túl rövidek ahhoz, hogy ezek alapján messzemenőbb következtetéteseket vonjunk le.



22. ábra. A MADC3 (A: OPD05₉₆₁), MADC4 (B: UBC354₁₅₁) és C: UBC354₁₇₂ szekvenciák számítógépes analízisével kapott eredmények. A nyilak a start a vonalak pedig a stop kodonok helyeit jelzik.

Mindhárom szekvencia GC értéke kevesebb volt, mint 50 %, egymással összehasonlítva pedig kismértékű homológiát mutattak. Ennek mértéke az UBC354₁₅₁ (MADC3) és UBC354₁₇₂ szekvenciák között 51%, az UBC354₁₅₁ (MADC3) és UBC354₁₇₂, valamint az OPD05₉₆₁ (MADC4) szekvenciák között pedig 14 és 17 % volt.

A szekvenciák adatbanki összehasonlítása során nem kaptunk más adatbanki szekvenciákkal szignifikáns homológiát. A MADC3 és MADC4 szekvenciái a legnagyobb hasonlóságot (50-55 %) különböző növényi retrotranszpozon szekvenciákkal adták.

4.3.5. SCAR analízis

A hímivarhoz és a feltételezett nőivarhoz kapcsolt RAPD markerekre - a szekvenciaadatok birtokában - SCAR markereket terveztünk (6. táblázat, 21. ábra). A két hímivarhoz kapcsolt szekvenciára tervezett SCAR markereket (MADC4 - SCAR₁₁₉ és MADC3 - SCAR₃₂₃) a KFF fajta egyedi DNS mintáin teszteltük (23. ábra).



23. ábra. A MADC4 (A) és MADC3 (B) szekvenciákra tervezett SCAR primerekkel kapott mintázat a KFF fajta egyedi DNS mintáiban. Kontrollként a MADC2 szekvenciára tervezett SCAR₃₉₀ primerpárt (Mandolino et al. 1999) használtuk fel. A hímivarhoz kapcsolt szekvenciaspecifikus markereket a nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas).

Az UBC354₁₇₂ szekvenciára tervezett SCAR₁₄₅ primerpár kevésbé jól működött. A SCAR₁₄₅ primerpárt az UBC354-es RAPD primerrel, az Unikó fajta női egyedeiben felszaporított és klónozott szekvenciára terveztük és így természetesen azt vártuk, hogy ez a primerpár az Unikó fajta nőivarú egyedeiben fogja felszaporítani a kívánt 145 bp nagyságú fragmentumot. Ezzel szemben a 145 bp fragmentum csak néhány hímivarú egyed DNS mintáiban amplifikálódott (24. ábra). A SCAR₁₄₅ primerpárral további vizsgálatokat nem folytattunk.



24. ábra. A SCAR₁₄₅ primerrel kapott szekvenciaspecifikus PCR mintázat. A 145 bp nagyságú célszekvencia nem a nő-, hanem a hímivarú egyedekben szaporodott fel.

4.3.6. F₂ nemzedék SCAR analízise

A vizsgálataink során azonosított, hímivarhoz kapcsolt MADC3 és MADC4 szekvenciákra tervezett szekvenciaspecifikus markerekkel (SCAR₃₂₃ és SCAR₁₁₉), valamint a Mandolino et al. (1999) által leírt SCAR₃₉₀ markerrel hasadó nemzedéket teszteltünk. A Fleischmann \bigcirc x Fibrimon (egylaki \eth) keresztezésből származó 75 F₂ növényegyedről virágzás előtt levélmintákat gyűjtöttünk, melyekből DNS-t izoláltunk és elvégeztük a SCAR analízist (25. ábra). Virágzás idején ugyanezeknek a növényeknek az ivarát is meghatároztuk. A 75 F₂ növényegyedből 41 nőivarú, 32 hímivarú és 2 pedig egylaki volt (4. táblázat). A 75 egyed markeres vizsgálata mindössze 2 esetben tért el a fenotípusosan meghatározott ivartól (két hímivarú egyedbenben a markerek egyike sem jelent meg).



23. ábra. A MADC4 (A), MADC3 (B) és MADC2 (C) szekvenciákra tervezett SCAR primerekkel (SCAR₁₁₉, SCAR₃₂₃ és SCAR₃₉₀) kapott mintázat F2 nemzedékben. A hímivarhoz kapcsolt fragmentumokat nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas).

SCAR₁₄₅

4.4. Új tudományos eredmények

Az elvégzett vizsgálataim alapján a következő új tudományos eredményeket kaptam:

1. Hazai nyár klónok molekuláris elemzése

- 1.1. Hazánkban államilag elismert és ültetvényekben telepített 19 nyár (*Populus* sp.) klónt RAPD és AP-PCR alapján négy csoportba soroltunk és a molekuláris polimorfizmus klaszter és MDS analízisével megbecsültük a köztük levő genetikai távolságot.
- 1.2. Olyan primereket azonosítottunk, melyek a *P. euramericana* és *P. alba* fajok, illetve a *P. trichocarpa x P. deltoides*, valamint a *P. pyramidialis x P. berolinensis* hibridek klónjaira specifikus fragmentumokat adtak. Eredményeink lehetővé teszik a gyakorlatban a fajok és hibridek molekuláris azonosítását.

2. Hagyományos és DH búzafajták összehasonlító molekuláris elemzése

- 2.1. A RAPD, SSR, STS és AFLP analízissel bizonyítottuk, hogy a hagyományos nemesítéssel, illetve DH módszerrel előállított fajták között nincs szignifikáns különbség a molekuláris polimorfizmus mértékében. Ebből arra következtettünk, hogy a hagyományos és DH fajták genetikai homogenitásának mértéke közel azonosnak tekinthető.
- 2.2. Az AFLP és SSR vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy az agronómiai, teljesítmény, alkalmazkodóképesség és citológiai eredmények alapján homogén fajták és DH utódvonalak egyedei között molekuláris különbségek kimutathatóak, de ezek mértékében a csoportok között szignifikáns differencia nincs.
 - A 2.1. és 2.2. közölt eredményeink alapján feltételezhető, hogy a hagyományos és DH fajták teljesítményében és alkalmazkodóképességében azért nincs érdemi különbség, mert az izoláltan felszaporított és fenntartott hagyományos fajták legalább annyira homozigótáknak tekinthetők, mint az egyszeres vagy kétszeres DH populációk.
- 2.3. Bizonyítottuk, hogy a nagy hasonlóságot mutató DH vonalak és egyedeik molekuláris összehasonlító vizsgálatára elsősorban az AFLP és kisebb mértékben az SSR módszer alkalmas.

3. Ivarspecifikus molekuláris markerek azonosítása és vizsgálata kenderben

- 3.1. RAPD módszerrel két hímivarhoz szorosan kapcsolt nemzetközileg is új fragmentumot (OPD05₉₆₁ és UBC354₁₅₁) azonosítottunk különböző kétlaki kender fajtákban. Bizonyítottuk, hogy ezek a markerek az egylaki kenderben (Fibrimon fajtában) nem mutathatók ki.
- 3.2. A két új markert klónoztuk és szekvenáltuk. A szekvenciáknak az eddig alkalmazott terminológia alapján a MADC3 (OPD05₉₆₁) és MADC4 (UBC354₁₅₁) nevet adtuk. A két új szekvencia 50-55 %-os homológiát mutatott különböző növényi eredetű retrotranszpozon-szerű szekvenciákkal
- 3.3. A két új markerre szekvenciaspecifikus primereket terveztünk (SCAR₃₂₃ és SCAR₁₁₉) és bizonyítottuk, hogy ezek hatékonyan alkalmazhatók a kender növények ivarának meghatározására a tenyészidőtől függetlenül.
- 3.4. Hasadó F₂ populáció molekuláris vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a kontrollként felhasznált SCAR₃₉₀ (Mandolino et al. 1999) és az általunk izolált két hímivarhoz kapcsolt szekvenciaspecifikus marker (SCAR₃₂₃ és SCAR₁₁₉) szorosan kapcsoltak egymással és az ivarral. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a MADC3 és MADC4 szekvenciák a kender Y kromoszómáján találhatók.

5. MEGVITATÁS

5.1. Nyár genotípusok RAPD és AP-PCR analízise

5.1.1. A nyár genotípusok közötti genetikai távolságok becslése a RAPD és AP-PCR fragmentumok alapján

A DNS-ujjlenyomatot (fragmentum-mintázatot) eredményező módszerek lehetővé teszik a populációk közötti és populációkon belüli variabilitás mértékének becslését. A kiértékelés hasonlósági koefficiens alapján történik, azaz a vizsgált populáción belül páronkénti összehasonlításokra kerül sor (Lynch 1990). RAPD mintázatok kiértékelésénél elsősorban a Jaccard index javasolt, mert a RAPD módszer domináns markereket eredményez és ez az index nagyobb mértékben veszi figyelembe a polimorf fragmentumokat, mint más hasonlósági koefficiensek (Link et al. 1995). Az SM egyezési koefficiens a Jaccard indextől abban tér el, hogy az SM koefficiens a páronkénti összehasonlítások során azokat a fragmentumokat is figyelembe veszi, amelyek mindkét genotípusból vagy populációból hiányoznak (Stiles et al. 1993). A hasonlósági értékek legtöbbször normális eloszlást követnek (Lynch 1990). Megbízható következtetések levonásához Lynch (1990) 30-40, Nei (1978) pedig legkevesebb 50 marker kiértékelését javasolja.

Vizsgálatainkban 19 Magyarországon államilag elismert nyár genotípus (klón, 2. táblázat) vizsgálatát végeztük el - 40 mintázatot eredményező - primerrel (36 RAPD és 4 AP-PCR) (6. táblázat). A primerek közül 5 monomorf, 35 pedig polimorf mintázatot eredményezett. A fragmentumok száma primerenként 1 és 16, a méretük ~250 és ~2500 bp között volt. A polimorfizmust eredményező primerek közül 18 mintázatát értékeltük. A 18 értékelhető 162 jól fragmentumot primer összesen eredményezett, amely 9 fragmentum/primernek felelt meg. A fragmentumok megléte és hiánya alapján bináris mátrixot készítettünk és az adatokat számítógépen a SYN-TAX (Podani 1993) és az SPSS 0.8 programokkal értékeltük. A hasonlósági koefficiensek meghatározására a Jaccard indexet használtuk. A hasonlósági értékek 0,350 és 0,832 között voltak. A RAPD és AP-PCR fragmentumok alapján a 19 nyár genotípus közül a VIF klón mutatta a legkisebb hasonlóságot (0,350-0,460) a többi nyár klónnal. Ezzel szemben a legnagyobb hasonlóságot (0,832) az I15 és a TRI klónok között kaptuk. Castiglione et al. (1993) három Populus szekcióba (Aigeiros, Tacamahaca és Leuce) tartozó 10 fajt (32 klónt) vizsgált RAPD és AP-

PCR módszerekkel. A 32 genotípus közül 5 (TRI, I15, I45, I21 és VIF) a mi vizsgálatainkban is szerepelt. Az eredményeinkhez hasonlóan Castiglione et al. (1993) is nagy hasonlóságot talált az I15 és TRI klónok között. Ez a nagyfokú hasonlóság valószínűleg az I15 és a TRI klónok közötti közeli rokoni kapcsolatnak köszönhető, a triploid TRI klón előállításánál ugyanis az I15 klónt használták fel pollen donorként, a másik szülő vonal pedig a tetraploid 438p klón volt, amelyet I15 klón eredetű apikális merisztéma kolhicines kezelésével állítottak elő (Vivani és Sekawin 1953). Castiglione et al. (1993) vizsgálataiban ugyancsak a VIF nyár klón mutatta a legnagyobb genetikai távolságot.

A Jaccard index és a SM koefficiens alapján megrajzolt dendrogramokon (3. ábra) 4 fő csoportot lehet megkülönböztetni, amelyek a következő nyár klónokat tartalmazták: 1) VIF (*P. alba*); 2) UNA (*P. trichocarpa x P. deltoides*) és RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*); 3) KOR (*P. pyramidialis x P. berolinensis*); 4) a többi klón (*P. euramericana*). A 4 fő csoportba valójában az azonos fajhoz vagy hibridhez tartozó nyár klónok tartoztak. A 4. csoporton belül további alcsoportokat lehetett megkülönböztetni. Egy-egy alcsoportba tartoztak pl. a ROB, SUD, PAN, I21, H32, BL, I45 és AGA, az I15, TRI és I27, valamint a KOP és KOL klónok. A BDA és PAR genotípusok különálltak és a 4. csoporton belül egy alcsoporthoz sem tartoztak. A kétféle hasonlósági koefficiens alapján elkészített dendrogramokon a klónok ugyanazokba a klaszterekbe és alcsoportokba kerültek. Különbségek elsősorban a mért genetikai távolságok értékeiben mutatkoztak.

A dendrogramokon kívül, a klónok közötti genetikai távolság jobb szemléltetése céljából a bináris adattáblázat alapján MDS analízist végeztünk (algoritmus értékek: max. iteráció – 30; konvergencia kritériuma –00100; min. S–stressz –00500). A kétdimenziós (n = 2) MDS rajzon (4. ábra) az összes klón egymáshoz viszonyított genetikai távolsága jobban becsülhető, mint a dendrogramon, amelyben a klónok egy síkban helyezkednek el.

Kísérleteink bizonyítják, hogy a RAPD és AP-PCR módszerek sikeresen alkalmazhatók *Populus* klónok közötti genetikai távolságok meghatározására, összhangban a nemzetközi eredményekkel.

5.1.2 Faj- és hibrid specifikus mintázatok

A 35 polimorfizmust adó primerből 19 faj- vagy hibrid-specifikus mintázatot

eredményezett. Az OPX18 primerrel egy a *P. euramericana* klónokra specifikus fragmentumot (~550 bp) sikerült felszaporítanunk (5. ábra). 10 primer eredményezett olyan fragmentumot (fragmentumokat), amelyek csak a VIF (*P. alba*) klónban voltak jelen (5. ábra). Az UNA és RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*), valamint KOR (*P. pyramidialis x P. deltoides*) klónokra specifikus fragmentumot 4-4 primer adott. Lin et al. (1997) 55 nyár klón (8 nyárfaj és hibrid) RAPD és AP-PCR analízisével hasonló eredményeket kapott. A vizsgált 17 primer közül 4 tette lehetővé a különböző fajok és hibridek megkülönböztetését. Más kutatócsoportok (Castiglione et al. 1993, Lin et al. 1997) és saját eredményeink is bizonyítják, hogy a RAPD és AP-PCR módszerek hatékonyan alkalmazhatók a *Populus* nemzetségbe tartozó klónok megkülönböztetésére, ill. hogy az említett módszerekkel faj, hibrid vagy klón-specifikus markerek azonosíthatók. Az említett módszerektől az AFLP technika több marker azonosítását teszi lehetővé, de az utóbbi módszer nagyobb technikai felszereltséget és anyagi ráfordítást igényel. A nyár klónok elkülönítésében talán a lókuszspecifikus és multialléles SSR primerek lehetnek a leghatékonyabbak. Egyelőre azonban még csak kevés ilyen marker áll rendelkezésre (Dayanandan et al. 1998).

A vizsgált 19 nyár klón közül a 2. táblázatban szereplő első 10 klón hím-, az utolsó 9 pedig nőivarú volt. Vizsgálataink egyik célja ivarhoz kapcsolt markerek azonosítása volt. A tesztelt 40 primer közül egyik sem eredményezett ilyen markert. Ivari markerek azonosításához további RAPD és AP-PCR, vagy pedig nagyobb hatékonyságú AFLP vizsgálatok elvégzésére lenne szükség.

5.2. Búzafajták és dihaploid származékaik homogenitásának vizsgálata molekuláris módszerekkel

5.2.1. A különböző markerezési technikák alkalmasságának értékelése a fajtákon vagy DH vonalakon belüli különbségek kimutatásában

Kísérleteinkben a GK Góbé (hagyományos nemesítéssel előállított fajta), GK Délibáb (androgenetikus eredetű fajta) fajtákat, és a belőlük előállított DH vonalakat (egyszeres és kétszeres DH vonalak) hasonlítottuk össze PCR-alapú módszerekkel. A vizsgálatokhoz 4 x 18 véletlenszerűen kiválasztott egyedből izoláltunk nagy molekulatömegű DNS -t.

RAPD: A tesztelt 30 RAPD primerből (6. táblázat) 6, azaz a primerek 20 %-a (OPAB09, NO11, OPH11, OPA16, OPQ14 és OPX11) tette lehetővé a két fajta (GK Góbé és GK Délibáb) megkülönböztetését. Egyedi különbségeket GK Góbé és GK Délibáb fajták, valamint a belőlük előállított DH utódvonalakban nem kaptunk. Ezek az eredmények, más nemzetközi tapasztalatokhoz hasonlóan, alátámasztják azt a megállapítást, hogy a RAPD markerek kevésbé alkalmasak a búza genom vizsgálatára. Shah et al. (2000) Cheyenne és Wichita búzafajtákat hasonlított össze 40 RAPD primerrel és ezek közül 8 (20 %) eredményezett a két fajta elkülönítésére alkalmas polimorf fragmentumot. A RAPD módszer búzavizsgálatokban az RFLP-hez hasonlóan alacsony szintű polimorfizmust ad, amelynek oka a búza genom nagysága (komplexitása), valamint a gyenge reprodukálhatóság (Gupta et al. 1999).

SSR és STS: A két búzafajtát 12 SSR és STS primerrel (12. táblázat) hasonlítottuk össze. A primerek közül 2 többlókuszos (a WMS55: 3 és a WMS410: 2) 10 pedig egylókuszos volt. Az tesztelt SSR és STS primerek így összesen 15 lókuszt reprezentáltak a búzagenomban. A primerek közül 4 monomorf (WMS5, WMS261, P1/P2, és DX51/52) 8 pedig polimorf (WMS3, WMS55, WMS174, WMS410, GlyF1/R1, GlyF2/R1, P3/P4 és WMS186) alléleket eredményezett a két fajta összehasonlítása során. A különbséget adó SSR primerek közül egyedi polimorfízmust csak a WMS186 primerrel kaptunk a GK Délibáb (DH módszerrel előállított búzafajta) csoporton belül (11. ábra). A 10 egyedi minta közül négyben ~130, egyben ~100 és ötben pedig a ~130 és ~100 bp nagyságú fragmentum is felszaporodott. A mikroszatellita markerek a RAPD vagy RFLP markerekhez viszonyítva jó polimorfízmust adnak. Fajták összehasonlítása során nagy PIC (polymorphism information content) értéket mutatnak (Plaschke et al. 1995). Ezzel ellentétben az SSR markerek kevésbé használhatóak intraspecifikus összehasonlító vizsgálatokban (Gupta et al. 1999).

AFLP: A nyolc AFLP primer kombinációból 7 eredményezett polimorfizmust. Egy-egy AFLP primerkombináció 100-150 fragmentumot adott, amelyekből primerkombinációnként 4-20 volt polimorf. A 81 polimorf fragmentum közül 47 a két alapfajta és a belőlük származó DH utódvonalak megkülönböztetését tette lehetővé, 23 pedig az egyes csoportokon belül egyedi különbségeket mutatott. Az AFLP markerek közül 9 alkalmas volt

a Góbé fajta, valamint a belőle származó DH csoport elkülönítésére is. Ilyen különbségeket a GK Délibáb és DH utódvonalai között nem tudtunk kimutatni.

Vizsgálataink eredményei alapján, a felhasznált markerezési technikák közül fajták közötti különbségek kimutatására a RAPD, SSR, STS és AFLP technikák is alkalmasnak bizonyultak. A legtöbb polimorf fragmentumot azonban az SSR és AFLP módszerekkel kaptuk. Ezek az eredmények megegyeznek, a már említett nemzetközi tapasztalatokkal. Fajtán belül és a még nagyobb homogenitást mutató DH utódvonalak populációiban a RAPD és STS módszerekkel különbségeket nem tudtunk detektálni. A tesztelt SSR primerekkel egy, AFLP primerkombinációnként pedig átlagosan 2,9 (23/8) polimorf fragmentumot kaptunk. Nagy hasonlóságot mutató egyedek közötti különbségek kimutatására, ezért elsősorban az AFLP módszert, kisebb mértékben pedig az SSR technikát tartjuk alkalmasnak.

5.2.2. A különböző csoportok homogenitásának megítélése a molekuláris markerek alapján

A RAPD, SSR, STS és AFLP módszerek közül a tesztelt populációk homogenitására utaló egyedi különbségeket csak az AFLP és SSR technikákkal találtunk. Az AFLP módszerrel kapott csoportokon belüli különbségek száma a következő volt: GK Góbé (hagyományos fajta): 4, GK Góbé DH vonalai (egyszeres DH vonalak): 11, GK Délibáb (egyszeres DH vonal): 12 és GK Délibáb DH vonalai (kétszeres DH vonalak): 3. Ahogyan az a felsorolásból kitűnik a GK Délibáb egyedei között találtuk a legtöbb különbséget (12 fragmentum). A polimorfizmust eredményező WMS186 SSR primerrel is csak ezen a csoporton belül találtunk egyedi eltéréseket. Tíz búzaegyed közül négyben ~130, egyben ~100 és ötben pedig a ~130 és ~100 bp nagyságú fragmentum is felszaporodott. A GK Délibáb fajtát a Mini Manó, Mv12, Jubilejnaja 50, Sadovo Super búzafajták keresztezésével kapott F2 nemzedék haploid indukciójával állítottak elő 1985-ben (Pauk et al. 1995). Az ebben a csoportban kapott nagyobb számú különbség adódhat a hosszú éveken keresztül folytatott fajtafenntartásból, amely a fajta molekuláris homogenitásának csökkenésében mutatkozott. Ugyancsak nagyszámú különbséget kaptunk a Góbé fajtából előállított DH utódvonalak (egyszeres DH vonalak) csoportjában (11 fragmentum). Legnagyobb fokú homogenitást a GK Délibáb fajtából előállított DH utódvonalakban (kétszeres DH vonalak) kaptuk, ezek között mindössze 3 fragmentumban mutatkozott különbség. A hagyományos

nemesítéssel kapott GK Góbé fajta a molekuláris különbségek alapján (4 fragmentum) szintén homogénnek mondható.

A DH vonalak és fajták, valamint a hagyományos módszerekkel előállított fajták a már több éve folytatott szántóföldi kisparcellás kísérletekben hasonló teljesítményűnek és alkalmazkodó képességűnek bizonyultak (Kertész et al. 1998). Szignifikáns különbségeket citológiai vizsgálatokkal sem sikerült kimutatni (Mázikné Tőkei et al. 1999). Ezzel ellentétben molekuláris különbségeket tapasztaltunk a fajták és a belőlük előállított DH vonalak között és a DH vonalakon belül is. A DH vonalak közötti különbségek elsősorban a portokban végbemenő meiotikus rekombináció következményei. Ezek feltehetően olyan különbségek a genomon belül, amelyek fenotípus szintjén nem, vagy csak ritkán manifesztálódnak.

5.3. Ivarhoz kapcsolt RAPD markerek azonosítása és vizsgálata egy- és kétlaki kenderben

5.3.1. RAPD analízis

RAPD vizsgálathoz az ivar-meghatározás után 1 egylaki és 5 kétlaki kenderfajta 4-7 egyedéről gyűjtöttünk be levélmintákat. DNS-izolálást követően a fajtákon belül fenotípus alapján kialakított nő és hímivarú csoportosított mintákat 21 RAPD primerrel teszteltük (6. táblázat), amelyekből kettő, az OPD05 és UBC354 egy ~950 és egy ~150 bp nagyságú hímivarhoz kapcsolt fragmentumot eredményezett (13. ábra). Az ivari polimorfizmust adó primereket ezután 25 nő és 27 hímivarú kétlaki, valamint 4 egylaki növény egyedi DNS mintáin teszteltük. Az OPD05 és UBC354 primerrel kapott ivarhoz kapcsolt fragmentumok minden hímivarú egyed RAPD mintázatában megjelentek, a nőivarú és egylaki növényekkel kapott mintázatokból pedig minden esetben hiányoztak (14. ábra). Az UBC354 primer az Unikó fajta nőivarú egyedeiben egy 170 bp körüli plusz fragmentumot is felszaporított (14. ábra), amelyről azt feltételeztük, hogy esetleg nőivarhoz kapcsolt marker lehet.

A kender (*C. sativa* L., 2n = 20) ivari kromoszómákkal rendelkező növényfaj (Yamada 1943). Sakamoto et al. (1998) áramlásos citométeres mérésekkel 47 Mbp különbséget mutatott ki a nő- és hímivarú kender genommérete között. Ez a különbség a teljes genom 2,8 %-át teszi ki. A nagy méretbeli különbséget Sakamoto et al. (1998) az Y kromoszóma

méretével magyarázta, amely a kender kromoszómái közül a legnagyobb. A kenderhez hasonlóan a mécsvirágban (Silene latifolia, 2n =24) szintén nagy az ivari kromoszómák közötti különbség. A mécsvirág Y kromoszómája 40-50 %-kal nagyobb az X kromoszómánál és a diploid genom 9 %-át teszi ki (Scutt et al. 1997, Matsunaga et al. 1994, Ciupercescu et al. 1990). A különbséget figyelembe véve és feltételezve, hogy a RAPD primerek a genomiális DNS-hez véletlenszerűen kapcsolódnak, Zhang et al. (1997) szerint, a RAPD fragmentumok 10 %-ka kellene, hogy Y kromoszómához kapcsolt legyen. Ezzel ellentétben, vizsgálataikban 44 primerrel kapott 220 RAPD fragmentumból 12, azaz a fragmentumok 5 %-a volt ivarhoz kapcsolt. Az ivari kromoszóma méret/genomméret arány alapján várt és a kísérlet során kapott ivarhoz kapcsolt markerek száma közötti különbséget Zhang et al. (1997) a primerek nem véletlenszerű kapcsolódásával, az X és Y kromoszóma közötti homológiával magyarázta. A kevesebb marker oka lehet az is, hogy az Y kromoszóma repetitív szekvenciákban gazdag. A mécsvirágtól eltérően más kétlaki növényekben sokkal kisebb hatékonysággal sikerült ivarhoz kapcsolt markereket azonosítani. Yiang és Sink (1997) 760 RAPD primert tesztelt Asparagus nő- és hímivarú pool-okat és csak két ivarhoz kapcsolt fragmentumot azonosított. Hormaza et al. (1994) 700 RAPD primerrel csak egy ilyen markert talált pisztáciában.

Vizsgálataink célja ivarhoz kapcsolt RAPD markerek azonosítása volt kétlaki és egylaki kenderben. A mécsvirághoz hasonló számítások alapján kenderben elméletileg a RAPD fragmentumok 2,8 %-ka kellene, hogy ivarhoz kapcsolt legyen, ha a genomon belül véletlenszerű és egyenletes primer kapcsolódást feltételezünk. A tesztelt 21 primerből 2 eredményezett hímivarhoz kapcsolt fragmentumot. A primerek összesen 160 fragmentumot adtak, tehát a fragmentumok 1,25 %-a bizonyult ivarhoz kapcsoltnak. Ez az érték valamivel kevesebb, mint az elméletileg várható kapcsolt markerek számának fele, mindenesetre megegyezik a mécsvirágban tapasztalt arányokkal (Zhang et al. 1998). Ha a primerek számát nézzük, akkor a primerek <10 %-a adott ivari polimorfizmust. Kenderben más kutatócsoportok is hasonlóan nagy hatásfokkal azonosítottak ivari markereket. Sakamoto et al. (1995) vizsgálataiban 15 primerből 2, Mandolino et al. (1998) kísérleteiben pedig 179 primerből 11 adott ilyen markert. Az, hogy mindössze 21 primer tesztelésével 2 ivarhoz kapcsolt fragmentumot is találtunk, talán annak is köszönhető, hogy vizsgálatainkat olyan

RAPD primerekkel végeztük, amelyek már más növényekben ivari polimorfizmust eredményeztek.

A RAPD primerek más fajokba történő alkalmazásáról, eddig még nem számoltak be más tudományos eredményekben. Ennek oka valószínűleg a módszer jellegéből adódik és ez elméletileg csak akkor lehetséges, ha a különböző szervezetekben található szekvenciák kellő mértékű homológiát mutatnak. Ettől eltekintve, kézenfekvőnek tűnt, hogy a kapcsolt markerek azonosítására olyan oligonukleotid szekvenciákat használjunk fel primerként, amelyekkel esetleg nagyobb hatékonysággal lehet ivari markereket azonosítani. A tesztelt 21 primer közül a mécsvirágban (Zhang et al. 1998) hímivarhoz kapcsolt fragmentumot eredményező OPD05 primer, a hímivarú kender elkülönítésében is sikeresnek bizonyult. Az OPD05 primer Mandolino et al. (1998) kender kísérleteiben is hímivarhoz kapcsolt fragmentumot adott, amelynek méretét ~900 bp -ban határozták meg. Vizsgálatainkban, az ezzel a primerrel azonosított hímivarhoz kapcsolt band méretét a bázissorrend alapján pontosan meghatároztuk. Feltehetően az ő és a mi esetünkben is ugyanarról a szekvenciáról van szó, de az említett kutatócsoport ezzel a primerrel kapcsolatban további eredményekről nem számolt be. Az UBC354 primerrel Alstrom-Rapaport et al. (1998) Salix viminalis-ban nőivarhoz kapcsolt fragmentumot azonosított, de ennek a szekvenciának a bázissorrendje sem ismert, így összehasonlítani sem tudjuk azzal a szekvenciával, amelyet mi kenderben az UBC354 primerrel azonosítottunk.

Az OPD05 primer egy ~950, az UBC354 primer pedig egy ~150 bp nagyságú fragmentumot amplifikált a hímivarú egyedek és a belőlük kialakított csoportok RAPD mintázataiban. A nőivarú és egylaki kender csoportosított DNS mintákból és egyedekből ezek a fragmentumok minden esetben hiányoztak. Sakamoto et al. (1995) CBDA kender törzs hímivarú egyedeinek RAPD vizsgálatával az No8 primerrel 500, az No11 primerrel pedig 730 bp nagyságú hímivarhoz kapcsolt fragmentumokat azonosított, amelyek minden hím egyed RAPD mintázatában megjelentek, a nőivarúakéból pedig hiányoztak. Mandolino et al. (1988) 179 primerrel 11 hímivarhoz kapcsolt RAPD fragmentumot kapott, amelyek a vizsgálatainkhoz hasonlóan egy esetben sem jelentek meg a nőivarú és egylaki egyedek mintázataiban.

A tesztelt primereink között szerepelt az No8 és az No11 primer is, amelyekkel mi többszöri próbálkozással sem tudtuk felszaporítani az 500 és 730 bp fragmentumokat. Ennek oka feltehetően az, hogy Sakamoto et al. (1995) csak egy kender genotípus (CBDA) különböző ivarú egyedeit tesztelte és elképzelhető, hogy az általuk azonosított ivarhoz kapcsolt fragmentumok csak a kérdéses törzs hím egyedeiben szaporodnak fel. Polley et al. (1997) Hellertauer Magnum (\mathcal{Q}) és 75/13/40 (\mathcal{J}) komlóvonalak keresztezéséből származó utódok analízisekor (Bulk Segregant Analysis) 1000 primerrel 32 hímivarhoz kapcsolt fragmentumot kapott, amelyek közül mindössze 3 volt alkalmas a hímivarú egyedek elkülönítésére más genotípusokban is. Kenderben a RAPD módszeren kívül az utóbbi években AFLP-vel is sikerült ivarhoz kapcsolt markereket azonosítani. Flachowsky et al. (2000) 39 AFLP primerkombinációt (HindIII/MseI) tesztelt két kender genotípus egyedein és összesen 12 olyan fragmentumot kapott, amelyek mindkét változat hím egyedeiben jelen voltak. Az AFLP fragmentumok egyike sem volt nőivarhoz kapcsolt.

5.3.2. Szekvencia-analízis és Southern vizsgálatok

Az OPD05 és UBC354 primerekkel hímivarhoz kapcsolt RAPD fragmentumokat (~950 bp, ~150 bp) és az UBC354 primerrel az Unikó fajtában nőivarú egyedeinek mintázatában megjelenő ~170 bp nagyságú fragmentumot gélből történő izolálás után klónoztuk, majd szekvenáltuk és Southern hibridizációban vizsgáltuk. A fragmentumokat digoxigenines jelölés után PCR mintázathoz hibridizáltattuk, hogy eldöntsük vajon a megfelelő fragmentumot klónoztuk-e. Mindhárom szekvencia erős hibridizációs jelet adott a megfelelő hím- vagy nőivarhoz kapcsolt RAPD fragmentum magasságában, de ezzel egyidejűleg gyenge jel mutatkozott az ellenkező ivarú egyedek mintázatában is (19. ábra). Ebből arra lehet következtetni, hogy az ivarhoz kapcsolt primerek a másik nemű egyedek DNS mintáiban is felszaporítanak egy azonos nagyságú fragmentumot, amely azonban olyan kis kópiaszámban van jelen a RAPD mintázatban, hogy etidium bromidos festéssel nem lehet detektálni. Később ezt a feltételezést a SCAR markerekkel végzett vizsgálatok is alátámasztották. A szekvenciák pontos bázissorrendjének meghatározásával (21. ábra) a következő méretű fragmentumokat kaptuk: OPD05–961, UBC354–151 és UBC354–172 bp.

A kenderben eddig azonosított hímivarhoz kapcsolt szekvenciákat MADC1 (Sakamoto et al. 1995) és MADC2 (Mandolino et al. 1999) névvel illették, amely a "male-associated DNA sequence" rövidítésből származik. Ezt a terminológiát alkalmazva neveztük el mi is a két hímivarhoz kapcsolt szekvenciát: OPD05₉₆₁=MADC3, UBC354₁₅₁=MADC4. A
szekvenciák adatbanki összehasonlításakor szignifikáns homológiát egy esetben sem találtunk más nukleinsav szekvenciákkal. A legnagyobb mértékű hasonlóságot (50-55 %) különböző növényekből származó retrotranszpozonok mutattak. Ez az eredmény megegyezik az eddig más kutatócsoportok által izolált ivarhoz kapcsolt fragmentumok szekvencia-analíziseinek eredményeivel. Kenderben az OPA08 primerrel izolált MADC2 szekvencia (Mandolino et al. 1999) ugyancsak 50-60 %-os homológiát mutatott retrotranszpozon-szerű szekvenciákkal. А bázissorend birtokában számítógépes szekvencianalízist végeztünk. Mindhárom szekvencia a 6 féle leolvasási keret szerint tartalmazhat kisebb-nagyobb nyílt leolvasási kereteket, amelyekről esetleg értelmes fehérjeszintézis lehetséges (22. ábra). A MADC4 fragmentum az egyik leolvasási keret szerint 1 stop kodont tartalmaz, de maga a szekvencia rövid. A MADC3 szekvencia több 500-600 bp nagyságú nyitott leolvasási keretet tartalmazhat.

A MADC3 és MADC4 szekvenciákkal genomiális Southern analízist végeztünk. Véletlenszerűen kiválasztott hím és nőivarú egyedek össz DNS mintáit három féle restrikciós enzimmel emésztettük, majd gélelektroforézis és blottolás után a radioaktivan jelölt MADC3 és MADC4 szekvenciákkal hibridizáltattuk. A MADC3 szekvencia több helyen hibridizált a membránra felvitt emésztett genomiális DNS mintázattal – feltehetően közepes kópiaszámban ismétlődő szekvenciáról lehet szó – és nem mutatott különbséget a két ivar között. A MADC4 ezzel ellentétben csak kevés helyen hibridizált és mindhárom enzimmel különbségeket kaptunk a hím- és nőivarú egyedek Southern mintázatában (20. ábra). Genomiális Southern analízissel eddig még csak spárgában (Reamon-Büttner et al. 1998) és papayában (Parasnis et al. 2000) mutattak ki különbséget a két ivar között. Kenderben Mandolino et al. (1998) nem, Sakamoto et al. (1995) (MADC1) pedig csak intenzitásbeli különbséget mutatott ki Souhern analízissel a két ivar között. Ahhoz, hogy teljes biztonsággal megbizonyosodjunk arról, hogy tényleg különbség van a két ivar hibridizációs mintázatában, több egyed vizsgálata szükséges.

5.3.3. SCAR markerek, F₂ vizsgálat

A MADC3, MADC4 és UBC354₁₄₅ szekvenciák bázissorrendjeik alapján SCAR primereket terveztünk, amelyek megbízhatóbb detektálást tesznek lehetővé (Paran és Michelmore 1993). Ennek oka, hogy a RAPD dekamernél hosszabb szekvencia-specifikus

SCAR primerekkel szigorúbb reakciókörülmények választhatók. Kísérleteinkben az OPD05 és UBC354 primerek is ismételhető reakciókat eredményeztek, de a komplikált mintázatot eredményező RAPD módszertől a SCAR markerek egyszerűbb és gyorsabb kiértékelést tesznek lehetővé. A SCAR₃₂₃ és SCAR₁₁₉ primerekkel a KFF fajta egyedi DNS mintáit teszteltük és a várakozásnak megfelelően hatékonynak bizonyultak a nő és hímivarú egyedek elkülönítésében. A hímivarú egyedekben a SCAR₃₂₃ primerpárral 323, a SCAR₁₁₉ primerpárral pedig 119 bp nagyságú fragmentum amplifikálódott. A nőivarú egyedek PCR mintázataiban is megjelentek ezek a sávok, azonban jóval kisebb volt az intenzitásuk. Ez összhangban volt a RAPD mintázatokkal végzett Southern analízissel, a MADC3 és MADC4 próbák ugyanis a nőivarú egyedekben is gyenge hibridizációs jelet adtak a hímivarhoz kapcsolt fragmentumok magasságában. A SCAR primerpárokkal mindkét ivar mintázatában megjelent még egy 100 bp-nál kisebb fragmentum is, amely feltehetően primer-dimer termék. A RAPD analízis alapján az UBC354₁₄₅ SCAR primerrel egy 145 bp nagyságú fragmentumot vártunk az Unikó fajta nőivarú egyedeinek PCR mintázatában. Ezzel ellentétben a 145 bp nagyságú band a nőivarú egyedekben nem amplifikálódott, viszont néhány hímivarú egyedben megjelent (24. ábra). További vizsgálatokat ezzel a szekvenciával nem folytattunk.

Ivar-specifikus SCAR markereket eddig több kétlaki növényfajban fejlesztettek ki (1. táblázat). Kenderben eddig csak a MADC2 hímivarhoz kapcsolt szekvenciára specifikus SCAR₃₉₀ marker (Mandolino et al. 1999) állt rendelkezésre. Kisérleteinkben 2 új ivar-specifikus SCAR markert terveztünk, amelyek az ivar gyors meghatározásában hatékonynak bizonyultak. Parasnis et al. (2000) papayában egy még nagyobb biztonságot adó PCR módszert dolgozott ki az ivar detektálására. A PCR reakcióban a hímivar-specifikus SCAR markerek mellett, ivarra neutrális primerpárt alkalmazott, amelynek terméke mindkét ivar PCR mintázatában megjelent. Ezzel kizárhatóvá vált az a hibalehetőség, hogy a DNS templát nem megfelelő minősége miatt nem képződött ivar-specifikus fragmentum a hímivarú egyedekben.

A SCAR₁₁₉ és SCAR₃₂₃ primerekkel később a Fleischmann (kétlaki \mathcal{Q}) x Fibrimon (egylaki) keresztezésből kapott F₁-ből pánmiktikus úton előállított F₂ nemzedékének 75 egyedét teszteltük. A fenotípus alapján meghatározott ivararány a következő volt: 41 \mathcal{Q} , 32 \mathcal{O} és 2 egylaki, - ami megegyezik az ilyen keresztezéssel kapható elméleti ivararánnyal: 4555 % \bigcirc , 35-45 % \bigcirc és néhány % egylaki (Bócsa, szóbeli közlés). A fenotípus és a három SCAR marker között 2 esetben találtunk eltérést.

A RAPD és SCAR vizsgálataink során minden esetben kontrollként a hímivarhoz szorosan kapcsolt SCAR₃₉₀ primerpárt használtuk, amelyet Mandolino et al. (1999) a MADC2 ivari szekvenciára tervezett. Kísérleteinkben, egy esetben sem kaptunk rekombinációt a MADC2, MADC3 és MADC4 szekvenciák között sem a RAPD (OPD05₉₆₁ és UBC354₁₅₁) sem a SCAR (SCAR₁₁₉, SCAR₃₂₃ és SCAR₃₉₀) primerekkel. Ebből arra lehet következtetni, hogy ezek a szekvenciák a genomon belül egymáshoz szorosan kapcsoltan helyezkednek el, vagy pedig olyan kromoszómarész tagjait képezik, amely nem rekombinálódik.

A 75 F_2 egyed közül két hímivarú egyedben a 3 SCAR marker egyike sem jelent meg. Mandolino et al. (1999) nőivarú egyedeket talált, amelyekben a hímivarhoz kapcsolt fragmentum megjelent. Ezt a jelenséget az ivari lókusz és a marker közötti rekombinációval magyarázták. Mécsvirágban az OPA-09 primer egy 810 bp nagyságú nő- és egy 590 bp nagyságú hímivarhoz kapcsolt fragmentumot amplifikált (Di Stilio et al. 1998). A kutatócsoport F₁ egyedek vizsgálatakor néhány olyan nőivarú egyedet talált, amelyek RAPD mintázatából hiányzott a 810 bp fragmentum és talált olyan hímivarú egyedeket is, amelyek mintázata az 590 bp nagyságú fragmantumon kívül a 810 bp band-et is tartalmazta. Ezek az eredmények alapján Di Stilio et al. (1998) azt feltételezte, hogy az azonosított markerek az X és Y kromoszómák PAR (pszeudoautoszomális) régióiban helyezkednek el, mivel ezek kromoszómarészek mentén lehetséges a meiotikus rekombináció (Westergard 1958).

Feltételezzük, hogy az általunk azonosított két hímivarhoz kapcsolt szekvencia (MADC3 és MADC4) az Y kromoszómához kapcsolt. Erre az ad lehetőséget, hogy az X és Y kromoszóma között nagy (2,8 %) méretbeli különbség van, ill. az hogy ennek megfelelően viszonylag nagyszámú markert azonosítottunk (1,25 %). Feltételezésünket az ivari lókusz és a marker (137 növény fenotípusa és a markeres meghatározás 2 esetben tért el), valamint a 3 szekvencia (MADC2, MADC3 és MADC4) egymás közötti (egy esetben sem volt eltérés) szoros kapcsoltsága is alátámasztja. A RAPD mintázat és a MADC3 és MADC4 fragmentumokkal végzett Southern hibridizáció eredményeiből, valamint a SCAR₁₁₉, SCAR₃₂₃ és SCAR₃₉₀ primerekkel végzett PCR analízisekből arra lehet következtetni, hogy ezek a szekvenciák esetleg nemcsak az Y kromoszómán fordulnak elő. Hasonló

eredményekre jutott Sakamoto et al. (1998) a MADC1 (721) szekvencia vizsgálatakor, amely sokkal erősebb fragmentumot adott a hímivarú egyedek hibridizációs mintázatában. Ohmido és Fukui (1996) a MADC1 szekvenciát próbaként használta fel metafázisos kromoszómák fluoreszcens *in situ* hibridizációjára (FISH) és az Y kromoszóma hosszú karjának végén kétszeres erősségű hibridizációs jelet tapasztalt.

Kenderben az ivar-determináció mechanizmusa még nincs tisztázva. Warmke és Davidson (1944) szerint az ivar-determinációban autoszomális gének nem játszanak szerepet. Moham Ram és Sett (1985) a mécsvirághoz hasonló aktív Y kromoszómás ivar-meghatározást megkérdőjelezi. Mások szerint az X kromoszómán hímivart indukáló -Xm, Masculizing – allélek találhatók (Durand és Durand 1990). A vizsgálataink és más kutatási eredmények alapján elképzelhetőnek tartjuk, hogy a kétlaki kenderben a mécsvirághoz hasonló aktív Y kromoszómás rendszer határozza meg az ivart (erre engednek következtetni a Flachowsky et al. 2000, Mandolino et al 1998, 1999, Ohmido és Fukui 1996, Sakamoto et al. 1995, 1998 által végzett molekuláris és citológiai vizsgálatok eredményei), míg az egylaki kenderben autoszomális (Kohler 1961) vagy X kromoszómán lokalizált hímivart indukáló gének (Durand és Durand) játszhatnak szerepet. Ez utóbbit támasztja alá, hogy az általunk azonosított MADC3 és MADC4, valamint a Mandolino et al (1999) által azonosított MADC2 hímivarhoz kapcsolt szekvenciák az egylaki növényekben nem amplifikálódtak.

A kérdés eldöntése az eddigi kutatási eredmények alapján nem lehetséges. Az alábbiakban felsorolt néhány vizsgálat elvégzésével közelebb jutnánk a kérdés megoldásához:

A MADC2, MADC3 és MADC4 fragmentumok *in situ* hibridizációja metafázisos kender preparátumokkal többek között magyarázatot adhatna arra, hogy hol helyezkednek el ezek az ivarhoz kapcsolt szekvenciák az egy- és kétlaki kender genomjában.

További RAPD vagy AFLP vizsgálatokkal újabb ivarhoz kapcsolt markerek azonosíthatók, amelyek rekombinációja az ivari lókusszal, vagy az eddig azonosított markerekkel plusz információt adhat az ivar-determináció megértéséhez.

Összefoglalás

Magyarországon államilag elismert 19 nyár klónt molekulárisan jellemeztük RAPD és AP-PCR módszerekkel. A 40 tesztelt primerből 35 eredményezett polimorf mintázatot. A genetikai távolságok meghatározásához 18 primer 162 fragmentumát értékeltük. A sávok mérete 250 és 2500 bp között volt. A RAPD és AP-PCR adatok alapján hasonlósági értékeket számítottunk, valamint klaszter és többdimenziós analízist végeztünk. A kiszámított genetikai távolságok összhangban voltak a klónok eredetével. Tizenkilenc primer faj- vagy hibrid-specifikus mintázatot eredményezett, amelyek közül 1 primer a *P. euramericana* klónokra, 10 pedig a VIF (*P. alba*) klónra specifikus fragmentumot adott. Az UNA és RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*), valamint KOR (*P. pyramidialis x P. deltoides*) klónokra specifikus fragmentumot 4-4 primer esetében kaptunk. A RAPD és AP-PCR módszerek sikeresen alkalmazhatók a nyár genotípusok elkülönítésében.

Az androgenetikus eredetű doubled haploid (DH) vonalak nemesítési értékét a genetikai stabilitásuk adja. Kísérleteinkben a GK Góbé (hagyományos nemesítéssel előállított fajta), GK Délibáb (androgenetikus eredetű fajta) fajtákat, és a belőlük előállított DH vonalakat (egyszeres és kétszeres DH vonalak) hasonlítottuk össze PCR-alapú módszerekkel. A csopotokon belül véletlenszerűen kiválasztott egyedekből nagy molekulatömegű DNS-t izoláltunk, majd RAPD, SSR, STS és AFLP analízist végeztünk. Kísérleteink célja a klasszikus és haploid nemesítéssel előállított fajták és vonalak homogenitásának vizsgálata volt ill. az, hogy megállapítsuk, hogy melyik markerezési technika a legalkalmasabb erre a célra. Harminc tesztelt RAPD primerből 6 eredményezett polimorfizmust a két alapfajta (GK Góbé és GK Délibáb) között, de a csoportokon belül egyedi különbségeket nem kaptunk. A 15 SSR és STS primerek közül, amelyek a búzagenom 15 lókuszát reprezentálták, 8 adott különbséget a két fajta között. A GK Délibáb (haploid nemesítéssel előállított) fajta csoportján belül egyedi különbségeket a WMS186 primerrel kaptunk. A nyolc AFLP primer kombinációból 7 polimorfizmust eredményező primerkombináció összesen 81 polimorf fragmentumot adott. Egy-egy AFLP primerkombinációval 100-150 fragmentum szaporodott fel. Egyedi különbség 23 fragmentumban mutatkozott. Az AFLP markerek közül 9 alkalmas volt a Góbé fajta, valamint a belőle származó DH csoport

elkülönítésére. A legkevesebb egyedi különbséget a GK Délibáb DH (kétszeres DH vonalak) csoportján belül kaptuk. A szántóföldi tesztek alapján a hagyományos és DH eredetű fajták és vonalak agronómiai tulajdonságokban kiegyenlítettek voltak, molekuláris szinten viszont különbségeket tudtuk kimutatni. Ezek feltehetően olyan különbségek a genomon belül, amelyek fenotípus szintjén nem manifesztálódnak.

Kísérleteinkben ivari markerek azonosítását tűztük ki célul kenderben. Huszonegy olyan RAPD primert teszteltünk kétlaki kenderfajtákban, amelyek már más növényekben ivari polimorfizmust adtak. A primerek közül 2 (OPD05 és UBC354) két hímivarhoz kapcsolt markert eredményezett. A két fragmentumot klónoztuk és szekvenáltuk. Southern analízisben az OPD05₉₆₁ szekvencia nem, az UBC354₁₅₁ viszont különbségeket adott a nőés hímivarú egyed hibridizációs mintázatában. A két hímivarhoz kapcsolt szekvencia más adatbanki szekvenciákkal szignifikáns homológiát nem mutatott. A bázissorrend meghatározása után SCAR primereket (SCAR₃₂₃ és SCAR₁₁₉) terveztünk, amelyek alkalmasak voltak a hímivarú egyedek elkülönítésére. A SCAR markereket 75 F₂ egyedekben teszteltük. Mindkét marker szoros kapcsoltságot mutatott az ivarral, mindössze két hímivarú egyed PCR mintázatában nem jelentek meg a hímivarhoz kapcsolt markerek. Az F₂ nemzedék vizsgálata alapján feltételezzük, hogy a markerek az Y kromoszómához kapcsoltak.

SUMMARY

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) and AP-PCR (Arbitrarily primed PCR) procedure was used to establish genetic diversity of 19 *Populus* clones. A set of 40 primers of random sequence was tested, from which 35 showed polymorphism. 18 primers generated 162 easily detectable bands between 250 to 2500 base pairs in size, sufficient to distinguish between the genotypes. Similarity measures, cluster and multidimensional scaling analysis were made to evaluate RAPD and AP-PCR data. Statistical analysis demonstrated that in most instances similarity in RAPD and AP-PCR banding patterns reflected the relationship due to origin. Nineteen primers gave species or hybrid specific pattern. One primer generated specific pattern in *P. euramericana*. Ten primers produced specific fragments in VIF (*P. alba*), 4 primers in KOR (*P. pyramidialis x P. berolinensis*) and 4 primers in UNA and RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*). The results of this study showed that RAPD or AP-PCR can be used to distinguish between poplar genotypes.

Genetic stability of doubled haploid (DH) lines of androgenetic origin is the prerequisite of their breeding value. In our investigations GK Góbé: a traditional cultivar, GK Délibáb: a cultivar of doubled haploid origin, various DH lines of GK Góbé (first cycle DH lines) and DH lines of GK Délibáb (second cycle DH lines) were compared with PCR-based molecular techniques. High molecular weight DNA was isolated from randomly selected individuals of these groups and analysed by RAPD, SSR, STS and AFLP methods. The objective of analyses was to determine the existence or magnitude of difference between cultivars produced by classical and haploid methods (populations are represented by the individuals of each group), and to find which marker system would be most suitable to investigate the homogeneity of DH populations. From the 30 RAPD primers tested, only 6 differentiated the two cultivars (GK Góbé and Délibáb). Individual polymorphism could not be observed. There were 8 fragments generated on 15 loci with 12 SSR and STS primers, which were suitable to differentiate the two cultivars. Individual polymorphisms could be detected between the cultivar GK Délibáb (cultivar of doubled haploid origin) with primer WMS186. In the AFLP analyses, 7 of 8 primer combinations were suitable to show differences, resulting in an average of 100-150 fragments. Eighty-one polymorphic

fragments were obtained with these 7 primer combinations. Twenty-three of the 81 polymorphic (bands) markers could detect individual differences. Nine of them were suitable to separate cultivar GK Góbé and its DH group. Based on AFLP fragments, the fewest individual polymorphisms were obtained within the DH group of GK Délibáb (second cycle DH lines). Differences, which are detectable at molecular level, but not morphologically can touch DNA regions, which do manifest at the level of phenotype, that is they do not cause changes in agronomic characters. This can be the reason that traditional cultivars and their DH derivatives do not show significant differences in field tests.

Twenty-one decamer RAPD primers producing sex-specific markers in different plant species were tested on some dioecious hemp cultivars. Two of them (OPD05 and UBC354) generated male-specific markers. These two DNA fragments were isolated, cloned and sequenced. While the OPD05₉₆₁ sequence gave no differences in Southern analysis of the randomly chosen female and male genomic DNA, the UBC354₁₅₁ probe resulted in differences in hybridisation signals. Both markers are unique, because there is no sequence with significant homology to OPD05₉₆₁ and UBC354₁₅₁ markers in sequence databases. Male-specific RAPDs were converted to SCARs. These SCAR markers (SCAR₃₂₃ and SCAR₁₁₉) were efficient in identification of all male plants and were able to amplify a single DNA band in both cases. SCAR markers were used to analyse randomly chosen F₂ plants. The SCAR markers correlated to the sex of the segregating population, except 2 male plants where these markers were missing. Results of plant analysis of F₂ population suggest these markers are to be linked to the Y chromosome.

Irodalomjegyzék

Ahmad M (2000) Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. Theor Appl Genet 101:892-896

Ainsworth C, Parker J, Buchanan-Wollaston V (1998) Sex determination in plants. Current Top Dev Biol 38:167-223

- Aitchitt M, Ainsworth CC, Thangavelu M. (1993) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Molecular Biology Reporter 11:317-319
- Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics 132:1131-1139
- Allard RW (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. Hilgardia 24:235-278
- Alstrom-Rapaport C, Lascoux M, Wang YC, Roberts G, Tuskan GA (1998) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). J Heredity 89:44-49
- Anderson DD, Greene FC, (1989) The characterization and comparative analysis of high-molecularweight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread-wheat. Theor Appl Genet 77:689-700
- Anderson DD, Greene FC, Yip RE, Halford NG, Shewry PR, Malpica-Romero JM (1989) Nucleotides sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne Nucleic Acids Res 17:461-462
- Armour JAL, Wong Z, Wilson V, Royle NJ, Jeffreys AL (1989) Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements. Nucl Acids Res 17:4925-4935
- Arnheim N, Strange C, Erlich H (1985) Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: Studies of the *HLA* class II loci. Proc Natl Acad Sci USA 82:6970-6974
- Arnholdt-Schmitt B, Herterich S, Neumann KH (1991) Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. Theor Appl Genet 91:809-815
- Arumuganathan E, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9:208-218
- Atal CK (1959) Sex reversal in hemp by application of gibberellin. Curr Sci 28:408-409
- Barnabás B, Pfahler PL, Kovács G (1991) Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 81:675-678
- Barrett JW, Rajora OP, Yeh FCH, Danick BP, Strobeck C. (1993) Mitochondrial DNA variation and genetic relationships of populus species. Genome 36:87-93
- Beckmann JS, Soller M (1986) Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica 35:111-124
- Benito C, Figueras AM, Zaragoza C, Gallego FJ, de la Pena A (1993) Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. Plant Mol Biol 21:181-183
- Beyermann B, Nürnberg P, Weihe A, Meixner M, Epplen JT, Börner T (1992) Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. Theor Appl Genet 83:691-694

- Bitonti MB, Cozza R, Wang G, Ruffini-Castiglione M, Mazzuca S, Castiglione S, Sala F, Innocenti AM (1996) Nuclear and genomic changes in floating and submerged buds and leaves of heterophyllouswaterchestnut (*Trapa natans*). Physiol Plant 97:21-27
- Boccone A (1975) Differenze chemiotassonomiche tra specie e cloni di pioppo a livello del contenuto in flavoni. Cellulosa e Carta 27:89-46
- Bócsa I (1994) Interview. In: Journal of the International Hemp Association, 1(2) p 61-63
- Bogani P, Simoni A, Lio P, Scalpi A, Buiatti M (1996) Genome flux in tomato cell clones cultured in vitro in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability. Genome 39:846-853
- Bohn M, Utz HF, Melchinger AE (1999) Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. Crop Sci 39:228-237
- Boritz S (1962) Papierchromatografische Differenzierung einiger Arten und Sorten der Gattung *Populus*. Züchter 32:24-33
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Amer J Human Genet 32:314-331
- Bradshaw HD, Villar JR, Watson M, Watson BD, Otto KG, Stewart S, Stettler RF. (1994) Molecular
- Genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers. Theor Appl Genet 89:167-178
- Breedemann G (1938) Züchtung des Hanfes auf Fasergehaltes. Die Ergebnisse des Jahres 1937. Faserforschung 4:239-258
- Bridges CB (1914) The chromosome hypothesis of linkage applied to cases in sweet peas and primula. Amer Natural 48:534-559
- Brown PTH, Gobel E, Lörz H (1991) RFLP Analysis of Zea mays callus cultures and their regenerated plants. Theor Appl Genet 81:227-232
- Bucherna N, Okkels FT, Palmgren G (1999) Developmental timing of transgene expression is dosage dependent. Physiologia Plantarum 107:90-97
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertson MC, Stuber CW (1988) Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics 118:519-557
- Castiglione S, Wang G, Damiani G, Bandi C, Bisoffi S, Sala F (1993) Identification of elite polar (*Populus* ssp.) clones using RAPD fingerprints. Theor Appl Genet 87:54-59
- Cervera M.T, Gusmao J, Steenackers M, Van Gysel A, Montagu MV, Boerjan W (1996) Application of AFLP based molecular markers to breeding of *Populus* species. Plant Growth Regulation 20:47-52
- Cervera MT, Villar M, Faivre-Rampant P, Goué M.C, Montagu M.V, Boerjan W (1997) Application of Molecular Marker Technologies in *Populus* Breeding. In: Klopfenstein NB, Chun YW, Kim MS, Ahuja M.R. (Ed) Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of *Populus*. Gen Tech Rep RM-GTR-297. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station p 101-115
- Chailakhan MK (1979) Genetic and hormonal regulation of growth, flowering and sex expression in plants. Am J Bot 66:717-736
- Chao SP, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologus group 7 chromosomes. Theor Appl Genet 78:493-504
- Cheliak WM, Dancik BP (1982) Genetic diversity of natural populations of a clone-forming tree, *Populus tremuloides*. Canadian Journal of Genetic Cytology 24:611-616
- Ciuperescu D, Veuskens J, Mouras A, Ye D, Briquet M, Negrutiu I (1990) Karyotyping *Melandrium album*, a dioecious plant with heteromorfic sex chromosomes. Genome 33:556-562
- Clarke RK (1997) Hanf: Botanik, Anbau Vermehrung und Züchtung AT Verlag, Aarau, Schweiz

- Condit R, Hubell SP (1991) Abundance and DNA sequence of two-based repeat regions in tropical tree genomes. Genome 34:66-71
- Dachkewich T, Redaelli R, Biancardi AM, Metakowsky EV, Pogna NE (1993) Genetics of gliadins coded by the group 1 chromosomes in the high-quality bread wheat culivar Neepawa. Theor Appl Genet 86:389-399
- Dayanandan S, Rajora OP, Bawa KS (1998) Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). Theor Appl Genet 96:950-956
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Francis HA, Harcourt RL, Koebner RMD, Liu CJ, Masojc P, Xie DX, Gale MD (1993) Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. Theor Appl Genet 85:673-680
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Gale MD (1992) RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. Theor Appl Genet 83:931-939
- Devos KM, Bryan GJ, Collins AJ, Stephenson P, Gale MD (1995) Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. Theor Appl Genet 90:247-252
- Devos KM, Gale MD (1993) Extended genetic maps of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat, rye and barley. Theor Appl Genet 85:649-652
- Di Stilio VS, Kesseli RV, Mulcahy DL (1998) A pseudoautosomal random amplified polymorphic DNA marker for the sex chromosomes of *Silene dioica*. Genetics 149:2057-2062
- Dinus RJ, Tuskan GA (1997) Integration of molecular and classical genetics: A synergistic approach to tree improvement. In: Klopfenstein NB, Chun YW, Kim MS, Ahuja MR (Ed) Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus. Gen Tech Rep RM-GTR-297. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. p 220-235
- Donini P, Elias ML, Bougourd SM, Koebner RMD (1997) AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. Genome 40:521-526
- Dudits D, Heszky L (2000) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó
- Durand R, Durand B (1990) Sexual determination and sexual differentiation. Critical Review in Plant Sciences 9:295-316
- Dvorak J, di Terlizzi P, Zhang HB, Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats: Identification of the A genome donor species. Genome 36:21-31
- Flachowsky H, Schumann E, Weber WE, Peil A (2000) AFLP-marker for male plants of hemp (*Cannabis sativa* L.). Mendel Centenary Congress, Brno-Czech Republik, March 7-10, Book of Abstracts p 213
- Fladung M (1998) Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. In: Vorträge für Pflanzenzüchtung 43, Biotechnologie in der Pflanzenzüchtung Potentielle und aktuelle Nutzung 4. GPZ-Tagung, 3.–5. März 1998 Giessen. p 124-133
- Friebe B, Heun M, Tuleen N, Zeller FJ, Gill BS (1994) Cytogenetically monitored transfer of powdery mildew resistance from rye into wheat. Crop Sci 34:621-625
- Gale MD, Chao S, and Sharp PJ (1990) RFLP mapping in wheat progress and problems. In: Gustafson JP (Ed) Gene manipulation in crop improvment II, Plenum Press, New York, 353-363
- Gassen HG, Minol K (1996) Gentechnik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Gill GP, Harvey CF, Gardner RC, Fraser LG (1998) Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. Theor Appl Genet 97:439-445
- Goodwin SB, Hu X, Shaner G (1998) An AFLP marker linked to a gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. In: Slinkard AE (Ed.), Proc 9th Int Wheat Genet Symp, Vol 3:108-110, Univ Extension Press, Univ of Saskatchewan, Saskatoon

- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G, Hermann RG (1991) Construction of an RFLP map of barley. Theor Appl Genet 83:250-256
- Grant S, Houben A, Vyskot B, Siroky J, Pan WH, Macas J, Saedler H (1994): Genetics of sex determination in flowering plants. Dev Genet 15:214-230
- Greenway W, Jobling J, Seaysbrook T (1989) Composition of bud exudates of *Populus x interamericana* clones as a guide to clonal identification. Silvae Genet 38:29-32
- Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breeding 118:369-390
- Gyulai G, Gémesné A, Sági Zs, Venczel G, Pintér P, Kristóf Z, Törjék O, Heszky L, Bottka S, Kiss J, Zatykó L (2000) Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. J Plant Physiol 156:168-174
- Hajósné Novák M (1999) Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó
- Hartl L (1995) Identifizierung und Lokalisierung molekularer Marker für Mehltauresistenzgene bei Weizen (*Triticum aestivum* L.). (Hrsg) Shaker Verlag
- Hartl L, Mori S, Schweizer G (1998) Identification of a diagnostic molecular marker for the powdery mildew resistance gene Pm4b based on fluorescently labeled AFLPs. In: Slinkard AE (Ed.), Proc 9th Int Wheat Genet Symp, Vol 3:111-113, Univ Extension Press, Univ of Saskatchewan, Saskatoon
- Harvey CF, Gill GP, Fraser LG, McNeilage MA (1997) Sex determination in *Actinidia*. L. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. Sex Plant Reprod 10:149-154
- Haunold A (1991) Cytology and cytogenetics of hops. In: Chromosome ingineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B. (Ed) Tsuschiya T, Gupta PK Elservier, Amsterdam p 551-563
- He S, Ohm H, Mackenzie S (1992) Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. Theor Appl Genet 84:573-578
- Heinze B (1997) A PCR marker for a *Populus deltoids* allele and its use in studying introgression with native European *Populus nigra*. Belg Journ Bot 129 (2):123-130
- Heslop-Harisson J (1956) Auxin and sexuality in Cannabis sativa. Physiol Plantarum 4:588-597
- Hohmann U, Endo TR, Gill KS, Gill BS (1995) Comparison of genetic and physical maps of group-7 chromosomes from *Triticum aestivum* L. Mol Gen Genet 245:644-653
- Hormaza JI, Dollo L, Polito VS (1994) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor Appl Genet 89:9-13
- Hyun OJ, Rajora OP, Zsuffa L (1987) Genetic variation in trembling aspen in Ontario based on isoenzyme studies. Canadian Journal of Forest Research 17:1134-1138
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44:223-270
- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of sinle cells. Nucl Acids Res 16:10953-10972
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature 314:67-73
- Jiang C, Sink K (1997) RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in asparagus. Euphytica 94:329-333
- Karsai I, Mészáros K, Hayes PM, Bedő Z (1997) Effects of loci on chromosomes 2 (2H) and 7 (5H) on developmental patterns in barley (Hordeum vulgare L.) under different photoperiod regimes. Theor Appl Genet 94:612-618
- Keim P, Paige KN, Whitham TG, Lark KG (1989) Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional introgression. Genetics 123:557-565

- Kertész Z, Kertész Cs, Pauk J, Falusi J, Törjék O, Kiss E, Mázik K, Hassan S, Heszky L (2000) Utilization of anther culture in wheat breeding and seed production. 6Th International Wheat Conference, 5-9 June, Budapest, Hungary p 101
- Kertész Z, Pauk J, Kertész Cs, Heszky LE, Matuz J (1998) Positive evidence on the agronomic value of doubled haploids in wheat. Proc 9th Int Wheat Genet Symp Vol 2:250-252 Univ Extension Press, Univ Of Saskatchewan, Saskatoon
- Kiss E (1999) Növényi molekuláris genetika I. Egyetemi jegyzet, Egyetemi Nyomda, Gödöllői Agrártudományi Egyetem
- Kiss E (2001) Növényi géntechnológia gyakorlatok. Oktatási segédanyag. SZIE Gödöllő.
- Kiss E, Norelli J, Aldwinckle H, Hrazdina G (1995) Down-regulation of ethylene biosynthesis in apples: cloning and sequencing of partial ACC-synthase gene in McIntosh. Proceedings of the FAO/IAEA International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. Vienna, Austria 19-23 june IAEA-SM-340 562-564
- Kiss J (1999b) Biotechnológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása a hazai nyárfanemesítésben. Doktori értekezés
- Kiss J, Kondrák M, Törjék O, Kiss E, Gyulai G, Mázik-Tőkei K, Heszky LE (2000) Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. Euphitica *in press*
- Koebner R, Kirssch F, Thorpe C, van Campenhout S (1998) Generation of STS markers for wheat/rye introgression. In: Vorträge für Pflanzenzüchtung 43, Biotechnologie in der Pflanzenzüchtung – Potentielle und aktuelle Nutzung – 4. GPZ-Tagung, 3.–5. März 1998 Giessen. p 124-133
- Koebner RMD, Miller TE, Snape JW, Law CN (1988) Wheat endopeptidase: genetic control, polymorphism, intrachromosomal gene location and alien variation. Genome 30:186-192
- Korzun V, Röder M, Worland AJ, Börner A (1997) Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalisation response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. Plant Breeding 116:227-232
- Korzun V, Röder MS, Ganal MW, Worland AJ, Law CN (1998) Genetic Analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 96:1104-1109
- Köhler D (1961) Ein Beitrag zur Physiologie und Genetik der Geschlechtsausprägung von *Cannabis sativa*. Planta 56:150-173
- Kurata N (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. Nature Genetics 8:365-372
- Lafiandra D, Masci S, D'Ovidio R, Tanzarella OA, Porceddu E, Margiotta B (1992) Relationship between the D genome of hexaploid wheats (AABBDD) and Ae. Squarrosa as deduced by seed storage proteins and molecular marker analyses. Hereditas 116:233-238
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199
- Lin DC, Hubbes M, Zsuffa L (1997) Differentiation of poplar clones using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. In: Klopfenstein NB, Chun YW, Kim MS, Ahuja MR (Ed) Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus. Gen Tech Rep RM-GTR-297. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station p 116-123
- Link W, Dixkens C, Singh M, Schwall M, Melchinger AE (1995) Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. Theor Appl Genet 90:27-32
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 44:397-401

- Liu YG, Tsunewaki K (1991) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat. Jpn J Genet 66:617-633
- Liu Z, Furnier GR (1993a) Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphism in trembling aspen. Journal of Heredity 84:419-424
- Liu Z, Furnier GR (1993b) Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theor Appl Genet 87:97-105
- Liu ZQ, Pei Y, Pu ZJ (1998) Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum* L. Plant Breeding 119-123
- Lund ST, Furnier GR, Mohn CA (1992) Isoenzyme variation in quaking aspen in Minesotta. Canadian Journal of Forest Research 22:521-524
- Lutz J, Hsam SLK, Limpert E, Zeller FJ (1995) Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum L.*) 2. genes *Pm2* and *Pm19* from *Aegilops squarrosa* L. Heredity 74:152-156
- Lynch M (1990) The similarity index and DNA-fingerprinting. Mol Biol Evol 7:478-484
- Ma H, Busch RH, Riera-Lizarazu O, Rines HW, Dill-Macky R (1999) Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. Theor Appl Genet 99:432-436
- Mandolino G, Carboni A, Forapani S, Faeti V, Ranalli P (1999) Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). Theor Appl Gen 98:86-92
- Mandolino G, Carboni A, Forapani S, Ranalli P (1998) DNA markers associated with sex phenotype in hemp (*Cannabis sativa* L.). Proceedings of the blast fibrous plants today and tomorrow p197-201
- Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. Proc Acad Sci U.S.A. 45:753-763
- Matsunaga S, Kawano S, Michimoto T, Higashiyama T, Nakao S, Sakai A, Kuroiwa T (1999) Semiautomatic laser beam microdissection of the Y chromosome and analysis of Y chromosome DNA in a dioecious plant, *Silene latifolia*. Plan Cell Physiol 40 (1):60-68
- Mázikné Tőkei K, Gyulai G, Kertész Cs, Kertész Z, Kiss E, Matuz J, Pauk J, Tóthné Lőkös K, Heszky L (1999) Különböző eredetű búzafajták és doubled haploid analógjaik citológiai analízise. V. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA, Budapest 1999 március 9 Összefoglalók p 87
- McFadden ES, Sears ER (1946) The origin of Triticum spelta and its free-threshing hexaploid relatives. J Hered 37:81-89
- Mejnartowicz M (1991) Inheritance of chloroplast DNA in Populus. Theor Appl Genet 82:477-480
- Melchinger AE (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. Plant Breeding 104:1-19
- Mendel D (1886) Versuche über Pflanzenhybriden. Verband der Naturforschung. Verein Brunn 4:3-47
- Messmer MM, Seyfarth R, Keller M, Schachermayer G, Winzeler M, Zanetti S, Feuillet C, Keller B (2000) Genetic analysis of durable leaf resistance in winter wheat. Theor Appl Genet 100:419-431
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88:9828-9832
- Miller TE (1987) Systematics and evolution. In: Lupton FGH (Ed) Wheat breeding its scientific basis, Chapman and Hall, London 1-30
- Mohan M, Nair S, Bentur JS, Rao UP, Benett J (1994) RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm2* gene that confers resistance to biotype 1 of gall midge (*Orseolia oryzae*). Theor Appl Genet 87:782-788

- Mohan Ram HY, Jaiswal VS (1970) Induction of female flowers on male plants of *Cannabis sativa* by 2-cloroethane phosphonic acid. Experientia 26:214-216
- Mohan Ram HY, Nath R (1964) The morfology and embryology of *Cannabis sativa* Linn. Phytomorphology 14:414-429
- Mohan Ram HY, Sett R (1985) *Cannabis sativa*. Halevy Handbook of flowering plants 2 131. Boca Raton, FL: CRC Press
- Moissy-Cramayel (1994) A molekuláris markerezés: Hatékony eszköz a nemesítők számára. MTA Növénynemesítési Bizottság GKI Szeged
- Moore G, Devos KM, Wang Z (1995) Grasses, line up and from a circle. Curr Biol 5:737-739
- Morgante MG, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J 3:175-182
- Muehlbauer GJ, Specht JE, Thomas-Compton MA, Staswick PE, Bernard RL (1988) Near-isogenic lines a potential resource in the integration of conventional and molecular marker linkage maps. Crop Sci 28:729-735
- Mulachy DL, Weeden NF, Kesseli R, Carroll SB (1992) DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioeceous angiosperm. Sex Plant Reprod 5:86-88
- Myburg AA, Cawood M, Wingfield BD, Botha AM (1998) Development of RAPD and SCAR markers linked to the Russian wheat aphid resistance gene *DN2* in wheat. Theor Appl Genet 96:1162-1169
- Nagy I (1999) Továbbfejlesztett PCR-alapú polimorfizmus-vizsgálati technikák. Növénytermelés 48:421-434
- Neale D and Sedorff R (1991) Genome mapping in pine takes shape. Probe 1:1-3
- Nei M (1963) The efficiency of haploid method of plant breeding. Heredity 18:95-100
- Nei M (1978) Estimation of average heterozigosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics 89:583-900
- Ohmido N, Fukui K (1996) A new manual for fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant chromosomes. Rice Genet Newsl 13:89-93
- Olson M, Hood L, Cantor C, Doststein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. Science 254:1434-1435
- Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. Theor Appl Genet 85:985-993
- Parasnis AS, Gupta VS, Tamhankar SA, Ranjekar PK (2000) A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. Molecular Breeding 6:337-344
- Parker JS (1990) Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. Chromosomes Today 10:187-198
- Parker JS, Clark MS (1991) Dosage sex-chromosome systems in plants. Plant Sci 80:79-92
- Pauk J, Kertész Z, Beke B, Bóna L, Csősz M, Matúz J (1995) New winter wheat variety: GK Délibáb developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. Cereal Research Communications 23:251-256
- Plaschke J, Ganal MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor Appl Genet 91:1001-1007
- Podani J (1993) Syn-Tax Version 5.0: Computer programs for multivariate data
- Polley A, Seigner E, Ganal MW (1997) Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. Genome 40:357-361
- Prickett TCR, Walker JRL (1989) Flavone compounds in male and female asparagus plants. J Sci Food Agric 47:53-60

- Purnhauser L, Gyulai G, Tar M, Csősz L, Mesterházy Á, Heszky L (1999) Use of molecular marcers in wheat in breeding for disase resistance. In: Use of Agriculturally Important Genes in Agricultural Biotechnology. Nato Advanced Research Workshop. Oct. 17-21, Szeged Hungary Proceedings p 52-57
- Radetzky R (1990) Analysis of mitochondrial DNA and its inheritance in Populus. Current Genetics 18:429-434
- Rajora OP (1988) Allozymes as aids for identification and differentiation of some *Populus maximowiczii* Henry clonal varieties. Biochemical Systematics and Ecology 16:635-640
- Rajora OP (1989) Characterization of 43 *Populus nigra* L. clones representing selections, cultivars and botanical varieties based on their allozyme genotypes. Euphytica 43:197-206
- Rajora OP, Danick BP (1995) Chloroplast DNA variation in *Populus*. I, II. Interspecific restriction fragment diversity within *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii* and *P. x Canadensis*. Theor Appl Genet 90:317-330
- Rajora OP, Zsuffa L (1989) Multilocus genetic structure, characterization and relationship of *Populus x canadensis* cultivars. Genome 32:99-108
- Rani I., Parida A, Raina SN (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* Marsh. Plant Cell Reports 14:459-462
- Reamon-Büttner SM, Schondelmaier J, Jung C (1998) AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. Molecular Breeding 4:91-98
- Reiter RS, Williams JGK, Feldman KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnic PA (1992) Global and local mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proc Natl Acad Sci USA 89:1477-1481
- Riley R, Chapman V, Young RM, Belfield AM (1966) Control of meiotic chromosome pairing by the chromosomes of homoeologous groups of *Triticum aestivum*. Nature 212:1475-1477
- Rousset M, Carrillo JM, Qualser CO, Kasarda DD (1992) Use of recombinant inbred lines of wheat for study of associations of high-molecular-weight glutenin subjunit alleles to quantitative traits. Theor Appl Genet 83:403-412
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixter MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007-2023
- Rus-Kortekaas W, Smulders MJM, Arens P, Vosman B (1994) Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. Genome 37:375-381
- Sachermayr G, Siedler H, Gale MD, Winzeler H, Winzeler M, Keller B (1994a) Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. Theor Appl Genet 88:110-115
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354
- Sakamoto K, Akiyama Y, Fukui K, Kamada H, Satoh S (1998) Characterization, genom sizes and morfology of sex chromosomes in hemp (*Cannabis sativa* L.). Cytologia 63:459-464
- Sakamoto K, Shimomura K, Komeda Y, Kamada H, Satoh S (1995) A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. Plant Cell Physiol 36:1549-1554
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlegel G, Schlegel R (1989) A compendium of reciprocal intervarietal translocations in hexaploid wheat. Kulturpflanze 37:163-176

- Schönfeld M, Ragni A, Fischbeck G, Jahoor A (1996) RFLP mapping of three new resistance loci from *Hordeum spontaneum* derived lines against powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. Hordei). Theor Appl Genet 93:48-56
- Scutt CP, Kamisugi Y, Sakai F, Gilmartin PM (1997) Laser isolation of plant sex chromosomes: studies on the DNA composition of the X and Y sex chromosomes of *Silene latifolia*. Genome 40:705-715
- Sears ER (1954) The aneuploids of common wheat. Res Bull, Univ Miss, Coll Agric, Agric Exp 572:1-59
- Sears ER (1966) Nulli-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In: Riley R, Lewis KR (Ed) Chromosome manipulation and plant genetics, a suppl. To Heredity 20:29-45. Oliver and Boyd, Edinbourgh
- Sears ER, Sears LMS (1978) The telocentric chromosomes of common wheat. Proc 5th Int Wheat Genet Symp, New Delhi, India, p 389-407
- Seefelder S, Ehrmaier H, Schweizer G, Seigner E (2000) Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. Plant Breeding 119:249-255
- Shah MM, Yen Y, Gill KS, Baenzinger PS (2000) Comparisons of RFLP and PCR-based markers to detect polymorphism between wheat cultivars. Euphytica 114:135-142
- Smith RL, Schweder ME, Barnett RD (1994) Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers. Crop Sci 34:1373-1378
- Snape JW (1989) Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In: Mujeeb-Kazi A, Sitch LA (Ed) Review of advances in plant biotechnology, 1985 88: CIMMYT/IPRI, Mexico DF, Mexico, Manila, Philipines p 19-30
- Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ Kansas Sci Bull 38:1409-1438
- Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM (1996) Biology of *Populus* and ist implications for management and conservation. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Ont
- Stiles JI, Lemme C, Sondur S, Morshidi MB, Manshardt R (1993) Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor Appl Genet 85:697-701
- Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of assotiation. J Exp Zool 14:43-59
- Sutka J, Galiba G, Snape JW (1997) Inheritance of frost rezistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Proc Int Symp Cereal Adapt To Low Temp Stress. Martonvásár, Hungary, june 2-4, 1997 p 142-148
- Tanksley SD (1983) Molecular markers in plant breeding. Plant Mol Biol Rep 1:3-8
- Torp AM, Hansen AL, Holme IB, Anderson SB (1998) Genetic markers for haploid formation in wheat anther culture. In: Slinkard AE (ED), Proc. 9th Int Wheat Genet Symp, Vol 3:108-110, Univ Extension Press, Univ of Saskatchewan, Saskatoon
- Tschapalinski TJ, Tuskan GA (1994) Water-stress tolerance of black and eastern cottonwood clones and four hybrid progeny. II. Metabolic and onorganic ions that constitute osmotic adjustment. Can. J For Res 24:681-987
- Villar M, Lefevre F, Bradshaw HD, Teissier du Cros E (1996) Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Malampsora larici-populina* Kleb/*Populus* sp.) by bulked segregant analysis in a 2 x 2 factorial mating design. Genetics 143:531-536
- Vivani W, Sekawin M (1953) Esperience di poliploidia indotta nel genere *Populus* I.. FAO/IPC, 2nd Session, Roma, Italy

- Von Wettstein Knowles P (1992) Cloned and mapped genes: current status. In: Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology, Shewry PR (Ed), Alden Press, Oxford: 231-264
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nuc Acid Res 23: 4407-4414
- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor Appl Genet 88:1-6
- Warmke HE, Davidson H (1944) Polyploid investigation. Yearbook of the Carnegie Institution of Washington 43:135-139
- Weber JL (1990) Informativness of human (dC-dA)n-(dG-dT)n polymorphisms. Genomics 7:524-530
- Weising K, Beyermann B, Ramser J, Kahl G (1991) Plant DANN-fingerprinting with radioactive and digoxygenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. Electrophoresis 12:159-169
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 18:7213-7218
- Westergaard M (1958) The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. Adv Genet 9:217-281
- Weston EW (1960) Changes in sex in the hop caused by plant growth substances. Nature 188:81-82
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KL, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18:6531-6535
- Wu KS, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol Gen Genet 241:225-235
- Wu RL, Han YF, Hu JJ, Fang JJ, Li L, Li ML, Zeng ZB (2000) An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet 100:1249-1256
- Yamada I. (1943) The sex chromosomes of *Cannabis sativa* L. Reports of the Kihara Institute of Biological Research 2:64-68
- Yampolsky C, Yampolsky H. (1922) Distribution of the sex forms in the phanerogamic flora, Bibl Genet, 3:1-62
- Young ND, Tanksley SD (1989) RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *TM-2* locus of tomato during backcross breeding. Theor Appl Genet 77:353-359
- Young ND, Zamir D, Ganal MW, Tanksley SD (1988) Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. Genetics 120:579-585
- Zabeau M, Vos P (1993) Keygene, Wageningen. In: European patent Application, Publication Nr 0 534 858 A1
- Zeller FJ, Hsam SLK (1983) Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. In: Proc. 6th Inter. Wheat Genet Symp. Kyoto: 137-149
- Zhang YH, Di Stilio V, Rehman F, Avery A, Mulcahy D, Kesseli R (1998) Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. Genome 41:141-147
- Zhao X, Kochert G (1992) Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.) Mol Gen Genet 231:353-359

Függelék



L abra. A 19 nyár genotipus UBC354 (A), OPD05 (B), OPJ09 (C), OPA02 (D) és OPA08 (E) primerekkel kapott RAPD mintázatai. A fragmentumokat cluster analízisbe vontuk. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas): 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp.

A C10 D6 D7 D8 D9 D 3.1 3.4 A.6. DIS. THE 100 Bull (26) 300 → WMS261 B M AI A2 A3 B1 D3 D4 11111 200 -¢ WMS17 C MA 300 → WMS410 D D8 D9 D10 MA M M B8 B9 B10 C6 CH C9 C10 D6 D7 **HARRY** 300 -GLYF1/RI

II. ábra: A GK Góbé (A1-A6), a GK Góbé DH vonalai (B1-B10), a GK Délibáb (C1-C10) és a GK Délibáb DH (D1-D10) vonalainak mintázata a WMS261, WMS174, WMS410 és F1/R1 (γgliadin pszeudogén) mikroszatellit primerekkel. Az eltérő alléleket a két alapfajtában nyilak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas).



III. ábra: A GK Góbé (A1-A6), a GK Góbé DH vonalai (B1-B10), a GK Délibáb (C1-C10) és a GK Délibáb DH (D1-D10) vonalainak mintázata az E44/M55 AFLP primerkombinációval. Az egyedi különbségeket sötét, a fajtaspecifikus különbségeket pedig fehér nyilak jelzik.



IV. ábra. A GK Góbé (A1-A6), a GK Góbé DH vonalai (B1-B10), a GK Délibáb (C1-C10) és a GK Délibáb DH (D1-D10) vonalainak mintázata az E33/M40 AFLP primerkombinációval. Az egyedi különbségeket sötét, a fajtaspecifikus különbségeket pedig fehér nyilak jelzik.



V. ábra. A GK Góbé (A1-A6), a GK Góbé DH vonalai (B1-B10), a GK Délibáb (C1-C10) és a GK Délibáb DH (D1-D10) vonalainak mintázata az E44/M55 AFLP primerkombinációval. Az egyedi különbségeket sötét, a fajtaspecifikus különbségeket pedig fehér nyilak jelzik.

I. táblázat: A búzaminták (4 x 18 vagy 6, 10, 10, 10 búzaminta) vizsgálatánál felhasznált primerek és a velük kapott polimorfizmusok száma.

Módszer	A két fajta között különbséget eredményező primerek	Az egyes csoportokon belül vizsgált minták száma	Polimorf fragmentumok száma	Egyedi különbséget adó fragmentumok száma			
				GK Göbé	GK Góbé DH	GK Délibáb	GK Délibáb DH
RAPD	NOII	18, 18, 18, 18	1		1.1.1.1.1.1.2		10-10-0
	OPAB09	18, 18, 18, 18	1			11	
	OPX11	6, 10, 10, 10	1		1.2 A. 2021		
	OPA16	6, 10, 10, 10	1		N		and the second
SSR és STS	WMS3	18, 18, 18, 18	1		191825555	15.52 - 1	
	WMS55	6, 10, 10, 10	1	5.000	LAND ON	S. Solditor	581064
	WMS174	6, 10, 10, 10	1	0.2235.251	E TO OLLA		10
	WMS186	6, 10, 10, 10	2		12 500	5	
	WMS410	6, 10, 10, 10	1		2012	N. A.	
	GlyF1/R1	18, 18, 18, 18	1		and the stands		
	GlyF2/R2	6, 10, 10, 10	1	Carling and		Contraction of the	str. chours
	P3/P4	6, 10, 10, 10	1		The second second	120121	
AFLP	E33/M40	6, 10, 10, 10	15	1	3	6	1
	E35/M57	6, 10, 10, 10	4		2	1	Autoria
	E38/M47	6, 10, 10, 10	5	2.512.5	1	1	24
	E38/M60	6, 10, 10, 10	14	Section 2	1	122 221	
	E39/M34	6, 10, 10, 10	14	1	2		
	E44/M44	6, 10, 10, 10	9	Salar C	181 32.30	120238	
	E44/M55	6, 10, 10, 10	20	2	2	4	1



VI. ábra. Hímivar-specifikus markerek egyedi növénymintákban. A Fleischmann fajta nő– (35-39) és hím– (40-43), valamint a Tiborszállási nő– (44-48) és hímegyedeinek (49-53) mintázata az OPD05 (A, D) és UBC354 (B, E) RAPD és SCAR₃₉₀ (C, F) szekvenciaspecifikus primerekkel. Az ivarspecifikus fragmentumokat a nyílak jelzik. M = 100 bp molekulatömeg marker (Fermentas).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm édesanyámnak és nevelőapámnak a lelkes biztatásukat és az anyagi támogatást, amelyet a PhD képzés alatt nyújtottak, barátnőmnek, Ivanyos Natáliának a bizalmát és megértését. Munkám során édasapám és a testvérem, Dr. Törjék Zoltán kitartása mindíg példaképül szolgált.

Témavezetőmnek, Dr. Kiss Erzsébetnek köszönöm a kísérletek megtervezésében és kivitelezésében nyújtott segítségét, valamint azt hogy szakmai ismereteit átvehettem. Külön szeretném megköszönni, hogy segítségére és támogatására minden pillantban számíthattam, továbbá azt, hogy a kísérletek folyamatos felügyelete mellett nagyfokú szabadságot biztosított a kutató munkában.

Köszönöm Dr. Heszky László professzor Úrnak, hogy OTKA pályázataiból a kéziratban szereplő tudományos problémák kutatásával megbízott és ezzel lehetővé tette, hogy a kísérleteket a tanszéken végezhessem. Külön köszönöm, hogy a munkámat mindíg figyelemmel kísérte és értékes szakmai tanácsaival a kutatómunkában és a disszertáció elkészítésében közvetlenül is támogatott.

Köszönöm Dr. Gyulai Gábornak lelkesítő és értékes szakmai javaslatait. Hasonló köszönettel tartozom Dr. Kiss Józsefnek és Dr. Bucherna Nándornak.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Mázikné Tőkei Katalinnak, Dr. Hajósné Novák Mártának, Dr. Bellusné Daniek Ágnesnek, Homoki Hajnalkának, Galli Zsoltnak, Kondrák Mihálynak és a Tanszék minden dolgozójának, hogy baráti és inspiratív munkahelyi légkör megteremtésével segítették a dolgozat elkészítését.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Hutvágner Györgynek, Dr. Bánfalvi Zsófiának és Dr. Silhavy Dánielnek az AFLP vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Végül és nem utolsó sorban szeretném megköszönni a Magyar Államnak, hogy ösztöndíjat biztosított számomra és ezáltal lehetővé tette, hogy a kutatásokat és a PhD kurzust Magyarországon végezhettem.

A kísérleteket az alábbi pályázatok támogatták: OTKA TO 22726, FKFP 380 és OTKA TO 307

