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

Doktori értekezés tézisei

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	Dr. Kiss Erzsébet
programvezető	témavezető

1. A munka előzményei, a kitűzött célok

A termesztett növények genetikai variabilitásának növelésére irányuló genetikai kutatások évtizedeken keresztül a fenotípus megfigyelésén és elemzésén alapultak. A fenotípus-genotípus kölcsönhatás vizsgálatán alapuló szelekció hatékonyságát nagymértékben befolyásolja a környezet, a kvantitatív 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 alapuló módszerek a nukleotid szekvenciában tapasztalható különbségek, azaz az allélpolimorfizmusok kimutatására alkalmas technológiát kínálnak.

Az értekezésben három különböző növényfaj molekuláris vizsgálatáról számolok be. A kísérletek során alkalmazott módszerek hasonlóak voltak, a célkitűzések azonban eltértek, ezért az egyes témákat külön alfejezetekben tárgyalom.

1.1. Államilag elismert nyár klónok molekuláris analízise.

Hazánkban az összes erdősültségben 9,5 %-os területarányt képviselő nyárültetvények az éves fakitermelés egy ötödét szolgáltatják. 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 és AP-PCR markerek azonosítása volt.

1.2. 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. Szignifikáns különbségeket citológiai vizsgálatokkal sem sikerült kimutatni.

A GK Góbé (hagyományos nemesítéssel előállított) és GK Délibáb (androgenetikus eredetű) fajták, valamint a belőlük előállított DH vonalak véletlenszerűen kiválasztott egyedeinek molekuláris polimorfizmusát RAPD, SSR, STS és AFLP technikákkal vizsgáltuk és hasonlítottuk össze abból a célból, hogy adatokat kaphassunk az egyes csoportok homogenitásának molekuláris hátteréről.

1.3. 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 még nincs tisztázva.

Kísérleteinkben ivarhoz kapcsolt molekuláris markerek azonosítását tűztük ki célul. Megfelelő markerek segítségével ugyanis lehetővé válhat a korai ivar-meghatározás, amely a markerre alapozott szelekcióban használható, továbbá plusz információt jelenthetnek az ivardetermináció mechanizmusának tanulmányozásában is.

2. Anyag és módszer

A molekuláris összehasonlító vizsgálatokat és a kapcsolt molekuláris markerek azonosítását a nukleotid szekvenciákban tapasztalható polimorfizmusok teszik lehetővé. A nyárban, búzában és kenderben végzett vizsgálatok során a polimorfizmusok azonosítására a PCR-alapú módszerek közül a RAPD, AP-PCR, SSR, STS és AFLP technikákat alkalmaztuk.

Nyárban a Magyarországon államilag elismert nyár klónok közötti genetikai távolságok becslésére, a domináns markerek esetében gyakran alkalmazott Jaccard indexet és a Simple Matching egyezési koefficienseket valamint az MDS analízist használtuk az adatok kiértékeléséhez.

Kenderben a hímivarhoz kapcsolt markerek szekvenciái alapján az ivar azonosítására alkalmas SCAR primereket terveztünk.

3. Eredmények

3.1. Államilag elismert nyár klónok molekuláris polimorfizmusa

Tizenkilenc Magyarországon államilag elismert nyár klón DNS-mintáit összesen 40 mintázatot eredményező primerrel vizsgáltuk, amelyek közül 35 adott polimorfizmust a klónok között. Tizennyolc primer 162 jól értékelhető fragmentuma alapján klaszter analízist végeztünk. A fragmentumok megléte és hiánya alapján kapott bináris adatokból a klónok közötti genetikai távolságok becsléséhez a Jaccard indexet és a Simple Matching egyezési koefficienst használtuk. A hasonlósági koefficiensek értéke 0,350 és 0,832 között volt. A kalszter analízissel 4 fő csoport különült el, amely egyben megegyezett azzal, hogy a klónok melyik fajhoz vagy hibridhez tartoztak. *A P. euramericana* csoporton belül további alcsoportok voltak elkülöníthetők. Az eredmények jobb szemléltetése céljából MDS analízist végeztünk, amelyek a dendrogramtól eltérően a genetikai távolságokat nem egy síkban, hanem 2 vagy 3 dimenzióban ábrázolják.

A 35 polimorfizmust adó primerből 19 faj- vagy hibridspecifikus 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. Az UNA és RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*), valamint KOR (*P. pyramidialis x P. deltoides*) klónokra specifikus fragmentumot további 4-4 primer adott.

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

RAPD analízis: A RAPD elemzések során első lépésben olyan primereket kerestünk, amelyekkel a két alapfajta (GK Góbé és GK Délibáb) elkülöníthető egymástól. A vizsgált 30 RAPD primerből 6 (AB09, NO11, OPH11, OPA16, OPQ14, OPX11) tette lehetővé a két alapfajta megkülönböztetését. A teljes mintaszámot az OPAB09, OPX11, OPA16 és NO11 primerekkel vizsgáltuk Egyedi különbségeket a fajták és a belőlük előállított DH vonalak csoportjain belül nem kaptunk. **SSR és STS analízis:** A tesztelt 12 SSR és STS primerpár közül 7 eredményezett különbségeket a GK Góbé és GK Délibáb fajták és azok DH vonalai között. Egyedi különbségeket egyedül a WMS186 mikroszatellit primerrel kaptunk a GK Délibáb fajta csoporton belül. **AFLP analízis:** 8 primer kombinációból 7 volt alkalmas különbségek kimutatására. A 7 primerkombinációval összesen 81 polimorf fragmentumot kaptunk. A szelektív AFLP primerpárra jutó polimorf sávok száma 4 és 20

között volt. Összesen 47 olyan markert találtunk, amelyek csak az egyik vagy a másik alapfajta (GK Góbé, DK Délibáb) minden egyedében voltak jelen. A GK Góbé és a GK Góbé DH csoport egyedei között 9 fragmentumban volt különbség. 23 fragmentum a csoportokon belüli egyedi különbségek azonosítását tette lehetővé. Az egyes csoportokon belül a polimorf sávok száma a következő volt: GK Góbé (hagyományos fajta): 4, GK Góbé DH vonal: 11, GK Délibáb (DH fajta): 12, GK Délibáb DH vonal: 3.

3.3. Ivari markerek azonosítása és vizsgálata kenderben

Három kenderfajta ivar szerint csoportosított mintáiban 21 RAPD primerrel történő vizsgálat során két hímivarhoz kapcsolt RAPD markert azonosítottunk. A két marker az egyedi minták analízisekor is konzekvensen jelentkezett minden hímivarú egyed PCR mintázatában és hiányzott a nőivarú és egylaki kender egyedekéből.

Az ivarhoz kapcsolt fragmentumokkal klónozás után Southern analízist végeztünk. Az OPD05 primerrel azonosított marker nem eredményezett különbségeket a két ivar Southern mintázatában. Ezzel ellentétben viszont az UBC354 primerrel azonosított hímivarhoz kapcsolt fragmentum különbségeket adott a két ivar hibridizációs mintázatában.

Szekvenálást követően az OPD05 primerrel kapott 961 bp fragmentumra 323 bp nagyságú, az UBC354 primerrel azonosított 151 bp nagyságú szekvenciára pedig 119 bp fragmentumot felszaporító szekveciaspecifikus SCAR primereket terveztünk. A két SCAR marker, valamint egy olasz kutatócsoport által tervezett hímivarhoz kapcsolt SCAR marker hasadási viszonyait F_2 nemzedékben vizsgáltuk. Két egyed kivételével minden esetben egyértelmű volt a kapcsolat a növények ivara és a hímivarhoz kapcsolt markerek között. A 3 marker között viszont egy esetben sem tapasztaltunk rekombinációt.

A szekvenciák adatbanki analízisekor 50-55 %-os homológiát találtunk más növényi eredetű retrotranszpozonszerű szekvenciákkal.

3.4. Új tudományos eredmények

Hazai nyár klónok molekuláris elemzése

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.

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.

Hagyományos és DH búzafajták összehasonlító molekuláris elemzése

3. 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.
4. 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.
5. A 3. és 4. pontban 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.
6. Bizonyítottuk, hogy a nagy hasonlóságot mutató DH vonalak és egyedeik molekuláris összehasonlító vizsgálatára elsősorban az AFLP és kisebb mértékben az SSR módszer alkalmas.

Ivarspecifikus molekuláris markerek azonosítása és vizsgálata kenderben

7. RAPD módszerrel két hímivarhoz szorosan kapcsolt – nemzetközileg is új - fragmentumot ($OPD05_{961}$ és UBC_{354}) azonosítottunk különböző kétlaki kender fajtákban. Bizonyítottuk, hogy ezek a markerek az egylaki kenderben (Fibrimon fajtában) nem mutathatók ki.
8. A két új markert klónoztuk és szekvenáltuk. A szekvenciáknak az eddig alkalmazott terminológia alapján a MADC3 ($OPD05_{961}$) és MADC4 ($UBC354_{151}$) nevet adtuk. A két új szekvencia 50-55 %-os homológiát mutatott különböző növényi eredetű retrotranszpozon-szerű szekvenciákkal.

9. A két új markerre szekvenciaspecifikus primereket terveztünk ($SCAR_{323}$ és $SCAR_{119}$) és bizonyítottuk, hogy ezek hatékonyan alkalmazhatók a kender növények ivarának meghatározására a tenyészidőtől függetlenül.
10. Hasadó F_2 populáció molekuláris vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a kontrollként felhasznált $SCAR_{390}$ és az általunk izolált két hímivarhoz kapcsolt szekvenciaspecifikus marker ($SCAR_{323}$ és $SCAR_{119}$) szorosan kapcsoltak egymással és az ivarral. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a MADC3 és MADC4 szekvenciák a kender Y kromoszómáján találhatók.

4. Következtetések és javaslatok

4.1. Nyár genotípusok RAPD és AP-PCR analízise

A DNS-ujjlenyomatot eredményező módszerek lehetővé teszik a populációk közötti és populációkon belüli variabilitás mértékének a becslését. A kiértékelés hasonlósági koefficiens alapján történik. A RAPD és AP-PCR mintázatok kiértékelésénél elsősorban a Jaccard index javasolt, mert a RAPD és AP-PCR módszer domináns markereket eredményez és ez az index nagyobb mértékben veszi figyelembe a domináns markereket, mint más hasonlósági koefficiensek. A SM koefficiens a Jaccard indextől abban tér el, hogy az a páronkénti összehasonlítások során azokat a fragmentumokat is figyelembe veszi, amelyek mindkét genotípusból vagy populációból hiányoznak.

Vizsgálatainkban 19 Magyarországon államilag elismert nyár genotípus vizsgálatát végeztük el - 40 mintázatot eredményező - primerrel (36 RAPD és 4 AP-PCR). A polimorfizmust eredményező primerek közül 18 mintázatát értékeltük. 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. 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.

A számítógépes analízissel kapott dendrogramon 4 fő klaszter különült el, amelyek a következő nyár klónok tartoztak: 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. 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 dendrogramokon kívül, a klónok közötti genetikai távolság jobb szemléltetése céljából a bináris adattáblázat alapján MDS analízist végeztünk. A kétdimenziós MDS ábrán az összes klón egymáshoz viszonyított genetikai távolsága jobban becsülhető, mint a dendrogramon, amelyen a klónok egy síkban helyezkednek el.

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

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. 10 primer eredményezett olyan fragmentumot (fragmentumokat), amelyek csak a VIF (*P. alba*) klónban voltak jelen. Az UNA és RAS (*P. trichocarpa x P. deltoides*), valamint KOR (*P. pyramidialis x P. deltoides*) klónokra specifikus fragmentumot 4-4 primer adott.

4.2. Búzafajták és dihaploid származékaik homogenitásának vizsgálata molekuláris módszerekkel

Kísérleteinkben a GK Góbé (hagyományos nemesítéssel előállított), GK Délibáb (androgenetikus eredetű) fajták, és a belőlük előállított DH vonalak véletlenszerűen kiválasztott egyedeit hasonlítottuk össze PCR-alapú módszerekkel. Vizsgálataink eredményei alapján, a felhasznált markerezési technikák közül a 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 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.

Az AFLP módszerrel kapott csoportokon belüli különbségek száma a következő volt: GK Góbé (hagyományos fajta): 4, GK Góbé DH vonal: 11, GK Délibáb (androgenetikus fajta): 12 és GK Délibáb DH vonal: 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. Ugyancsak nagyszámú különbséget kaptunk a Góbé fajtából előállított DH utódvonal egyedei között (11 fragmentum). Legnagyobb fokú homogenitást a GK Délibáb fajtából előállított DH utódvonalon belül kaptuk, ennek a csoportnak az egyedei 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. Szignifikáns különbségeket citológiai vizsgálatokkal sem sikerült kimutatni. Ezzel ellentétben molekuláris különbségeket tapasztaltunk a fajták és a belőlük előállított DH vonalak között és a DH vonalakon belül is. A különbségek mértékében azonban szignifikáns differencia nem volt kimutatható a hagyományos vagy a DH fajta és a belőlük előállított DH utódvonalak között.

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

A kender (*Cannabis sativa L.*, 2n = 20) ivari kromoszómákkal rendelkező növényfaj. Az utóbbi években elvégzett áramlásos citométeres mérésekkel 47 Mbp különbséget mutattak ki a nő- és hímivarú kender genommérete között. Ez a különbség a teljes genom 2,8 %-át teszi ki. A különbséget figyelembe véve és feltételezve, hogy a RAPD primerek a genomiális DNS-hez véletlenszerűen és egyenletes eloszlásban kapcsolódnak elméletileg a RAPD fragmentumok 2,8 %-ának kellene hogy hímivarhoz kapcsolt legyen. Vizsgálatainkban a tesztelt 21 primerrel 160 fragmentum amplifikálódott, amelyből 2 volt hímivarhoz kapcsolt és ez 1,25 %-nak felel meg. Ez a szám kisebb, mint az elméletileg

várt 2,8 %, ami azzal magyarázható, hogy a RAPD primerek nem teljesen véletlenszerűen és egyenletes eloszlásban szaporítanak fel fragmentumokat a genomon belül, továbbá az, hogy a növényi genom ismétlődő szekvenciákat tartalmaz, valamint a hím ás nőivarú szekvenciák között homológia lehet.

Az OPD05 primer egy 961, az UBC354 primer pedig egy 151 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. Kenderben a más kutatócsoportok által eddig azonosított hímivarhoz kapcsolt markerek ugyancsak hiányoztak az egylaki fajták PCR mintázataiban.

A kenderben eddig azonosított hímivarhoz kapcsolt szekvenciákat MADC1 és MADC2 névvel illették, amely a ”male-associated DNA sequence” rövidítésből származik. Ezt a terminológiát alkalmazva neveztük el mi is a két hímivarhoz kapcsolt szekvenciát: $OPD05_{961}$=MADC3, $UBC354_{151}$=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.

A bázissorend birtokában számítógépes szekvencianalízist végeztünk. Mindhárom szekvencia a 6 féle leolvasási keret szerint tartalmazhat kisebb-nagyobb nyílt leolvasási kereteket, amelyekről esetleg értelmes fehérjeszintézis lehetséges. 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 háromféle 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. Genomiális Southern analízissel eddig még csak spárgában és papajában mutattak ki különbséget a két ivar között. Kenderben egy olasz kutatócsoport nem, egy japán kutatócsoport pedig csak intenzitásbeli különbséget mutatott ki Souhern analízissel a két ivar között.

A MADC3 és MADC4 szekvenciák bázissorrendjeik alapján SCAR primereket terveztünk, amelyek megbízhatóbb detektálást tesznek lehetővé A $SCAR_{323}$ és $SCAR_{119}$ primerekkel első lépésben a KFF fajta egyedi DNS mintáit teszteltük és a várakozásnak megfelelően hatékonynak bizonyultak a nő és hímivarú egyedek elkülönítésében.

Az általunk azonosított és a MADC3 és MADC4 szekvenciákra tervezett $SCAR_{119}$ és $SCAR_{323}$ primerekkel, valamint a már korábbi irodalomból ismert hímivarra tervezett $SCAR_{390}$ primerrel később F_2 nemzedék 75 egyedét teszteltük, amelyben a fenotípus alapján meghatározott ivararány a következő volt: 41 ♀, 32 ♂ és 2 egylaki. A fenotípus és a három SCAR marker között 2 esetben találtunk eltérést. Egy esetben sem kaptunk viszont rekombinációt a 3 marker között, ami alapján arra lehet következtetni, hogy ezek a szekvenciák a genomon belül egymáshoz szorosan kapcsoltan helyezkednek el, vagy pedig olyan kromoszómarész tagjait képezik, amelyek nem rekombinálódnak.

5. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó saját és szerzőtárssal írt közlemények

Cikkek:

Kiss J., M. Kondrak, O. Törjék, E. Kiss, G. Gyulai, K. Mázik-Tőkei, L. E. Heszky (2001): Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. Euphytica, 118:213-221.

Törjék O., E. Kiss, J. Kiss, M. Kondrák, G. Gyulai, J. Gergácz and L. Heszky (2001): Evaluation of genetic diversity of poplar genotypes by RAPD and AP-PCR analysis. Acta Biologica Hungarica, 52:163-172.

Törjék O., E. Kiss, K. Mázik-Tőkei, G. Hutvágner, D. Silhavy, Zs. Bánfalvy, Z. Kertész, J. Pauk, and L. Heszky (2001): Comparative molecular analysis of winter wheat varieties and their DH analogs. Cereal Research Communication, 29: in press.

Törjék O., N. Bucherna, E. Kiss, H. Homoki, Z. Finta-Korpelová, I. Bócsa, I. Nagy, L.E. Heszky (2001): Molecular markers (RAPD, SCAR) for sex identification in Hemp (*Cannabis sativa* L.). Molecular Breeding, submitted.

Proceedings:

Törjék O., E. Kiss, K. Mázik-Tőkei, Gy. Hutvágner, D. Silhavy, Zs. Bánfalvi, Z. Kertész, J. Pauk, L. Heszky (2000): Búzafajták és DH analógjaik homogenitásának molekuláris vizsgálata. Az Agrobiodiverzitás Megőrzése és Hasznosítása, Budapest, Konferencia Kiadványa p. 407-414.

Kiss J., M. Kondrák, O. Törjék, E. Kiss, K. Mázik-Tőkei, L. Heszky (2000): Portokkultúrából regenerált Populus nigra növények morfológiai és molekuláris vizsgálata. Az Agrobiodiverzitás Megőrzése és Hasznosítása, Budapest, Konferencia Kiadványa p. 355-360.

Mázikné-Tőkei K., E. Kiss, Z. Kertész, J. Pauk, O. Törjék, L. Heszky (2000): Búzafajták és DH analógjaik homogenitásának citológiai vizsgálata. Az Agrobiodiverzitás Megőrzése és Hasznosítása, Budapest, Konferencia Kiadványa p. 415-420.

Előadások:

Törjék O., E. Kiss, N. Bucherna, H. Homoki, Zs. Finta-Korpelová, I. Bócsa, I. Nagy, L. Heszky (2001): Ivarspecifikus molekuláris markerek azonosítása és vizsgálata kétlaki és egylaki kenderben. VII. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA. Budapest, Összefoglalók p. 28.

Poszterek:

Törjék O., E. Kiss, G. Gyulai, Z. Kertész, J. Pauk, S. Bottka, L. Heszky (1997): RAPD and microsatellite analysis of conventional and doubled haploid whets. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Book of Abstracts MO 6115 46.

Kiss E., O. Törjék, G. Gyulai, Z. Kertész, J. Pauk, S. Bottka, L. Heszky (1997): Comparison of doubled haploid wheats by RAPD and SSR analysis. Eucarpia-Section Cereals meeting, Application of Marker Aided Selection in Cereal Breeding Programms, Austria/Tulln, Book of Abstracts p. 46.

Törjék O., E. Kiss, G. Gyulai, Z. Kertész, J. Pauk, S. Bottka, L. Heszky (1998): Búzafajták és dihaploid vonalainak összehasonlítása RAPD és SSR módszerrel. IV. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA. Budapest, Összefoglalók p. 132.

Heszky L.E., J. Kiss, J. Gergácz, K. Mázikné Tőkei, E. Kiss, O. Törjék (1998): In vitro androgenesis in poplar and analysis of plants regenerated in anthere culture. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Book of Abstracts 152.

Heszky L. E., J. Kiss, J. Gergácz, K. Mázikné Tőkei, E. Kiss, O. Törjék (1998): Morphological, cytological and RAPD analysis of poplar plant of anther culture rigin. Symposium zum Gedenken an die 100. Wiederkehr der Begründung der Gewebekultur

durch Gottlieb Haberlandt, Wien, Book of Abstracts 31, In Vitro Plant (1999): 35: 172-173.

Törjék O., E. Kiss, G. Gyulai, Z. Kertész, J. Pauk, S. Bottka, L. Heszky (1998): Comparison of doubled haploid wheat lines by RAPD and SSR analysis, 6. Tagung der AG Molekulare Marker, Köln.

Heszky L.E., J. Kiss, J. Gergácz, K. Mázikné Tőkei, E. Kiss, O. Törjék (1998): Molecular and morphological analysis of poplar plant of anther culture origin. XVIIIth International Congress of Genetics, Beijing, Book of Abstracts 8P43 144.

Törjék O., E. Kiss, Z. Kertész, G. Gyulai, J. Pauk, L. Heszky (1999): Hagyományos és DH búzafajták, valamint szekundér dihaploid származékaik homogenitásának vizsgálata RAPD és SSR Módszerekkel. V. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA. Budapest, Összefoglalók p. 113.

Kondrák M, J. Kiss, J. Gergácz, K. Mázikné, E. Kiss, O. Törjék, L. Heszky (1999): Pollen eredetű nyárfák molekuláris és morfológiai analízise. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, Összefoglalók PO68 180.

Törjék O., E. Kiss, Z. Kertész, J. Pauk, G. Gyulai, L. Heszky (1999): Hagyományos és portokkultúrával előállított búzafajták és dihaploid származékaik homogenitásának vizsgálata RAPD és SSR módszerekkel, IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, Összefoglalók PO35 149.

Törjék O., E. Kiss, Z. Kertész, J. Pauk, L. Heszky (2000): Homogeneity of wheat varieties and DH analogues. A Molecular Approach, Mendel Centenary Congress, Brno, Poster Abstracts PO131.

Mázikné-Tőkei K., O. Törjék, E. Kiss, Z, Kertész, J. Pauk, L. Heszky (2000): Búzafajták és DH analógjaik homogenitásának citológiai és molekuláris vizsgálata. VI. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA. Budapest, Összefoglalók PO36.

Törjék O., K. Mázik-Tőkei, E. Kiss, Z. Kertész, J. Pauk, L. Heszky (2000): Cytological and molecular analysis of DH wheat lines. 6th International Wheat Conference, Budapest, Book of Abstracts p. 224.

Kiss E., O. Törjék, N. Bucherna, H. Homoki, L. Heszky (2000): RAPD Markers for sex determination in hemp. 8. Tagung der AG Moleculare Marker, Kiel.

Törjék O., K. Mázik-Tőkei, E. Kiss, Z. Kertész, J. Pauk, L. Heszky (2000): Cytological and molecular analysis of DH wheat lines. 8. Tagung der AG Moleculare Marker, Kiel.

6.1. Egyéb saját és szerzőtársakkal írt közlemények

Cikkek:

Gyulai G., J. A. Gémesné, Zs. Sági, G. Venczel, P. Pintér, Z. Kristóf, O. Törjék, L. Heszky, S. Bottka, J. Kiss and L. Zatykó (2000): Doubled haploid development and PCR-analysis of F1 hybrid derived DH-R2 paprika (*Capsicum annuum L.*) lines. J Plant Physiol, 156:168-174.

Bayar K., O. Törjék, E. Kiss, G. Gyulai and L. Heszky (2001): Intra- and interspecific molecular polymorphism of thrips species. Acta Biologica Hungarica, in press.

Előadások:

Gyulai G., Zs. Mester, L. Purnhauser, M. Tar, J. Marticsek, O. Törjék, K. Hornok, L. Csősz, A. Mesterházy, S. Bottka, L. Heszky (1999): Az (ACTG)4 primerspecifikus SSR-PCR fragmentum mint az Lr-18 búzalevélrozsda (Puccinia recondita Roberge Ex Desmaz. f. sp. Tritici Eriks. & E. Henn) rezisztenciagén lehetséges markere. VII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Budapest, Összefoglalók p. 49.

Bayar K., O. Törjék, E. Kiss, G. Gyulai, L. Heszky (2001): Tripszfajok inter- és intraspecifikus variabilitásának vizsgálata RAPD-PCR módszerrel, Növényvédelmi Tudományos Napok, MTA. Budapest, Összefoglalók p. 47.

Poszterek:

Rady F., O. Törjék, G. Gyulai, E. Kiss, N. Bucherna, S.Rady, L. Heszky (1998): Gyökérszelektált kukorica vonalak és hibridjeik RAPD, SSR és RFLP elemzése. IV. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA. Budapest, Összefoglalók p. 116.

Gyulai G., L. Purnhauser, K. Hornok, S. Bottka, J. Marticsek, O. Törjék, A. Mesterházy, M. Cséplő, L. Csősz, M. Tar, L. Heszky (1999): A búzalevélrozsdarezisztencia molekuláris markerezése. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, Összefoglalók PO34 148.