Szent István Egyetem
Gödöllő
Növénytudományi Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Dr. Heszky László
Növénynemesítés genetikai és biotechnológiai módszerekkel

Programvezető: Dr. Heszky László

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ALMAFAJTÁK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE ÉS REZISZTENCIAGÉN ANALÓGOK AZONOSÍTÁSA

Wichmann Barnabás

Gödöllő
2010

Doktori iskola: Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Heszky László,
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

Tudományág: Növénytermesztés, kertészet tudományok

Doktori Program: Növénygenetika és biotechnológia

Vezetője: Dr. Heszky László,
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

Témavezetők: Dr. Galli Zsolt,
tudományos munkatárs, PhD, Syngenta Seeds Kft, Ócsa

Dr. Heszky László,
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

…… ……
Dr. Galli Zsolt
témavezető

Dr. Heszky László
témavezető

……
Dr. Heszky László
doktori iskola vezetője

A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLJAI

Az alma az egyik legszélesebb körben termesztett gyümölcsféle a világon. 2009-ben 4,957 millió hektáron összesen 71,7 millió tonna almát termeltek. Kína járt az élen a saját több mint 2 millió hektárjával és több mint 31 millió tonnányi termés mennyiséggel (FAOSTAT). Európa almatermése megközelítőleg 16 millió tonna volt, 1,25 millió hektáron. Magyarországon 2009-ben 36644 hektáron termesztettek almát, az össztermés pedig 575368 tonna volt. Az adatok alapján ezzel a mennyiséggel Európában a 7. almatermesztő ország vagyunk, megelőzve többek között Spanyolországot, Romániát és Ausztriát (FAOSTAT 2010). Hazánkban csak a szőlő termőterülete előzi meg az almáét, azonban a termésmennyiség tekintetében, 25 ezer tonnával megelőzi a szőlő 550 ezer tonnás 2009-es évi hozamát. Az elmúlt évben, a hazánkban termelt 894 ezer tonna gyümölcsnek (szőlő nélkül) több mint 60%-át tette ki az alma (FAOSTAT 2010).

Földrajzi szempontból legelfogadottabban Kazahsztánt, és ezen belül is az Alma Ata-t (Almák atyja) jelölik meg géncentrumként. A korábbi irodalom azonban sok más régiót is megjelöl. Vannak, akik Nyugat-Ázsiát, Közép-Ázsiát, a Közel-keletet vagy Szibériát tartják az alma géncentrumának. Az európai fajták létrejöttében elsősorban a paradicsomi alma (*Malus paradisiaca*), az európai vadalma (*M. sylvestris*), az erdélyi vadalma (*M. dasyphylla*), a kaukázusi alma (*M. orientalis*) és a korai vadalma (*M. praecox*) játszhatott szerepet. Az ázsiai almafajtáknak más őseik vannak (pl. *M. prunifolia, M. baccata*). Az almafajtákat nagymértékű heterozigótaság és jelentős genetikai variabilitás jellemzi.

Mivel az alma az egyik legfontosabb termesztett gyümölcs, termesztésével kapcsolatos problémáinak megoldása elsőrendű feladat. Kutatásaink fő területei az almatermesztés nehézségeinek növénynemesítési megoldásaival kapcsolatosak. Munkánk során három fő problémakörrel foglalkozunk, melyeket külön-külön mutatunk be.

1.) REZISZTENCIAGÉNEKKEL KAPCSOLT MARKEREK

A gyümölcstermesztésben, napjainkban a különböző kórokozók és kártevők jelentős termésveszteséget okozhatnak. A vegyszeres növényvédelem fontos és bizonyos esetekben elengedhetetlen, azonban egyre inkább megfogalmazódik az igény, a környezet vegyszerterhelésének mérséklését biztosító, illetve az emberi egészséget nem veszélyeztető

technológiák nagyobb arányú bevezetése iránt. Ezekben a törekvésekben kiemelt szerephez jut a rezisztencianemesítés, melynek célja a betegségeknek és kórokozóknak ellenálló, rezisztens fajták előállítása.

Az almanemesítés fontos célkitűzései közé tartoznak az öntermékenyülés, az ökotolerancia, a termőképesség, a termésbiztonság, a szállíthatóság, a tárolhatóság és a gyümölcsminőség javítása mellett számos betegséggel szembeni ellenállóság kialakítása. Ez utóbbinak fő célkitűzései közé tartozik a két legjelentősebb gombabetegséggel, a lisztharmattal (*Podosphaera leucotricha*) és a varasodással (*Venturia inaequalis*), valamint a bakteriális tűzelhalással (*Erwinia amylovora*) szembeni rezisztencia kialakítása az új fajtákban. Ezt a célt szolgálják a legújabb molekuláris stratégiák, mint például a rezisztencia gén analóg (RGA) kapcsolt markerek kifejlesztése és alkalmazása.

A különböző növények patogénekkel szembeni rezisztencia génjei nagyfokú strukturális konzervativizmust mutatnak, ezek az ún. NBS (Nucleotide-Binding Site), vagy az LRR (Leucine-Rich Repeat) szekvenciák. Az ilyen típusú szekvenciákra tervezett primerek lehetőséget adnak a rezisztencia génekhez kapcsolt markerek azonosítására az alma genomban.

A fentiek és a kapcsolódó irodalmi eredmények alapján célszerűnek tűnt a rezisztenciagénekkel szorosan kapcsolt markerek azonosítása és tesztelése, a rezisztenciagén(ek) jelenlétének, illetve hiányának pontos és megbízható kimutatására, az általunk vizsgált genotípusokon (gyűjteményben).

2.) MAGYAR ALMA GÉNBANK GENOTÍPUSAINAK ÉS KERESKEDELMI FAJTÁK MOLEKULÁRIS UJJLENYOMATA

Az almafajták egyre növekvő száma (több mint 15 ezer fajta a világon) megköveteli az egyes genotípusok egyértelmű és pontos azonosíthatóságát és elkülöníthetőségét más klónoktól, fajtáktól, stb. Az e célra felhasználható markerek két nagy csoportját a morfológiai, valamint a napjainkban már egyre elterjedtebben alkalmazott molekuláris markerek jelentik. A morfológiai markerek fenotípusosan megjelenő, öröklődő tulajdonságok gyakran nem elég informatívak, és megbízhatóságukat a környezet jelentősen befolyásolhatja. A molekuláris

markerek nagy előnye, hogy megjelenésüket sem környezeti, sem episztatikus hatások nem befolyásolják, számuk korlátlan, mivel elvileg a genom valamennyi allélformája és azok kombinációi alkalmasak az azonosításra.

A fentiek és a kapcsolódó irodalmi eredmények alapján célszerűnek tűnt olyan módszer kidolgozása, illetve fejlesztése, mely alkalmas „molekuláris ujjlenyomat” készítésére az általunk vizsgált minden egyes fajtára, továbbá felhasználásával azok származása (pedigréje) meghatározható.

3.) RÜGYMUTÁNSOK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE

Új fajták kiinduló alapanyagai rügymutációk is lehetnek. Ezek a mutációk olyan fenotípusos változásokat eredményezhetnek, mint a gyümölcs színe vagy alakja, a fa mérete és alakja, elágazási hajlam, stb. A rügymutánsok az alapfajta klónjainak tekinthetők, melyek csak egy, vagy néhány gén mutáns allél változatában különböznek az alapfajtától, illetve egymástól.

A fentiek és a kapcsolódó irodalmi eredmények alapján célszerűnek tűnt olyan molekuláris markerek és technikák keresése és tesztelése melyekkel sikeresen lehetne a rügymutánsok között meglévő csekély genetikai különbséget detektálni. Ennek érdekében AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) és SSR (Simple Sequence Repeats) markereket, valamint egy új S–SAP (Sequence–Specific Amplified Polymorphism) technikát is bevontunk vizsgálatainkba. A rügymutációkban gyakran retrotranszpozon jelenlétét mutatták ki. Az S-SAP megközelítésünk lényege, hogy a retrotranszpozonokat határoló DNS szekvenciák közötti polimorfizmus kimutatása esetleg lehetőséget ad a fajtakörök egyes klónjainak molekuláris elkülönítésére.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A két legjelentősebb gombabetegséggel, a liszthartmattal (*Podosphaera leucotricha*) és a varasodással (*Venturia inaequalis*) valamint a bakteriális tűzelhalással (*Erwinia amylovora*) kapcsolt rezisztencia gén analóg markerek azonosítása, tesztelése, melyek alkalmasak a rezisztencia gén(ek) jelenlétének, illetve hiányának kimutatására.
2. Olyan SSR primerek keresése volt a célunk, melyek alkalmasak a hazai alma génbankban fenntartott genotípusok (40 fajta, tájfajta) „molekuláris ujjlenyomatának" elkészítésére, azonosítására. A hazai gyűjtemény 37 tételének az európai standard sorozat 9 primer-párjával és az általunk alkalmazott 6 primer-párral való dendrogramok összehasonlítása, különös tekintettel a rokonsági fokára.
3. Olyan molekuláris markerek és technikák keresése és tesztelése volt, melyekkel sikeresen lehet a rügymutáció jelenlétét, helyét detektálni a genomban, illetve a rügymutánsokat elkülöníteni egymástól.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatok növényanyaga:

A kísérletekben vizsgált alma fajták, tájfajták, rügymutánsok DNS izolálásához a levélmintákat a magyar alma génbank gyűjteményben (Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft újfehértói állomásán) gyűjtöttük. Mivel kísérleteink három fő területet érintettek, a növényanyag megválasztása is eltérő volt.

- Rezisztencia génekkel kapcsolt markerek (3 rezisztens, illetve 4 fogékony fajta)
- Magyar alma génbank genotípusainak és kereskedelmi fajták molekuláris ujjlenyomata (40 tájfajta és 66 kereskedelmi fajta)
- Rügymutánsok molekuláris elkülönítése (3 fajtakör, illetve 3 rügymutáns csoport 26 rügymutánsa)

A vizsgálatok módszere:

DNS izolálás a növénymintákból: A DNS izolálást a QIAGEN cég DNeasy kit-jének felhasználásával végeztük.

A DNS izolálást követően az egyes megközelítések eltértek, melyeket külön tárgyalunk:

REZISZTENCIAGÉNEKKEL KAPCSOLT MARKEREK

Degenerált primerek tervezése

Az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisból összegyűjtöttük 10 különböző növényfajból izolált rezisztenciagén szekvenciáit. Az aminosav és nukleotid szekvenciákat a BioEdit (verzió: 7.0.5.3) (Hall *et al.* 1999) számítógépes programban összerendeztük. Kiválasztottuk a legkonzerváltabb régiókat, amelyek az összes növényfajon belül kis eltéréseket mutattak az aminosav szekvenciáikban, és degenerált primereket terveztünk a nukleotid szekvenciák alapján. A tervezett oligonukleotidokat a Csertex és a BioScience Kft. készítette el.

PCR reakció degenerált primerekkel

A PCR (Polymerase Chain Reaction) reakciókat Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékekben végeztük 20 µl végtérfogatban. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 40 ng templát DNS; 1 x reakció puffer; 3 µl dNTP (100mM törzs); 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs); 0,75-0,75 µl forward ill. reverse primer (10 µM törzs); 1,2 unit Taq DNS polimeráz (AgBiotech). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os elődenaturálás után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 59°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C–on történő végső polimerizációval zárult.

A fragmentumok klónozása plazmid vektorba

A degenerált primerekkel végzett PCR reakció termékeinek plazmid vektorba történő klónozásához a Promega cég PGEM T-easy vektor rendszerét használtuk fel. A fragmentumok vektorba történő ligálásához a következő komponenseket mértük össze egy mintához: 2 µl PCR termék, 1 µl T-easy vector, 5 µl puffer, 1 µl T4 DNS ligáz, 1 µl ligáz puffer. A keveréket egy éjszakán át 16°C-on inkubáltuk.

Kompetens sejtek transzformálása

Kompetens sejtek transzformálásához -70°C-on tárolt QIAGEN EZ kompetens sejteket használtuk fel: 200 µl kompetens sejthez 1,5 µl ligátumot adtunk. Egy órás jégen történő inkubáció után hősokkot alkalmaztunk (másfél perc, 42°C), majd a mintákhoz 800 µl SOC (Hanahan 1983) 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, ampicillint (50 µg/ml) és szelekciós markert (10 µl X-gal (50 mg/ml); 40 µl (0,1M IPTG) tartalmazó LB táptalajra szélesztettük a kék-fehér szelekció kihasználására.

A rekombináns baktériumok tesztelése – kolónia PCR

A szelektív táptalajon kinövő fehér kolóniákból steril fogpiszkálóval kivettünk egy kis részt, és 50 µl steril vízben szuszpendáltuk a baktériumsejteket. Öt percre forrásban lévő vízbe helyeztük az eppendorf csöveket, majd egy perces centrifugálást végeztük. A felülúszó vizes fázisából 4 µl mennyiséget használtunk templátként a PCR reakció során. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 4 µl felülúszó; 1 x reakció puffer; 3 µl dNTP (100mM törzs); 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs); 0,75-0,75 µl a szaporításhoz alkalmazott degenerált primerekből (10 µM törzs); 1,2 unit Taq DNS polimeráz (AgBiotech). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 62°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C–on történő utó polimerizációval zárult.

Plazmid izolálás

A kolónia PCR-rel pozitívnak bizonyuló mintákból plazmidot a BioRad cég Plasmid Miniprep kit-jének felhasználásával izoláltuk. A pontos DNS koncentrációt NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg, és a szekvenáláshoz 100 ng/µl koncentrációt állítottunk be, melyből 5 µl (500 ng) került felvitelre a kapilláris gélelektroforézis készülékben.

Szekvenálás és a szekvenciák kiértékelése

A szekvenálási reakciókat az MBK (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) szekvenáló laborja végezte, ABI Prism 310 (Applied Biosystems) készülékkel, a felszaporításhoz használt degenerált primerek felhasználásával. A kromatogramokat a Chromas (verzió: 2.31) számítógépes programmal értékeltük, eltávolítottuk a szekvenciák elejéről és végéről a plazmid régiókat. A kapott nyers szekvenciákkal BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analízist végeztünk az NCBI honlapján rendelkezésre álló programot alkalmazva.

SCAR markerek tervezése és tesztelésük

A kapott fragmentumok egyedi felszaporítására SCAR (Sequence Characterised Amplified Region) markereket a Primer 3 programcsomag segítségével terveztünk. A primerek szintézisét követően PCR reakciót indítottunk a SCAR primerekkel. A PCR reakciók csak a felhasznált primerekben tértek el a korábban már ismertetett kolónia PCR-től.

MAGYAR ALMA GÉNBANK GENOTÍPUSAINAK ÉS KERESKEDELMI FAJTÁK MOLEKULÁRIS UJJLENYOMATA

Mikroszatellit analízis:

A PCR reakciókat Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékekben végeztük 20 µl végtérfogatban. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 40 ng templát DNS; 1 x reakció puffer; 3 µl dNTP (100mM törzs); 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs); 0,75-0,75 µl forward ill. reverse SSR primer (10 µM törzs); 1,2 unit Red-Taq DNS polimeráz (Sigma). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 57°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utó polimerizációval zárult. A mikroszatellit elemzést Galli *et al.* (2005) és Garkava-Gustavsson *et al.* (2008) alapján végeztük.

A vizsgálathoz használt mikroszatellit markerek:

A mikroszatellit elemzés során alkalmazott fluorescensen jelölt primerek a következők voltak: CH03g07, CH04g10, CH04e03, CH05c02, CH05d11, CH05e03, CH01d03, CH01h02, CH02c06, CH02c09, CH02c11, CH02d08, CH04c06, CH04e05, COL (Liebhard *et al.* 2002).

ALF-Automata Lézer Fluorométer elemzések:

A PCR termékeket 5%-os denaturáló poliakrilamid gélen (Reprogel, GE Healthcare Biosciences, AP Hungary Kft., Budapest) választottuk el. Az alléméreteket ALFexpress II DNS analizátorral (Amersham Biosciences, AP Hungary Kft., Budapest) határoztuk meg ALFexpress™ sizer molekulatömeg standard alkalmazásával.

Allélméret adatok kiértékelése:

A klaszter analízishez minden detektálható allél jelenlétét (1), illetve hiányát (0) binárisan kódoltuk az összes fajta esetében. Ez egy 40 X 71-es, és egy 37 X 87-es bináris mátrixot eredményezett tájfajták esetében.

A kereskedelmi fajtákkal történő összehasonlításkor 105 X 78-as bináris mátrixot alkalmaztunk az azonosságok felderítéséhez, mivel az összes korábban kereskedelmi fajtákban leírt allél (Galli *et al.* 2005) megtalálható volt a tájfajtákban, valamint a tájfajták számos egyéb allél hordozói is voltak. A két alkalmazott marker sorozat egyidejű vizsgálatakor 37 X 158-as, valamint a rügymutánsoknál használt 8-as SSR sorozat esetén, 27 X 107-es bináris mátrixot alkalmaztunk. A dendrogramok elkészítéséhez az SPSS 16.0 számítógépes programcsomagot (SPSS Inc., USA) alkalmaztuk, az UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Means) módszert, és a Jaccard indexet használva (Jaccard 1908).

A vizsgált mikroszatellit allélok gyakorisága alapján meghatároztuk az egyes allélok, PIC értékét (Polymorphism Information Content – heterozigozitás index) az alábbi formula segítségével: $PIC=1-\sum pi^2$, ahol ‘pi’ az i-edik allél gyakoriságát jelöli (Anderson *et al.* 1993).
A fajták azonosításhoz minimálisan szükséges markerek számának és kombinációjának meghatározásához, összesen 40 különböző tájfajta (N=40) genetikai ujjlenyomatát készítettük el. A megegyezőségi valósínűséget (PI – Probability of Identity), a megfigyelt SSR primerek esetében, két találomra választott almafajtára, Tessier *et al.* (1999) képlete alapján számoltuk:

$$PI = \prod_{j=1}^{j} C_j \quad .$$

RÜGYMUTÁNSOK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE:

Mikroszatellit elemzés:

Az elemzéshez az Európai standard sorozat 9 SSR markerét alkalmaztuk. A PCR reakció és az allémintázatok kiértékelése a „Magyar alma génbank genotípusainak és kereskedelmi fajták molekuláris ujjlenyomata” cím alatt ismertetettekkel megegyeznek.

AFLP technika:

Az AFLP technika egy bázispárnyi különbség detektálását is lehetővé teszi. A felbontás növelése érdekében hasító enzimeket (adapterek: *EcoRI 33, EcoRI 36, EcoRI 37, EcoRI 44, MseI 48, MseI 55, MseI 60, MseI 61*) használtunk. A detektálást poliakrilamid gélen végeztük.

S-SAP technika:

Összesen három 'Ret-LTR' primert terveztünk (Ret-LTR1: 5' – AAA TGG AGT GAC AGA CGG GT – 3', Ret-LTR2: 5' – GGA GGG TTT TGA GGG ATG TG – 3', Ret-LTR3: 5' – CCT TCG GGA TGG GGT GTG TC – 3') az almában napjainkig azonosított retrotranszpozonok (génbanki számaik: AJ291492, DQ898280, AM167520) LTR (Long Terminal Repeat) régióira. A primerek Cy-5 jelölést kaptak, és ezeket alkalmaztuk az S-SAP vizsgálatainkban egy AFLP primerrel kombinációban. Az első PCR reakció termékét használtuk a szelektív amplifikációhoz, amihez kombinációban egy jelölt Ret-LTR primert és egy adapter specifikus primert alkalmaztunk, mely utóbbi, három szelektív nukleotidot tartalmazott a 3' végén (Mse-48: 5' – ~ CAC – 3' vagy Mse-55: 5' – ~ CGA – 3' vagy Mse-60: 5' – ~ CTC – 3' vagy Mse-61: 5' – ~ CTG – 3' vagy Eco-33: 5' – ~AAG – 3' vagy Eco-36: 5' – ~ACC – 3' vagy Eco-37: 5' – ~ACG – 3' vagy Eco-44: 5' – ~ATC – 3').

EREDMÉNYEK

REZISZTENCIAGÉNEKKEL KAPCSOLT MARKEREK

Az alkalmazott molekuláris megközelítés: NCBI adatbázis bioinformatikai elemzése, degenerált primerek tervezése és PCR reakció degenerált primerekkel. A fragmentumok klónozása plazmid vektorba, kompetens sejtek transzformálása. A rekombináns baktériumok tesztelése kolónia PCR-rel. Plazmid izolálás, szekvenálás és a szekvenciák kiértékelése és SCAR markerek tervezése, tesztelése.

Olyan szekvenciákat kerestünk, melyek a különböző növényfajok esetében azonosak, vagy legalábbis nagyfokú homológiát mutatnak. Az NCBI génbankban szereplő különböző növényi rezisztencia gének szekvenciáiban ezért konzervált régiókat kerestünk, melyekre degenerált primereket terveztünk. Bioedit szoftver alkalmazásával összerendeztük a különböző növényfajokban meglévő konzervált régiókat.

Ezekkel, a primerekkel, mind a TIR–NBS–LRR, mind a CC–NBS–LRR típusú rezisztenciagénekből fragmentumokat lehet felszaporítani. A primerek tervezését követően PCR reakciókat indítottunk rezisztens, illetve fogékony genotípusokból izolált DNS–t alkalmazva templátként. Mivel közismert, hogy a növényi genomban akár több száz ilyen típusú szekvencia is létezhet, arra számítottunk, hogy esetleg sikerül olyan fragmentumokat kapnunk, amelyek csak a rezisztens genotípusban jelennek meg. Sajnos azonban ezt a méretbeli különbséget nem sikerült kimutatnunk. Nagy kópiaszámú, azonos méretű fragmentumokat kaptunk a betegségekre leginkább rezisztens és fogékony genotípusokban egyaránt.

Ezt követően a TIR1–F és P–loop–R degenerált primerekkel felszaporított alma DNS fragmentumokat pGEM T-easy vektorba klónoztuk. A ligáláshoz közvetlenül a PCR terméket használtuk abból a célból, hogy lehetőleg az összes azonos méretű, de szekvenciális különbségeket, hordozó fragmentumot sikerüljön klónoznunk. A szelektív táptalajon kinövő fehér kolóniákból, minden egyes fajta esetében, ún. „masterplate”-et készítettünk, amely segítségével minden kolóniának külön számot adtunk.

Néhány kolónia a kezdeti fehérség ellenére később bekékült az X–gal–t, IPTG–t és ampicillint tartalmazó táptalajon, ezekkel a későbbiekben nem foglalkoztunk. Néhány nap után is fehéren maradt mintákból kolónia PCR-t indítottunk ugyanazokkal a degenerált primerekkel (TIR1–F és P–loop–R), melyekkel a fragmentumok felszaporítását is végeztük. Ezzel a megközelítéssel, már az egyedi klónozott szekvenciákat tudtuk felszaporítani.

A kolónia PCR–rel pozitívnak bizonyuló 12 kolóniából folyékony LB tenyészetet indítottunk, majd nagy tisztaságú plazmid DNS–t izoláltunk. A fragmentumok szekvenálása az SP6 és T7 univerzális primerekkel történt. A nukleotid szekvenciákat Bioedit szoftverrel aminosav szekvenciává konvertáltuk, s aminosav szinten vizsgáltuk az egyezőségeket, más RGA jelöltekkel. Az NCBI honlapján lévő BLAST alkalmazással olyan fehérjékhez hasonlítottuk aminosav szekvenciáinkat, melyek feltételezhetően vagy már bizonyítottan, különböző rezisztenciákban fontos szerepet betöltő szekvenciák, szakaszok.

Az értékelés során kiderült, hogy RGA jelöltjeink közül 5 (NCBI azonosító: EF455013-EF455017) nem tartalmaz olyan szekvencia motívumokat, melyek eddigi publikált adatok szerint a rezisztencia kialakulásáért felelősek. Ezek a motívumok minden rezisztencia gén, RGA jelölt esetében szerepelnek. További 9 RGA jelölt esetében azonban bizonyítottuk, hogy a rezisztenciáért felelős motívumok (P-loop, RNSB-A, Kináz-2, RNSB-B, RNSB-C, GLPL) szekvenciái jelen vannak, és aminosav szinten nagyfokú homológiát mutatnak korábban leközölt RGA szekvenciákkal.

Annak érdekében, hogy azonosítani tudjuk a markereinkkel megjelölt rezisztenciagéneket, azokat SCAR markerekké konvertáltuk. A 9 SCAR marker alkalmazásakor azonban – egy genotípus kivételével - minden fajtában (rezisztens, fogékony, alany) azonos méretű fragmentum szaporodott fel. Mivel a növényi genom akár több száz, az általunk tesztelt konzervált régiókkal rendelkező szekvenciát tartalmazhat, elképzelhető hogy egy általános növényi rezisztenciáért felelős fragmentumot sikerült izolálnunk, ami minden almafajtában megtalálható.

Kizárólag az Arga-4-es primer alkalmazása esetén kaptunk egy fragmentum hiányában különbséget. A ’Remo’ fajta esetében egy fragmentum sem szaporodott fel. Mivel a többi rezisztens fajtában ez a marker minden esetben felszaporított fragmentumot, az eredményből arra is következtettünk, hogy a ‘Remo’ fajtában a primer kapcsolódási helyén mutáció

következhetett be, ami megakadályozta azt, hogy az Arga-4 SCAR marker fragmentumot szaporítson fel. A további vizsgálatokat éppen ezért indokoltnak tartjuk.

MAGYAR ALMA GÉNBANK GENOTÍPUSAINAK ÉS KERESKEDELMI FAJTÁK MOLEKULÁRIS UJJLENYOMATA

Az alkalmazott molekuláris megközelítés: SSR primerek kiválasztása és PCR reakció indítása, allélméretek meghatározása poliakrilamid gélen, statisztikai értékelések és dendrogramok készítése.

Az alma génbank tételek vizsgálata során 6 SSR primer-párral sikerült megbízható és ismételhető mikroszatellit alléleket felszaporítanunk a vizsgált 40 genotípus (fajta, tájfajta, klón) esetében. Az eltérő allélmintázatok alkalmasnak bizonyultak a fajták megkülönböztetésére. Összesen 71 polimorf allélt detektáltunk (átlag 11,8 allél / lókusz), és a markerek átlagos PIC értéke is igen nagynak (0,8) bizonyult. Az ismételt PCR reakciók és futtatások allélméretei minden esetben megegyeztek. Ezeket az értékeket korábbi SSR marker vizsgálatok eredményeivel (Galli *et al.* 2005) is összevetettük, s megállapítottuk, hogy a kereskedelmi fajták átlagos PIC értékei nem voltak nagyobbak, mint a vizsgált fajtáink esetében kapott eredmények.

Annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott fajta allélmintázata mind a 6 lókusz esetében megegyezzen (PI: Probability of Identity) $2{,}53 \times 10^{-5}$ –nek adódott, ami 1:39525 aránynak felel meg. Végeredményben a molekuláris ujjlenyomat rendkívül megbízható azonosítást tesz lehetővé.

Az alma génbank tételek vizsgálati eredményeit összehasonlítottuk 66 kereskedelmi fajtán kapott molekuláris adatokkal (Galli *et al.* 2005). A kereskedelmi fajták esetében a PIC értékek igen magasak voltak, különösen a CH04e03, CH05d11 markerek alkalmazásakor, azonban a PIC értékek alapján a tájfajták jobban elkülöníthetőek egymástól (átlagos PIC: 0,8), mint a kereskedelmi fajták (átlagos PIC: 0,72). Az összehasonlításból az is kiderült, hogy számos tájfajta nagyobb hasonlóságot mutat a vizsgált kereskedelmi fajtákkal. A PIC eredmények összehasonlításából az is kitűnik, hogy a kereskedelmi fajták ősei – feltehetően – egy sokkal szűkebb nemesített növényanyagból kerültek ki, hiszen átlagos PIC értékeik kisebb értéket mutattak.

Következő lépésben az „Európai Alma Munkacsoport” által elfogadott marker sorozatot teszteltük tájfajtáinkon. SSR primer párok segítségével összesen 84 polimorf allélt sikerült felszaporítanunk 37 tájfajta esetében. A legkevesebb allél (4) a CH04c06, míg a legtöbb (15) a CH02c06 lókuszban amplifikálódott. A primerenkénti átlagos allélszám 10,5 volt. Két marker, a CH01h02 és a CH0406 két lókuszosnak bizonyult, tehát több helyen szaporodott fel értékelhető allélméret. Elkülönítési szempontból mindkét esetben az L1-es (1-es lókusz) rontotta le az átlagos PIC értékeket.

Tájfajták esetében elvégzett kísérleteinkhez alkalmazott CH05d11 (0,86) és CH05e03 (0,84) markerek, az európai munkacsoport által alkalmazott primerek értékeihez képest is magas PIC értékűnek bizonyultak. Véleményünk szerint érdemes volna a több lókuszos markereket (CH01h02, CH04c06) a kísérleteinkben alkalmasabbnak bizonyuló CH05d11 és CH05e03 markerekkel kicserélni a standard sorozatban, mely növelné a sorozat alkalmasságát (0,78-ról 0,84-re változtatná az átlagos PIC értéket tájfajták esetében).

A két marker sorozat dendrogramjának összevetése során az ’Újvári őszi alma’ és a ’Nyári fontos alma’ nagyfokú hasonlóságot mutatott. A többi fajta esetében, azonban igen jelentős eltéréseket tapasztaltunk. A két különböző sorozattal végzett elemzés eredményei nem átfedők, az eredmények között csak a kiemelkedően nagy homológia esetében sikerült az azonosságot detektálnunk. A két sorozat eltérő eredményei miatt a technika nem tekinthető alkalmas módszernek a fajták közötti rokoni kapcsolatok megállítására, azonban, mint ahogy az eredmények is mutatják, a fajták azonosítására és elkülönítésére kifejezetten alkalmas az SSR technika.

A Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis (Hungarian Apple Microsatellite Database) létrehozásában és bővítésében tevékenyen részt vettünk. A mért adatokat és eredményeket az adatbázisban is feltűntettük. Mivel nyílt adatbázisról van szó, az adatokhoz bárki hozzáférhet. Nemesítők, minősítő és almafajták szaporításával foglalkozó intézetek számára hasznos lehet az almafajták pontos beazonosíthatósága végett, mellyel az elvégzett munkájukat könnyebbé és ellenőrizhetőbbé tehetjük, hiszen a felhasználandó fajták, tájfajták beazonosíthatók a marker sorozattal.

RÜGYMUTÁNSOK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE

Az alkalmazott molekuláris megközelítés: SSR, AFLP és S-SAP technikák.

A fajták ujjlenyomat vizsgálatainak eredményei bizonyították a különböző alma genotípusok megbízható elkülöníthetőségét mikroszatellit markerekkel. Erre az eredményünkre alapozva megpróbáltuk a rügymutásokat is molekulárisan elkülöníteni, a már ismertetett SSR markerekkel. Miután a 6 tagú SSR marker sorozat alkalmatlannak bizonyult erre a célra (Galli *et al.* 2005), az új európai SSR sorozat (9 SSR marker) alkalmazásával próbálkoztunk. Azonban a rügymutáns csoportokon belül még egy bázispárnyi különbséget sem sikerült detektálni a nagyfelbontású ALF express II készülékkel sem.

Ezt követően próbálkoztunk az AFLP technikával, ami akár egy bázispárnyi különbség kimutatását is lehetővé teszi. Különböző hasító enzimeket (adapterek: *EcoRI 33, EcoRI 36, EcoRI 37, EcoRI 44, MseI 48, MseI 55, MseI 60, MseI 61*) használtunk a felbontás növelése érdekében. Némely esetben olyan fragmentumok is megjelentek egyes rügymutánsok esetében, melyek a többi rügymutánsban hiányoztak. Azonban a polimorf AFLP fragmentumokból átkonvertált SCAR markerek nem bizonyultak alkalmasnak a rügymutánsok elkülönítésére, a velük kimutatható különbségek egyedieknek, és nem genotípus-specifikusnak bizonyultak. Ezáltal viszont nem a rügymutánsok, hanem az egyedi különbségek mutathatóak ki, mely nem szerepelt céljaink között. Végeredményben az AFLP technika alkalmazásával sem tudtunk a rügymutánsok között polimorfizmust detektálni.

Miután sem az SSR, sem az AFLP technikával sem sikerült eredményt elérnünk, az S-SAP technikával próbálkoztunk. Az S-SAP módszer kifejlesztésével lehetővé vált, hogy a retrotranszpozonok genomon belüli – maguknak a kedvező jellegekkel bíró rügymutánsoknak a kialakulásához vezető – áthelyeződéseiből származó polimorfizmusokat lehessen detektálni. Ez a technológia kombinálja az AFLP technika felbontó képességét egy kiválasztott primer szekvencia specificitásával (ebben az esetben LTR szekvenciák a célzott elemek a genomban).

Összesen 24 primer kombináció (3 Ret-LTR 8 adapter specifikus primer) termékét elemeztük és értékeltük a rügymutánsok elkülönítése során. A különböző primer kombinációkkal végzett reakciók 11-71 fragmentumot szaporítottak fel, ami azt jelzi, hogy a vizsgált retrotranszpozonok száma az alma genomjában meglehetősen nagy. Összesen 4368

fragmentumot sikerült felszaporítanunk. Az Ret-LTR3 + EcoRI-33 primer kombináció adta a legmagasabb, Ret-LTR2 + MseI-55 primer kombináció pedig a legalacsonyabb fragmentum számot mind a 6 rügymutáns csoport esetében. Mindössze egyetlen egy kombinációval (Eco-33 és Ret-LTR1) sikerült polimorfizmust detektálnunk, mellyel a 'Jonathan' alapfajta vált megkülönböztethetővé a rügymutánsaitól. Az összes többi esetben a genotípusok egymástól elkülöníthetetlenek maradtak, még egyedi szintű polimorfizmust sem tudtunk kimutatni.

A vizsgált rügymutáns csoportok esetében a 'Jonathan' fajtakörön kívül nem sikerült eltérést detektálnunk 3 molekuláris technika alkalmazásával sem. A 'Jonathan' fajtakörön belül is csak az alapfajtát sikerült elkülönítenünk a csoport többi rügymutánsától, egy plusz fragmentum szaporodott fel az alapfajtában, mely hiányzott az összes rügymutánsban. A jövőben célszerűnek látszik a fragmentumot SCAR markerré konvertálni.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

REZISZTENCIAGÉNEKKEL KAPCSOLT MARKEREK

- 14 RGA jelölt fragmentumot klónoztunk sikerrel és töltöttünk fel az NCBI adatbázisba, melyből 9 szekvenálásával bizonyítottuk, hogy azok a rezisztencia génekben ismert konzervatív régiókkal homológ, vagy részben homológ szekvenciákat tartalmaznak. Ebből arra következtettünk, hogy az általunk klónozott és vizsgált RGA jelölteknek szerepük lehet a rezisztencia kialakításában.
- A 9 RGA-ra tervezett SCAR marker tesztelésekor 8 SCAR marker egymástól ugyan különböző, de mind a fogékony, mind a rezisztens fajtákban azonos fragmentumot szaporított fel. Ebből arra következtettünk, hogy az általunk izolált és vizsgált RGA jelöltekre tervezett SCAR markerek valószínűleg olyan, a fertőzést követő növényi válasz reakcióban részt vevő gén(ek) specifikus fragmentumait szaporították fel, melyek mind a rezisztens, mind a fogékony fajtákban megtalálhatóak.
- Egy esetben (Arga-4-es primer) a rezisztens 'Remo' fajtában viszont egyáltalán nem kaptunk fragmentumot. Mivel a többi rezisztens fajtában ez a marker minden esetben felszaporított fragmentumot, az eredményből arra következtettünk, hogy a 'Remo' fajtában a primer kapcsolódási helyén mutáció következhetett be, ami megakadályozta azt, hogy az Arga-4 SCAR marker fragmentumot szaporítson fel.

MAGYAR ALMA GÉNBANK GENOTÍPUSAINAK ÉS KERESKEDELMI FAJTÁK MOLEKULÁRIS UJJLENYOMATA

- Elsőként határoztuk meg az újfehértói magyar alma génbankban fenntartott 40 genotípus (fajta, tájfajta, klón) molekuláris ujjlenyomatát 6 mikroszatellit lókuszban. Az általunk alkalmazott 6 primer-párral az összes vizsgált genotípus egymástól megkülönböztethető.
- Elsőként határoztuk meg az Európai Standard SSR primerek (9 mikroszatellit marker) felhasználásával az újfehértói magyar alma génbankban őrzött 37 genotípus (fajta, tájfajta, klón) ujjlenyomatát. Eredményeink bizonyították, hogy a primerek alkalmazhatóak a magyar alma génbank gyűjtemény egyes tételeinek molekuláris jellemzésére.
- A saját 6 SSR markerrel és az Európai 8 SSR standard markerrel kapott eredmények összehasonlítása alapján javaslatot tettünk az Európai Standard sorozatban két, több lókuszos marker (CH01h02 és CH04c06) cseréjére az általunk alkalmazott 6 primer-pár közül a CH05d11 és CH05e03 markerekkel. Ezek felhasználásával a PIC értékek tovább javíthatóak (0,78->0,84).
- A magyar alma génbank gyűjtemény 37 genotípusának (fajták, tájfajták) két különböző primer sorozattal (6 és 9 tagú) való elemzésével kapott dendrogramokkal bizonyítottuk, hogy az SSR módszer valóban alkalmas a fajták megkülönböztetésére, azonban alkalmatlan a fajták genetikai távolságának (rokonsági fokának) meghatározására.
- Részt vettünk a Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis (Hungarian Apple Microsatellite Database) honlap létrehozásában és bővítésében.

RÜGYMUTÁNSOK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE

- Az általunk használt molekuláris technikákkal (SSR, AFLP) nem sikerült molekuláris eltérést találnunk a 3 rügymutáns fajtakör és 3 rügymutáns csoport fajtái között. Melyből arra következtettünk, hogy a genom nem kódoló részét vizsgáló módszerek alkalmatlanok a rügymutánsok közötti molekuláris különbségek kimutatására.

- Egyre több kísérleti eredmény utal arra, hogy a rügymutánsok megjelenésének molekuláris hátterében retrotranszpozonok tételezhetők fel. A retrotranszpozon szekvencia specifikus megközelítés (S-SAP módszer) alkalmazásával sikerült a ’Jonathan’ alapfajtát a többi ’Jonathan’ rügymutánstól elkülöníteni.

IRODALOM JEGYZÉK

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD & Sorrels ME (1993): Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36:181-186.

FAOSTAT 2010. szeptember 02.: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor

Galli Z, Halász G, Kiss E, Dobránszki J, Heszky LE (2005) Molecular Identification of Commercial Apple Cultivars with Microsatellite Markers. HortScience 40 (7):1974-1977

Garkava-Gustavsson L, Kolodinska Brantestam A, Sehic J, Nybom H (2008). Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis – Hereditas 00: 1-14. Lund, Sweden. eISSN 1601-5223.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Jaccard P (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44:223-270.

Liebhard R, L Gianfranceschi, B Koller, CD Ryder, R Tarchini, E Van De Weg, and C Gessler (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (Malus × domestica Borkh.). Mol. Breed. 10:217-241

Tessier CJ, David P, This J, Boursiquot M & Charrier A (1999): Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in Vitis vinifera L. Theor. Appl. Genet. 98:171-177.

Publikációs lista

I. Az értekezés témájával kapcsolatos közlemények listája:

Cikkek (angol nyelvű):

1. **Wichmann B**, Galli Z, Molnár S, Galbács Z, Kiss E, Szabó T, Heszky L (2007). Molecular identification of old Hungarian apple varieties. International Journal of Horticultural Science 13 (3) 37-43.

2. Galli Z, **Wichmann B,** Molnár S, Galbács Z, Kiss E, Szabó T, Heszky L (2008). Molecular fingerprinting of apple sport mutants. International Journal of Horticultural Science 14 (3): 7–10.

Cikkek (magyar nyelvű):

1. **Wichmann B**, Galli Zs, Kiss E, Szabó T, Heszky L (2008). Régi magyar alma tájfajták genetikai elkülönítése SSR primerek segítségével. Agrár és Vidékfejlesztési Szemle 3:(2) pp. 175-183.

2. **Wichmann B**, Galli Zs, Szabó T, Kovács L, Heszky L, Kiss E (2010). Alma kereskedelmi és tájfajták elkülönítése európai standard SSR markerekkel. Kertgazdaság 42:(1) pp. 68-75.

Konferencia összefoglalók:

Angol nyelvű:

1. Galli Zsolt, **Wichmann Barnabás**, Molnar Stella, Galbács Zsuzsanna, Kiss Erzsebet, Szabo Tibor, Heszky Laszlo (2008): Molecular Fingerprinting of Apple Sport Mutants, International Conference; Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants; Vienna, Austria, February 3-6, 2008 Abstract of Poster Presentation, p. 52.

2. Galli Zs., **Wichmann B.**, Halász G., Kiss E., Szabó T., Heszky L. (2008). Microsatellite fingerprinting of commercial apple cultivars and land varieties. Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. Proceedings of 18th EUCARPIA General Congress. Valencia 9-12 September 2008. p. 353-354.

3. Galli Zsolt, **Wichmann Barnabás**, Molnár Stella, Galbács Zsuzsanna, Kiss Erzsébet, Szabó Tibor, Heszky László (2008). Molecular Fingerprinting of Apple Sport Mutants. International Conference (Molecular mapping & marker assisted selection in plants), Vienna, 3-6 February. Book of abstracts p. 52.

Magyar nyelvű

1. Galbács Zsuzsanna, Molnar Stella, Halasz Gabor, Hoffmann Sarolta, Veres Aniko, Galli Zsolt, Szıke Antal, Tóth Zsófia, Pilinszky Katalin, **Wichmann Barnabas**, Kiss Erzsebet, Kozma Pal, Heszky Laszlo (2006): Mikroszatellit ujjlenyomat alkalmazasa

”hungaricum” szőlőfajtak pedigre elemzesere. Uj tipusu gazdasagi kihivasok es valaszok a bolognai folyamatban. Debreceni Egyetem Mezıgazdaságtudományi Kar, Szent István Egyetem Mezıgazdságtudományi Kar közös tudományos ülése. Debrecen, 2006. december 7.

2. Galbács Zsuzsanna, Molnár Stella, Halász Gábor, Veres Anikó, Galli Zsolt, Szőke Antal, Koncz Tímea, Debreceni Diana, **Wichmann Barnabas**, Pilinszky Katalin, Tóth Zsófia, Szadeczky-Kardoss Bence, Kiss Erzsébet, Heszky László (2007): Szőlőfajták genotipusának meghatározasa DNS markerekkel, VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok Balatonfüred 2007. április 15-17. Összefoglalók, p. 107.
3. Galbács Zsuzsanna, Molnár Stella, Halász Gábor, Veres Anikó, Galli Zsolt, Szőke Antal, Koncz Timea, Debreceni Diana, **Wichmann Barnabas**, Pilinszky Katalin, Tóth Zsófia, Szadeczky-Kardoss Bence, Kiss Erzsebet, Heszky Laszlo (2007): Szőlőfajtak genotipizalasa mikroszatellit, kloroplasztisz-specifikus, retrotranszpozon eredető es genspecifikus markerekkel, XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, XIII. Scientific Days of Plant Breeding Budapest MTA 2007. marcius 12. Osszefoglalok, p. 89.
4. **Wichmann Barnabas**, Galli Zsolt, Balazs Barnabas David, Molnar Stella, Galbács Zsuzsanna, Kiss Erzsebet, Szabo Tibor, Heszky Laszlo (2007): Rezisztenciagen analog markerek azonositasa almaban. Lippay Janos- Ormos Imre- Vas Karoly Tudomanyos Ulesszak, Budapest, 2007. november 7-8. p. 218-219.
5. **Wichmann Barnabas**, Galli Zsolt, Balazs Barnabas David, Galbács Zsuzsanna, Molnar Stella, Kiss Erzsebet, Szabo Tibor, Heszky Laszlo (2007): Rezisztenciagen analog (RGA) markerek azonositasa almaban, XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, XIII. Scientific Days of Plant Breeding Budapest MTA 2007. marcius 12. Összefoglalók, p. 86.
6. Molnar Stella, Galbács Zsuzsanna, Halasz Gabor, Veres Aniko, Galli Zsolt, Szőke Antal, Hoffmann Sarolta, **Wichmann Barnabas**, Kiss Erzsebet, Heszky Laszlo, Kozma Pal (2007): A *Muscadinia rotundifolia* eredetű *Run1* gennel kapcsolt DNS markerek alkalmazasa lisztharmattal szemben rezisztens szőlő genotipusok szelekciojara, VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Balatonfured 2007. aprilis15-17. Összefoglalók, p. 150.
7. **Wichmann Barnabás**, Galli Zsolt, Balázs Dávid, Galbács Zsuzsanna, Molnár Stella, Szabó Tibor, Kiss Erzsébet, Heszky László (2007). Rezisztenciagén Analóg Markerek Azonosítása Almában. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest november 7-8.
8. Galli Zsolt, **Wichmann Barnabas**, Galbács Zsuzsanna, Molnar Stella, Kiss Erzsebet, Szabo Tibor, Heszky Laszlo (2008): Jonathan rugymutansok molekularis elkulonitese S-SAP markerekkel, XIV. Növénynemesítési Tudományos Napok, XIV. Scientific Days of Plant Breeding Budapest MTA 2008. marcius 12. Osszefoglalok, p.62
9. **Wichmann Barnabas**, Galli Zsolt, Balazs David, Molnar Stella, Galbács Zsuzsanna, Kiss Erzsebet, Szabo Tibor, Heszky Laszlo (2008): Alma tajfajtak elkülönítése mikroszatellit „ujjlenyomat” segitségével XIV. Növénynemesítési Tudományos Napok, XIV. Scientific Days of Plant Breeding Budapest MTA 2008. marcius 12. Osszefoglalok, p.63.
10. Galli Zs., Penksza K., **Wichmann B.**, Kiss E., Heszky L. (2008). Molekuláris taxonómiai és polimorfizmus vizsgálatok Festuca fajokon. Multifunctional Agriculture. International Scientific Conference, Hódmezővásárhely, 2008. április 24-26. Agrár- és Vidékfejlesztési Szemle, 3 (1):27

11. Galli Zsolt, **Wichmann Barnabás**, Molnár Stella, Galbács Zsuzsanna, Kiss Erzsébet, Szabó Tibor, Heszky László (2008). Jonatán Rügymutánsok Molekuláris Elkülönítése S-SAP Markerekkel. XIV. Növénynemesítési Tudományos Napok 2008. Összefoglalók, p.62.
12. **Wichmann Barnabás**, Galli Zsolt, Balázs Dávid, Molnár Stella, Galbács Zsuzsanna, Kiss Erzsébet, Szabó Tibor, Heszky László (2008). Alma tájfajták elkülönítése mikroszatellit „ujjlenyomat" segítségével. XIV. Növénynemesítési Tudományos Napok 2008. Összefoglalók, p.63.

II. Az értekezés témájával nem kapcsolatos közlemények listája:

Cikkek (angol nyelvű):

1. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, **Wichmann B**, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2009). Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. British Journal of Cancer. **IF: 4,346. Times Cited: 3**

2. Spisák S, Galamb B, Sipos F, Galamb O, **Wichmann B**, Solymosi N, Nemes B, Molnár J, Tulassay Z, Molnár B (2009). Applicability of antibody and mRNA expression microarrays for idetifing diagnostic and progression markers of early and late stage colorectal cancer. Disease Markers. **IF: 2.026**

3. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Fehér J, Ghyczy D, **Wichmann B**, Selmeci L, Tulassay Zs, Rácz K, Somogyi A(2010). Serum Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Insulin Resistant Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Novel Liver Disease Biomarker. PLoS ONE 5(8): e12226. doi:10.1371/journal.pone.0012226. **IF: 4.351**

4. Sipos F, Galamb O, **Wichmann B**, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Müzes Gy, Zágoni T, Tulassay Zs, Molnár B (2010). Peripheral blood based discrimination of Ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profilling. Disease Markers. **IF: 2.026**

Cikkek (magyar nyelvű):

1. Galbács Zs., Molnár S., Halász G., Hoffmann S., Veres A., Galli Zs., Szőke A., Tóth Zs., Pilinszky K., **Wichmann B**., Kiss E., Kozma P., Heszky L. (2007). Mikroszatellit ujjlenyomat alkalmazása "hungaricum" szőlőfajták pedigré elemzésére. Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények, Acta Agraria Debreceniens. 27: 71-77.

2. Spisák S, Galamb B, **Wichmann B**, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Nemes B, Tulassay Z, Molnár B (2009). Vastagbéldaganatok ellenanyag-microarray-vel kimutatott, TMA-validált progressziós markerei. Orvosi Hetilap; 150 (34): 1607-13.

3. Tóth K, Galamb O, Spisák S, **Wichmann B**, Sipos F, Leiszter K, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z (2009). Szabad DNS-alapú vastagbéldaganat-szűrés perifériás vérből: a metilált szeptin-9 génmarker lehetőségei. Orvosi Hetilap; 150 (34): 969-77.

4. Valcz G, Krenács T, Sipos F, **Wichmann B**, Tóth K, Leiszter K, Balogh Zs, Csizmadia A, Hagymási K, Műzes Gy, Masszi T, Molnár B, Tulassay Zs (2009). A csontvelői eredetű őssejtek megjelenése az ép vastagbélhámban és a gyulladást követő hámregenerációban. Orvosi Hetilap; 150 (40): 1852-57.

5. Szentes Szilárd, **Wichmann Barnabás**, Házi Judit, Tasi Julianna, Penksza Károly (2009): Vegetáció és gyep produkció havi változása badacsonytördemici szürkemarha legelőkön és kaszálón. Tájökológiai lapok 7. évf. 2. sz: 319-328.

6. Szentes Sz., **Wichmann B.**, Házi J., Penksza K. (2009): Vegetáció és gyepprodukció havi változása badacsonytördemici szürkemarha legelőkön és kaszálón. Gyepgazdálkodási Közlemények 7: (in press)

7. Penksza K., **Wichmann B.**, Szentes Sz. (2009): Legelők fajkészletének vizsgálata gyepgazdálkodási szempontokat figyelembe véve a Tapolcai és a Káli-medencében. Gyepgazdálkodási Közlemények 7: (in press)

Konferencia összefoglalók:

Angol nyelvű:

1. Galamb O, Sipos F, Spisák S, Tóth K, Solymosi N, **Wichmann B**, Krenács T, Valcz G, Jász O, Molnár B, Tulassay Z (2009). Reversal of gene expression pattern changes in the colorectal normal-adenoma but less in the normal-carcinoma pathway by NS-398 selective COX-2 inhibitor. GASTRO 2009 (UEGW/WCOG), London.
2. Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z (2009). Evaluation of proliferative/apoptotic ratio and mitotic index in histologically intact children colon samples and in adult adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. GASTRO 2009 (UEGW/WCOG), London.
3. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Jász O, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2009). Septin 9 mRNA, protein expression and methylated DNA level in colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. GASTRO 2009 (UEGW/WCOG), London.
4. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Kalmár A, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2009). Peripheral blood biomarkers of colorectal adenomas, circulating mononuclear cells enriched in follicles are the information transporters. GASTRO 2009 (UEGW/WCOG), London.
5. Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Jász O, Tulassay Z, Molnár B (2009). Colorectal cancer and adenoma specific discriminatory transcript sets validated on independent biopsy samples. 11th European Bridging Meeting in Gastroenterology, Belgrád.
6. Leiszter k, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Jász O, Kalmár A, Molnár B, Tulassay Z (2009). Evaluation of proliferative/apoptotic ratio and mitotic index in histologically intact children colon samples and in adult adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. 11th European Bridging Meeting in Gastroenterology, Belgrád.
7. Galamb O, Sipos F, Spisák S, Tóth K, Solymosi N, **Wichmann B**, Krenács T, Molnár B, Tulassay Z (2009). Reverse effect of NS-398 selective COX2 inhibitor on adenoma- and CRC-associated gene expression changes. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 51. Nagygyűlése, Tihany.
8. Spisak S, Galamb O, **Wichmann B**, Solymosi N, Sipos F, Toth K, Kalmar A, Tulassay Z, Molnar B (2009). Identification of methylation related biomarkers by whole genome microarrays from laser microdissected (LCM) colonic cells. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 51. Nagygyűlése, Tihany.
9. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2009). mRNA and protein expression of septin 9 gene and methylation analysis in colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 51. Nagygyűlése, Tihany.
10. Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z (2009). Evaluation of proliferative/apoptotic ratio in adult adenoma-dysplasia-carcinoma sequence and in histologically intact children colon samples. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 51. Nagygyűlése, Tihany.
11. Galamb O, Sipos F, Spisák S, Tóth K, Solymosi N, **Wichmann B**, Krenács T, Molnár B, Tulassay Z (2009) Reversal of gene expression pattern changes in the colorectal normal-adenoma but less in the normal-carcinoma pathway by NS-398 selective COX-2 inhibitor Digestive Disease Week, USA, Chicago.
12. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Vlacz G, Tulassay Z, Molnár B (2009) Septin 9 mRNA, protein expression and methylated DNA level in colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence Digestive Disease Week, USA, Chicago.
13. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Kalmár A, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2010). Colorectal polyps screening in blood by array RT-PCR-circulating mononuclear cells enriched in follicles are the information transporters. 12th European Bridging Meeting in Gastroenterology, Berlin.
14. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Patai ÁV, Kalmár A, Jász O, Tulassay Z, Molnár B (2010). Dissimilar apoptosis in healthy adults and

children colonic biopsy samples – Gene expression imbalance of pro- and anti-apoptotic genes between colorectal cancer and normal epithelium. 12th European Bridging Meeting in Gastroenterology, Berlin.

15. Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B (2010). Diagnostic tissue mRNA marker sets for array real-time PCR based identification of colorectal adenomas and cancer. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
16. Galamb O, **Wichmann B**, Sipos F, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B (2010). In silico verification of adenoma and colorectal cancer specific transcript panels on microarray datasets downloaded from Gene Expression Omnibus database. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
17. Sipos F, Galamb O, **Wichmann B**, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Patai ÁV, Műzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B (2010). Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
18. Patai ÁV, Galamb O, Kalmár A, Tóth K, Spsiák S, **Wichmann B**, Leiszter K, Valcz G, Sipos F, Patai Á, Tulassay Z, Molnár B (2010). DNA methylation profile in colorectal cancer versus normal colonic tissue – finding new biomarkers for early detection of colorectal cancer. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
19. Kalmár A, Spisák S, Galamb O, **Wichmann B**, Sipos F, Tóth K, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z (2010). Methylation-related biomarker identification by gene expression analysis of lasre microdissected colonic cells. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
20. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Patai ÁV, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z (2010). RT-PCR based colorectal adenoma screening from peripheral blood – circulating mononuclear cells enriched in follicles are the information transporters. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
21. Valcz G, Sipos F, Krenacs T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Toth K, **Wichmann B**, Molnar B, Tulassay Z (2010). Alteration of potential cell transition events during colorectal adenoma-dysplasiacarcinoma sequence (ADCS). 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona.
22. Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Jász O, Kalmár, A, Schöller A, Tulassay Z, Molnár B (2010). Colorectal cancer and adenoma specific diagnostic biopsy mRNA expression profiles confirmed on a large independent sample set. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 52. Nagygyűlése, Tihany.
23. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Patai A, Kalmár A, Schöller A, Molnár B, Tulassay Z (2010). Distinct apoptotic activity and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in colorectal cancer and histologically intact adult and children colon biopsy samples. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 52. Nagygyűlése, Tihany.
24. Patai VÁ, Galamb O, Tóth K, Kalmár A, Spisák S, **Wichmann B**, Jász O, Leiszter K, Valcz G, Sipos F, Schöller A, Tulassay Z, Molnár B (2010). DNA methylation profile in colorectal cancer versus normal colonic tissue-preliminary results. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 52. Nagygyűlése, Tihany.
25. Kalmár A, Spisák S, Galamb O, **Wichmann B**, Sipos F, Tóth K, Schöller A, Molnár B, Tulassay Z (2010). Methylation-related biomarker identification by gene expression analysis of laser microdissected colinic cells. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 52. Nagygyűlése, Tihany.
26. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Kalmár A, Valcz G, Schöller A, Tulassay Z, Molnár B (2010). Screening of colorectal polyps from blood – mononuclear cells in follicles are the information transporters. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 52. Nagygyűlése, Tihany.
27. Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Jász O, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B (2010). Diagnostic biopsy mRNA expression profiles of colorectal cancers and polyps. Digestive Disease Week, USA, New Orleans.
28. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Patai ÁV, Kalmar A, Jász O, Molnár B, Tulassay Z (2010). Dissimilar apoptosis in healthy adults and children colonic biopsy samples – Gene expression imbalance of pro- and anti-apoptotic genes between colorectal cancer and normal epithelium. Digestive Disease Week, USA, New Orleans.
29. Spisák S, Galamb O, Kalmar A, **Wichmann B**, Solymosi N, Sipos F, Tóth K, Molnár B, Tulassay Z (2010). Methylation related biomarker identification by analysis of gene expression profile of laser microdissected colonic cells. Digestive Disease Week, USA, New Orleans.
30. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Kalmar A, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2010). Colorectal polyps screening in blood by array RT-PCR - circulating mononuclear cells enriched in follicles are the information transporters. Digestive Disease Week, USA, New Orleans.
31. Leiszter K, Sipos, F, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**,Tóth K,Valcz G, Kalmar A, Jász O, Molnár B, Tulassay Z (2010). Analysis of proliferative/apoptotic ratio, mitotic index

and apoptotic index in histologically intact children colonic biopsy samples and colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence in adults. Digestive Disease Week, USA, New Orleans.

Magyar nyelvű:

1. **Wichmann B.**, Galli Zs., Penksza K., Kiss E., Krízsán V., Heszky L. (2004): Morfotaxonómiai és molekuláris vizsgálatok a *Festuca pseudovaginata* Penksza alakkör taxonjain. – Botanikai Szakosztály 2004. április. 19.
2. Galli Zs., **Wichmann B**., Kiss E., Penksza K., Heszky L (2004) Molekuláris taxonómiai vizsgálatok a *Festuca* nemzetség (*Ovinae* csoport) néhány faján. – X. Növénynemesítési Tudományos Napok február 18–19. MTA Budapest. Összefoglalók p. 48.
3. **Wichmann B.,** Galli Z., Kiss E., Penksza K., Heszky L.E. (2006) Molekuláris marker- és szekvencia összehasonlító vizsgálatok a *Festuca ovinae* csoport fajain. XII. Növénynemesítési Tudományos Napok március 7-8. MTA, Budapest. Összefoglalók, p.62.
4. Leiszter K, Sipos F, Krenács T, Galamb O, Spisák Sándor, Veres G, Kiss A, Németh AM, Zágoni T, Herszényi L, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z (2009). Az öregedés kapcsán kialakuló funkcionális és molekuláris elváltozások a vastagbélben, különös tekintettel a regenerációs sejtfrakció alakulására. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekció Tudományos Ülése, Szeged.
5. Tóth K, Galamb O, Spisák S, **Wichmann B**, Sipos F, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Molnár B, Tulassay Z (2009). Vastagbéldaganatok szűrésére alkalmas Septin9 gén működésének vizsgálata DNS, mRNS és protein szinten. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekció Tudományos Ülése, Szeged.
6. Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B (2010). A kolrektális adenoma- és a vastagbélrák valós idejű array PCR-alapú azonosítására alkalmas diagnosztikus szöveti mRNS markerpanelek Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
7. Galamb O, Sipos F, S. Spisák, K. Tóth, **B. Wichmann**, T. Krenács, G. Valcz, B. Molnár, Z. Tulassay (2010). Az NS-398 szelektív COX-2-gátlószer megfordítja az ép-adenoma átmenetre jellemző génexpressziós változásokat, míh az ép-kolorektális carcinoma átmenetre jellemzőeket kevésbé. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
8. Sipos F, Galamb O, **Wichmann B**, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Műzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B (2010). A colitis ulcerosa és a Crohn-betegség elkülönítése egyéb colitisektől a perifériás vér teljes genom génexpressziós elemzésével. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
9. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Patai VÁ, Kalmár A, Jász O, Molnár B, Tulassay Z (2010). A proliferációs/apoptózis arány (PAR), mitotikus index (MI) és apoptotikus index (AI) vizsgálata szövettanilag ép gyermek vastagbél-biopsziás mintákon, valamint az adenoma-carcinoma szekvenciában (ACS) felnőttmintákon. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
10. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Patai VÁ, Kalmár A, Molnár B, Tulassay Z (2010). Eltérő apoptotikus aktivitás gyermekek és felnőttek szövettanilag ép vastagbél-biopsziás mintáiban, valamint az adenoma-carcinoma szekvenciában (ACS). Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
11. Patai VÁ, Galamb O, Tóth K, Kalmár A, Spisák S, **Wichmann B**, Jász O, Leiszter K, Valcz G, Sipos F, Patai Á, Schöller A, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B (2010). DNS-metilációs profilok normál vastagbélben és vastagbélrákban – új biomarkerek a vastagbélrák korai felismeréséért. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
12. Kalmár A, Spisák S, Galamb O, **Wichmann B**, Sipos F, Tóth K, Leiszter K, Peterfia B, Molnár B, Tulassay Z (2010). Metilációs szabályozás alatt álló gének azonosítása génexpressziós vizsgálatok alapján lézer-mikrodisszektált vastagbél-hámsejtekben. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
13. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Kalmár A, Patai VÁ, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2010). A vastagbél-adenoma szűrése vérből RT-PCR-rel – keringő mononukleáris sejtekben gazdag follikulusok mint az infromáció közvetítői. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.
14. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Valcz G, Kalmár A, Patai VÁ, Tulassay Z, Molnár B (2010). A vastagbéldaganatok szűrésére alkalmas szeptin-9 gén működésének vizsgálata DNS-, mRNS- és proteinszinten. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest.

15. Kalmár A, Spisák S, Galamb O, Tóth K, Leiszter K, **Wichmann B**, Patai A, Valcz G, Sipos F, Jász O, Molnár B, Tulassay Z (2010). DNS metiláció vizsgálata génexpresszió alapján vastagbél-daganatokban. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekció Tudományos Ülése, Lillafüred.
16. Tóth K, Spisák S, Galamb O, Sipos F, **Wichmann B**, Leiszter K, Kalmár A, Patai Á, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2010). Vastagbél adenoma szűrése vérből RT-PCR által – keringő mononukleáris sejtekben gazdag follikulusok, mint az információ közvetítői. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekció Tudományos Ülése, Lillafüred.
17. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Kiss A, **Wichmann B**, Tóth K, Valcz G, Patai Á, Molnár B, Tulassay Z (2010). Az apoptotikus folyamat különbségei gyermek és felnőtt vastagbél biopsziás mintákban a daganat kialalulás folyamatában. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekció Tudományos Ülése, Lillafüred.
18. Jász O, Spisák S, Valcz G, **Wichmann B**, Tóth K, Galamb O, Tulassay Z, Molnár B (2010). A sejten kívüli, szabad DNS lehetséges szerepe a regenerációs folyamatokban egér colitis modell esetében. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Colon Szekció Tudományos Ülése, Lillafüred.
19. Falusi Eszter, Sipos Virág Katalin, **Wichmann Barnabás**, Penksza Károly (2010)**.** A makrofiton hosszú távú vizsgálati lehetőségei szakasztérképezési módszerrel. LII. Hidrobiológus Napok Tihany.
20. Kiss Tímea - Pintér Orsolya - Falusi Eszter - Szentes szilárd - **Wichmann Barnabás** - Benyovszky Mihály -Penksza Károly (2010). A bugaci legelő hosszú távú természetvédelmi, gyepgazdálkodási vizsgálata. XXVIII. Vándorgyűlés, MAGYAR BIOLÓGIAI TÁRSASÁG, Budapest.
21. Szentes Szilárd - Sutyinszki Zsuzsa - **Wichmann Barnabás** (2010). Kondoros környéki mezsgyék botanikai változatossága. XXVIII. Vándorgyűlés, MAGYAR BIOLÓGIAI TÁRSASÁG, Budapest.
22. Kiss Tímea, Pintér Orsolya, Szentes Szilárd, **Wichmann Barnabás**, Penksza Károly (2010). Kiskunsági legelők hosszú távú botanikai és gyepgazdálkodási összehasonlító vizsgálatai. XXVIII. Vándorgyűlés, MAGYAR BIOLÓGIAI TÁRSASÁG, Budapest.
23. Szentes Szilárd, **Wichmann Barnabás** és Penksza Károly (2010). Növényi életforma preferenciák különböző legelő állatoknál. 1442. szakülés, Botanikai Szakosztály, MAGYAR BIOLÓGIAI TÁRSASÁG, Budapest.
24. Kovács László, Tisza Viktória, Koncz Tímea, Szőke Antal, **Wichmann Barnabás**, Kiss Erzsébet, Heszky László (2010). Szamócából izolált, etilén bioszintézisben és érésben működő gének promótereinek bioinformatikai jellemzése. XVI. Növénynemesítési Tudományos Napok 2010. Összefoglalók, p. 89.