

## SZAKMAI BESZÁMOLÓ

### Citokininek hatásvizsgálata alma *in vitro* hajtásregenerációjában

Kutatási programunknak két fő célkitűzése volt:

1. Különböző citokininek hajtásregenerációban játszott szerepének szerv-illetve szövetszintű vizsgálata hat almafajta (nemes és alany) esetében.
2. Különböző alma genotípusok jellemzése molekuláris markerekkel.

Szakmai beszámolóinkban is e felosztás alapján ismertetjük az elvégzett kutatómunkát és annak eredményeit.

#### 1. Különböző citokininek hatása alma genotípusok regenerációs képességére, a regenerálódott hajtások szöveti szerkezetére

A vizsgálatokba 6 almafajtát (5 nemes és 1 alany) vontunk be: 'Royal Gala', 'Idared', 'Freedom', 'Húsvéti rozmaring', 'McIntosh', 'M.26'.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk olyan aromás oldalláncú citokininek regenerációra gyakorolt hatását, melyek szerepét eddig még almánál nem vizsgálták, de más növényfajoknál végzett vizsgálatok eredményei, valamint a szerkezetük alapján feltételezhető, hogy a regenerációs képességre pozitív hatást gyakorolnak. Hatásukat különböző, alma regenerációs kísérletekben eddig alkalmazott aromás oldalláncú citokininekkal (benzil-adenin, kinetin) és izoprenoid oldalláncú (pl.: N<sup>6</sup>-(izopent-2-enil)adenozin, zeatin) citokininek hatásával is összehasonlítottuk. Az utolsó proliferációs szakasz különböző tényezőinek (hormonösszetétel, hőmérséklet, megvilágítás, egyéb előkezelés) jelentőségét a hajtásregenerációban számos szerző bizonyította. Kísérleteinkben ezért nemcsak magának a regenerációnak a folyamatát, hanem a regenerációra felhasznált hajtások különböző citokininekkal való előkezelésének regenerációra gyakorolt utóhatását is vizsgáltuk. Több szerző kimutatta, hogy mind az előkezelő, mind a regenerációs táptalaj összetétele befolyásolja a növényi regenerációs folyamatot és a regenerációt megelőző kezelés jól leírható anatómiai változásokat indukálhat az *in vitro* szövetekben. Célkitűzéseink között szerepelt ezért a különböző citokininek által okozott anatómiai, szövettani változások vizsgálata, összehasonlítása is.

A citokininek hatásvizsgálata tehát az alábbi szempontok szerint történt a különböző genotípusoknál:

1. A regenerációban felhasznált levelek hajtásainak előkezelése különböző citokininekkal:
  - Az előkezelő táptalajban különböző típusú citokininek regenerációra gyakorolt utóhatásának vizsgálata tesztregeneráció alkalmazásával.
  - Az alkalmazott különböző típusú citokinineknek az *in vitro* hajtások szöveti szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata (fénymikroszkópos vizsgálatok).
  - A legjobb utóhatásúnak bizonyult citokinin(ek) koncentrációjának optimalizálása az előkezelő táptalajban, tesztregeneráció alkalmazásával.
2. Különböző citokininek hatásvizsgálata a regenerációs folyamatra.
  - A legjobbnak bizonyult előkezelő táptalajon nevelt hajtások levéllemezeinek regenerációja különböző típusú citokinineket tartalmazó regenerációs táptalajon.
  - A citokininek koncentrációjának optimalizálása a regenerációs táptalajban.
  - Különböző citokininek hatásának vizsgálata a levéllemezen regenerálódó új hajtások anatómiájára, szövettani felépítésére.

Az alábbi táblázatokban bemutatjuk az előkezelő, illetve a regeneráló táptalajban alkalmazott citokininek típusát és koncentrációját (1. és 2. táblázatok).

1. táblázat. Az előkezelő táptalajban alkalmazott citokininek típusa és koncentrációja

Citokinin típusa	Citokinin koncentrációja					
	mg/l ( $\mu$ M)					
<b>TOP</b>	0	0,5 (2,07)	1,0 (4,14)	1,5 (6,21)	2,0 (8,28)	
<b>BAR</b>	0	0,5 (1,40)	1,0 (2,80)	1,5 (4,20)	2,0 (5,60)	
<b>BA</b>	0	0,5 (2,22)	1,0 (4,44)	1,5 (6,66)	2,0 (8,88)	
<b>KIN</b>	0	0,5 (2,32)	1,0 (4,64)	1,5 (6,96)	2,0 (9,28)	
<b>BA+TOP</b>	0+0	0,5+0	0,5+0,5	0,5+1,0	0,5+1,5	0,5+2,0
<b>BA+KIN</b>	0+0	0,5+0	0,5+0,5	0,5+1,0	0,5+1,5	0,5+2,0

2. táblázat. A regenerációs táptalajban alkalmazott citokininek típusa és koncentrációja

Citokinin típusa	Citokinin koncentrációja						
	mg/l ( $\mu$ M)						
<b>TDZ</b>	0,5 (2,27)	2,0 (9,08)	3,5 (15,89)	5,0 (22,70)	6,5 (29,51)	-	
<b>BA</b>	0,5 (2,22)	2,0 (8,88)	3,5 (15,54)	5,0 (22,20)	6,5 (28,86)	-	
<b>BAR</b>	0,5 (1,40)	2,0 (5,60)	3,5 (9,80)	5,0 (14,00)	6,5 (18,20)	8,0 (22,40)	
<b>TOP</b>	0,5 (2,07)	2,0 (8,28)	3,5 (14,49)	5,0 (20,70)	6,5 (26,91)	-	
<b>TOPR</b>	0,5 (1,34)	2,0 (5,36)	3,5 (9,38)	5,0 (13,40)	6,5 (17,42)	8,0 (21,44)	
<b>ZEA</b>	0,5 (2,28)	2,0 (9,12)	3,5 (15,96)	5,0 (22,80)	6,5 (29,64)	-	
<b>ZEAR</b>	0,5 (1,42)	2,0 (5,68)	3,5 (9,94)	5,0 (14,20)	6,5 (18,46)	8,0 (22,82)	
<b>KIN</b>	0,5 (2,32)	2,0 (9,28)	3,5 (16,24)	5,0 (23,20)	6,5 (30,16)	-	
<b>KINR</b>	0,5 (1,44)	2,0 (5,76)	3,5 (10,08)	5,0 (14,40)	6,5 (18,72)	8,0 (23,04)	

Az alkalmazott citokininek rövidített és teljes neve:

TDZ –thidiazuron = N-fenil-N<sup>1</sup>-1,2,3-tidiazol-5-il urea; BA- benzil-adenin = 6-benzil-amino-purin; BAR - 6-benzil-amino-purin -ribozid; TOP - 6-(3-hydroxi-benzil-amino)purin; TOPR - 6-(3-hydroxi-benzil-amino)purin-ribozid; KIN - 6-furfuril-amino-purin; KINR - 6-furfuril-amino-purin-ribozid; ZEA – N<sup>6</sup>-(izopent-2-enil)adenozin = zeatin; ZEAR – zeatin-ribozid.

Az alkalmazott nevelési körülmények:

Előkezelésben az alma növénykéek 5-7 leveles, 35-40 mm hosszú *in vitro* hajtásait állítottuk a különböző citokinin-tartalmú (1. táblázat) táptalajokra, melyek a citokininek mellett tartalmaztak MS sókat és vitaminokat, valamint 100 mg l<sup>-1</sup> myo-inozitolt, 0,7 % agar-agar, 3 % szacharózt, 0,3 mg l<sup>-1</sup> indol-vajsavat (IBA) és 0,2 mg l<sup>-1</sup> gibberellinsavat (GA<sub>3</sub>). A hajtásokat 3 hétig neveltük ezeken a táptalajokon, 22 °C ± 2 °C -on, 16 órás 8.000 lux-os (105  $\mu$ mól m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) megvilágítás mellett. A három hét alatt a hajtások legalább egy, de általában két új levelet fejlesztettek (kezeléstől függően). A szövettani vizsgálatokat ezután végeztük el a felső két, újonnan fejlődő levelekből. A toluidin késsel festett keresztmetszeti képeket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

A különböző citokinin-tartalmú táptalajon előnevelt növények újonnan fejlődő leveleit regenerációs táptalajra helyeztük. Minden regenerációs táptalaj tartalmazott MS sókat, B5 vitamint, 100 mg l<sup>-1</sup> myo-inozitolt, 0,2 mg l<sup>-1</sup> naftil-ecetsavat (NAA), 0,25 % gelritet, 3 % szacharózt és citokinint. Az alkalmazott citokinin a tesztregenerációban 5,0 mg l<sup>-1</sup> BA ('Royal Gala' esetén emellett még egy fajta tesztregenerációt is alkalmaztunk: 0,5 mg l<sup>-1</sup> TDZ-vel)

volt, a regenerációs vizsgálatokban - a megfelelő előkezelések kiválasztása után - a 2. táblázat szerinti típusokat és koncentrációkat alkalmaztuk.

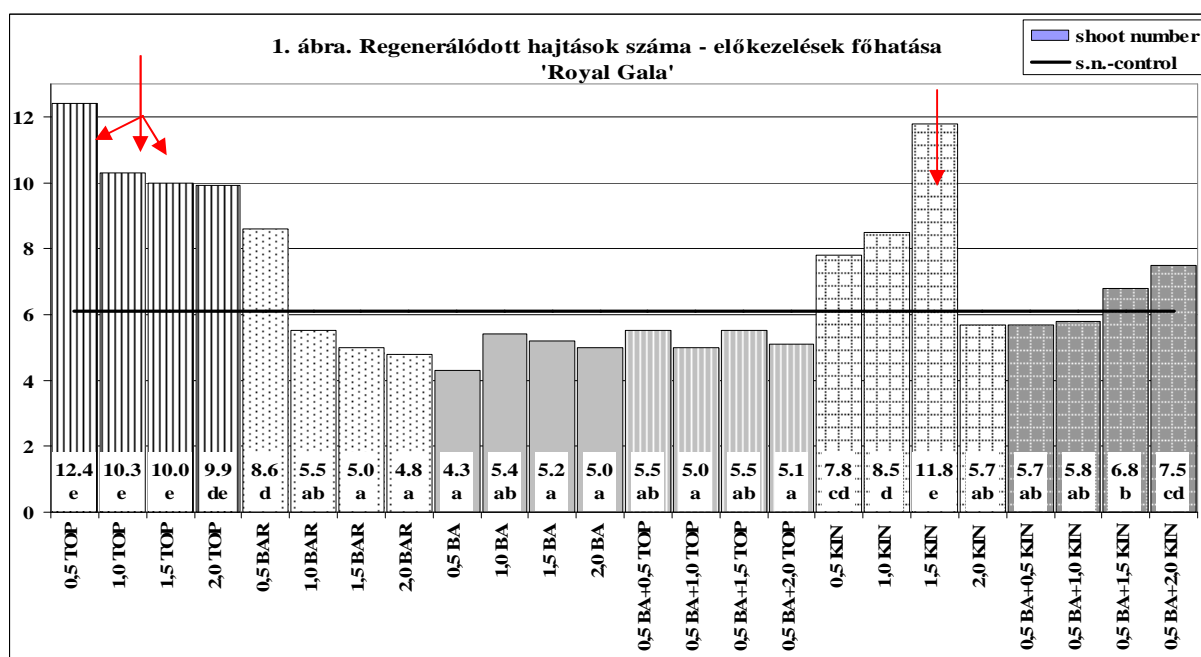
Az explantátumokat sötétben 24,5 °C-on inkubáltuk 3 hétig, azután fényen 22 °C-on, 16 h fotoperiódusnál további 4 hétig. A fényintenzitást hetente növeltük: 35  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  volt az 1. héten, 70  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  a 2. héten és 105  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  a 3. héttől.

Hét hetes regenerációs kezelést követően számoltuk a regenerációs százalékot (=regenerált hajtást tartalmazó explantátumok aránya, R%), a regenerált hajtások számát explantátumonként (SN), és a vitrifikációs százalékot (=vitrifikált hajtást tartalmazó explantátumok aránya, V%). A paraméterekből organogenetikus indexet (OI) számoltunk az alábbi képlettel:  $\text{OI} = [\text{R}\% - \text{V}\%] \times \text{SN} / 100$ . Az adatok statisztikai értékelése egy- és többtényezős varianciaanalízissel és Tukey teszttel történt *SPSS 9.0 for Windows* programcsomag segítségével. A vizsgált citokininek hatásának, illetve utóhatásának értékelése a SN és az OI értékek figyelembevételével történt.

## Eredmények összefoglalása

### 1. Az előkezelő táptalajban alkalmazott citokininek hatása

Hisztológiai vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy **a citokininek típusa és koncentrációja nagymértékben megváltoztatta az *in vitro* levelek szöveti szerkezetét.** 'Royal Gala' esetén minden kezelésnél elvégeztük a szövettani vizsgálatot, a többi fajta esetén hormontípusonként a legjobb kezelés esetén ellenőriztük a szöveti szerkezetet. **A regenerációra használt levelek szöveti szerkezete és a regenerációs válaszuk (sok hajtás, alacsony vitrifikáció) jó korrelációt mutatott.** Amikor az előkezelés fiatal, vagy kevésbé differenciált szerkezetet okozott, a regenerálódott hajtások száma magas, a vitrifikáció mértéke alacsony volt. A regeneráció mértékét az előkezelő táptalajban és a regeneráló táptalajban alkalmazott citokininek együttesen befolyásolták. A citokininek által okozott hisztológiai hatásokat, illetve a regeneráció mértékét a különböző előkezeléseket követően részletesen publikáltuk (1, 4, 5, 6, 10, 12), ezért a 1. ábrán csak a 'Royal Gala' példáján mutatjuk be, hogy hogyan korrelál a jó organogenetikus képesség a szöveti szerkezettel attól függően, milyen típusú és koncentrációjú citokininnel kezeltük az *in vitro* növényeket a regenerációt megelőzően.



'Royal Gala' esetén a legtöbb hajtás 0,5-1,5 mg l<sup>-1</sup> TOP koncentráció, vagy 1,5 mg l<sup>-1</sup> KIN alkalmazása után regenerálódott mindkét tesztregenerációs táptalajon, illetve BA+TOP kombinált kezelés esetén 1,5-2,0 mg l<sup>-1</sup> TOP alkalmazásakor, ha a tesztregenerációs táptalajban BA volt.

A regeneráció mértékében a vizsgált fajták között jelentős különbségeket lehetett kimutatni, azonban a különböző előkezelésekre adott reakciójuk nagyon hasonló volt. A tesztregenerációs kísérletek (SN, OI) és a hisztológiai vizsgálatok eredményeinek együttes figyelembevétele alapján a vizsgált fajtáknál kiválasztott legjobb előkezeléseket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat. A hajtásregenerációt megelőző leghatékonyabb előkezelő táptalaj citokinin tartalma, valamint ezekkel a tesztregenerációban elérhető SN és OI értékek a különböző fajtáknál.

Fajta	Előkezelő táptalaj	SN	OI
Royal Gala	1,0 mg l <sup>-1</sup> TOP	10,3	6,44
M.26	1,0 mg l <sup>-1</sup> TOP	2,78	0,65
Idared	0,5 mg l <sup>-1</sup> BA + 0,5 mg l <sup>-1</sup> TOP	1,54	0,33
Freedom	0,5 mg l <sup>-1</sup> BA + 1,5 mg l <sup>-1</sup> TOP	2,45	1,88
McIntosh	0,5 mg l <sup>-1</sup> BA + 0,5 mg l <sup>-1</sup> TOP	5,12	1,28
Húsvéti rozsmaring	1,5 mg l <sup>-1</sup> KIN	3,26	2,01

A 3. táblázat adataiból jól látszik, hogy a vizsgált fajták organogenetikus képessége igen különböző; az SN-t figyelembe véve 2-6,7-szeres, az OI-t figyelembe véve 3,2-19,5-szörös a különbség. A legjobb organogenetikus képességet mutatta a 'Royal Gala', leggyengébbet az 'Idared'.

## 2. A regenerációs táptalajban alkalmazott citokininek hatása

Az elvégzett kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy a különböző típusú citokininekre adott regenerációs válasz erősen fajtafüggő volt. Mindegyik fajta esetén eltérő regenerációs választ kaptunk; még abban az esetben is, ha az előkezelés azonos táptalajon történt, mint a 'Royal Gala' és az 'M.26', vagy az 'Idared' és 'McIntosh' esetén.

'Royal Gala' a TDZ tartalmú táptalajon mutatta a legjobb eredményt, mind a regenerálódott hajtások számát, mind az OI-t illetően. A TDZ optimális koncentrációja 2,27 µM volt (más alma fajtáknál ez 4-10 µM között van irodalmi adatok szerint). Ezt követte a TOPR és a BA hatása, bár szignifikánsan gyengébb eredményt adva. A nem-ribozid citokininek (BA, TOP, ZEA, KIN) optimális koncentrációja 22-30 µM között, míg a ribozidok (BAR, TOPR, ZEAR, KINR) optimális koncentrációja 17-23 µM között volt.

'M.26' esetében a TDZ optimális koncentrációja 9,08 µM, alkalmazása esetén nagy hajtásszám (3,12), de viszonylag kicsi OI (0,63) érhető el. 18,2 µM BAR és 21,04 µM TOPR alkalmazása nagy hajtásszámot (3,22 és 3,18) és nagy OI-t (1,29 és 1,74) eredményezett. A KIN és a ZEA ennél a fajtánál is kevésbé hatékony, optimális koncentrációja 22-23 µM, míg ribozidjaiké 18-19 µM. (Részletes közlés: 3, 7, 8, 11)

'Idared' esetén a legjobb regenerációt 26,91 µM TOP (SN:3,67, OI:0,18), 23-30 µM TDZ (SN:2,67, OI:0,40) és 15,5 µM BA (SN:2,57, OI:0,77) használata esetén érték el. A nem-ribozid citokininek ennél a fajtánál nem voltak hatásosak, sem a kinetin, sem pedig az izoprenoid oldalláncú citokininek (ZEA, ZEAR).

'Freedom' esetén a leghatásosabb 22,7  $\mu\text{M}$  TDZ (SN:1,78, OI:0,65) bizonyult; a hasonló koncentrációban alkalmazott (22,2  $\mu\text{M}$ ) BA kevésbé volt hatásos (SN:1,29, OI:0,15). Némi regenerációt lehetett elérni 14  $\mu\text{M}$  BAR, vagy 21,4  $\mu\text{M}$  TOPR használatával, a többi vizsgált citokinin hatástalan volt.

'McIntosh' esetén az optimális TDZ koncentráció 22,7  $\mu\text{M}$  volt (SN:3,33, OI:1,11). Az aromás oldalláncú, nem-ribozidok 20-22  $\mu\text{M}$ , a ribozidok 9-13  $\mu\text{M}$  optimumot mutattak; sőt kinetin esetén csak a nem-ribozid forma indukált regenerációt (16  $\mu\text{M}$ ; SN:1,45, OI:0,26). Izoprenoid oldalláncú citokinin esetén a nem-ribozid optimális koncentrációja 29  $\mu\text{M}$ , a ribozidé 19  $\mu\text{M}$ . Általánosan megfigyelhető a fajtánál, hogy a ribozid ugyanolyan, vagy kisebb hatású, mint a nem-ribozid forma.

'Húsvéti rozsmaring' esetén a TDZ optimuma 9,08  $\mu\text{M}$  (SN:2,54, OI:0,59). A nem-ribozid természetes citokininnek (BA, TOP) optimális koncentrációja 15-27  $\mu\text{M}$ , a ribozidoké 9-19  $\mu\text{M}$ .

Mindegyik vizsgált fajta esetén sikerült optimalizálni a regenerációs táptalaj citokinin tartalmát (legjobb típus és koncentráció kiválasztása), melyet a 4. táblázat mutat.

4. táblázat. Az előkezelő és a regenerációs táptalaj optimális citokinin tartalma az egyes fajtáknál és az elért SN és OI.

Fajta	Előkezelő táptalaj $\text{mg l}^{-1}$	Regenerációs táptalaj $\text{mg l}^{-1}$ ( $\mu\text{M}$ )	SN	OI
Royal Gala	1,0 TOP	0,5 (2,27) TDZ	11,08	7,05
M.26	1,0 TOP	8,0 (21,44) TOPR	3,18	1,74
Idared	0,5 BA + 0,5 TOP	6,5 (29,51) TDZ	2,67	0,40
Freedom	0,5 BA + 1,5 TOP	5,0 (22,7) TDZ	1,78	0,65
McIntosh	0,5 BA + 0,5 TOP	5,0 (22,7) TDZ	3,33	1,11
Húsvéti rozsmaring	1,5 KIN	3,5 (15,54) BA	2,85	1,18

Mint a 4. táblázatból is látható, a fajták regenerációs képessége között igen nagy eltérések voltak. Legjobban regenerálódott a 'Royal Gala', az elérhető SN 3,5-6-szoros, mint a többi vizsgált fajtánál, az OI pedig 4-19-szeres. Leggyengébb regenerációs választ a 'Freedom' (alacsony SN és OI) és az 'Idared' (alacsony OI) adta.

A regenerációs táptalajra helyezést követően mikroszkóposan nyomon követtük fajtánként a 3 legjobb és a legrosszabb citokinin típus optimális koncentrációjának hatását a hajtások differenciálódásának időbeli alakulására. Az eredményeket részletesen publikáltuk (7, 8), a főbb megállapítások a következők voltak:

- A különböző citokininnek által okozott eltérés egyes fajtákon belül is jelentős volt, tükrözve a regeneráció statisztikai értékelésekor kapott eredményeket.
  - A tenyészetek fényre helyezésétől számított első hét végére a különböző citokininnek hatása közötti eltérés láthatóvá vált.
  - A 4. hét (3 hét sötétben + 1 hét fényen tenyésztés) végén, a különböző citokinin típusok hatása között megfigyelhető különbségek mértéke a 7. hét végére sem változott jelentősen, amit a regenerációs megfigyelések (SN, OI, R%, V%) statisztikai értékelése is igazolt.
- A fajták között is igen jelentős különbségeket találtunk. A leggyengébben regenerálódó 'Idared' és 'Freedom' esetén a hajtásfejlődés mintegy 12-14 napos késést mutatott a legjobban regenerálódó 'Royal Gala'-éhoz képest.

## 2. Különböző alma genotípusok jellemzése molekuláris markerekkel

A hatékony nemesítési munka megköveteli a genotípusok egyértelmű és pontos elkülönítését. Az erre a célra felhasználható markerek két nagy csoportját a morfológiai, valamint a napjainkban már egyre elterjedtebben használt genetikai markerek jelentik. A morfológiai markerek csak fenotípusosan megjelenő, öröklődő tulajdonságok lehetnek, amelyek megbízhatóságát a környezeti kölcsönhatások jelentősen csökkenthetik. Sokszor nem elég informatívak és a tulajdonságok gyakran korrelálnak egymással.

A genetikai markerek nagy előnye, hogy számuk elvileg korlátlan, mivel a feltehetően a genom valamennyi allélformája alkalmazhatóvá tehető. A környezeti és episztatikus hatások nem befolyásolják. Segítségükkel feltárhatók a vizsgált populációkban jelenlévő genetikai különbségek, melyek majd a nemesítési munkában felhasználhatók.

Az almanemesítési programokban is egyre inkább elengedhetetlenné válik megbízható genetikai markerek bevonása a fajták és származékaik pontos azonosításához. Emellett ezek a markerek génbankok és fajtagyűjtemények genetikai jellemzéséhez és elkülönítéséhez is kiválóan felhasználhatók.

Ilyen, ún. „genetikai ujjlenyomatok” előállítására almában a legmegfelelőbb genetikai elemek a mikroszatellitek, vagy más néven egyszerű tandem elrendeződésű szekvencia ismétlődések (Simple Sequence Repeats: SSR) a genomban. Az ismétlődő elemek száma a genotípusok között nagymértékű variabilitást mutat, multiallélikus kodomináns marker.

Napjainkig csaknem 200 SSR markert írtak már le almában, melyeket a kifejlesztésüket követően néhány genotípuson teszteltek (Guilford et al. 1997, Gianfranceschi et al. 1998, Hokanson et al. 1998, Liebhard et al. 2002). Az SSR markerek alkalmasnak bizonyultak a *Malus* nemzetségen belül genotípusok elkülönítésére és a genetikai távolságok meghatározására (Goulão & Oliveira 2001, Hokanson et al. 2001, Liebhard et al. 2002, Laurens et al. 2004).

**Vizsgálataink első célja** ezért az volt, hogy a legtöbb termesztett és közkedvelt fajta molekuláris elkülönítését kidolgozzuk mikroszatellit markerekre alapozva. Ehhez összesen 66 genotípust vontunk be a kísérleteinkbe, amelyekből mintát az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató Intézetben gyűjtöttünk. Elsődleges célkitűzésünknek tekintettük, hogy a lehető legegyszerűbben és legolcsóbban, a legkevesebb mikroszatellit marker felhasználásával képesek legyünk mind a 66 fajtát egymástól molekulárisan elkülöníteni.

### Anyag és módszer

A DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) segítségével nagy tisztaságú és jó minőségű genomiális DNS izoláltunk a begyűjtött fiatal levelekből. A PCR reakciókat Perkin Elmer 9700 thermocycler készülékben végeztük Cy-5 fluoreszcens festékkel jelölt SSR primereket alkalmazva. Ezeket a primereket (CH03g07, CH04e03, CH04g10, CH05c02, CH05d11, CH05e03) már korábban azonosították és leközölték (Liebhard et al. 2002).

A reakciókat 20 µl-es végtérfogatban végeztük, amely a következő összetevőket tartalmazta: 20-50 ng templát DNS, 1 × PCR puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin), + 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM mindkét primerből, 0.2 mM minden dNTP-ből és 1.2 egység Red-*Taq* DNS polymeráz (Sigma). A reakciókörülmények a következők voltak: kezdeti két perces denaturálást követően 35X ismételve 20 mp 94°C, 30 mp 56°C and 60 mp 72°C. Az amplifikáció ezt követően 5 perc 72°C-on zárult. A termékeket előzetesen 1.2%-os agaróz gélen választottuk el, majd a szükséges mértékben hígítottuk őket (akár 30 szorosra!) TE1 pufferrel (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Az amlifikált allélek pontos méretét ALFexpress-II DNS analizátor (Amersham BioSciences) készülékben határoztuk meg. Belső és külső standardnak 50-500 ALFexpress™ sizer™-t használtunk. Minden PCR reakciót és allélméret meghatározást legalább egyszer megismételtünk.

A mikroszatellit allélek gyakorisági értékei segítségével kiszámítottuk az egyes markerek PIC (Polymorphic Information Content) értékeit a következő képlet segítségével:  $PIC=1-\sum p_i^2$ , ahol ' $p_i$ ' az  $i$ -edik allél gyakorisága minden SSR marker esetében (Anderson et al. 1993). Ez tulajdonképpen megegyezik a heterozigotizációs index-szel.

Az elkülönítéshez minimálisan szükséges markerszám meghatározásához az egymástól megkülönböztethetetlen rügymutánsokat 1 fajtának tekintettük, így a 46 'valódi' fajta ( $N=46$ ) eredményei szerepeltek a vizsgálatban. Első lépésben az ún. 'C' értéket számítottuk ki (confusion probability = összetévesztési valószínűség) amely megadja annak a valószínűségét, hogy két véletlenszerűen kiválasztott fajta allélmintázata megegyezzen. Egy adott allél esetében a következő képlettel számolhatunk:  $c_i = p_i \frac{(Np_i - 1)}{N - 1}$ , míg egy adott

marker 'C' értékét alléljai  $c$  értékeinek összege adja meg:  $C_j = \sum_{i=1}^I c_i$

A markerek 'C' értékeinek segítségével azt is ki tudjuk számolni, hogy mi annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott fajta allélmintázata az összes marker esetében megegyezzen:  $PI = \prod_{j=1}^J C_j$  (probability of identity).

A 'C' értékek segítségével kiszámítható az adott markerrel nem megkülönböztethető párok száma is:  $x_j = \frac{N(N-1)}{2} C_j$  A primereket sorba egymás után számításba véve kiszámítható, hogy immár együttesen hány genotípus párt nem képesek megkülönböztetni egymástól. 'k' primer esetében ez az érték:  $X_k = \frac{N(N-1)}{2} \prod_{j=1}^k C_j$  (Tessier et al. 1999). Addig kell új primereket bevonni a számításba, míg a tapasztalati érték nulla nem lesz. Ebben az esetben az összes kialakítható genotípus pár megkülönböztethető egymástól.

A cluster analízishez minden detektálható allél jelenlétét (1) illetve hiányát (0) binárisan kódoltuk az összes fajta esetében. Ez egy 66 X 55-ös bináris mátrixot eredményezett, amelyet az SPSS 11.0 számítógépes programcsomaggal (SPSS Inc., USA) értékeltünk az UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic means) módszert és a Jaccard indexet alkalmazva (Jaccard, 1908).

## Eredmények

Mind a hat primer-párral sikerült megbízható és ismételhető mikroszatellit alléleket felszaporítanunk az összes fajta esetében; a kapott nagyfokú polimorfizmus alapján alkalmasnak bizonyultak a fajták megkülönböztetésére.

Az egyes mikroszatellit markerek esetében a felszaporított allélek száma 6 (CH04g10) és 13 (CH05e03) között változott (5. táblázat) az átlag 9.2-nek bizonyult. Az ismételt PCR reakciók és futtatások allélméretei minden esetben megegyeztek. Néhány esetben olyan új allélformák megjelenését is tapasztaltuk (5. táblázat), amelyeket a primerek kifejlesztését követő tesztelések során nem írtak le (Liebhard et al. 2002). Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a primereket csak nyolc genotípuson tesztelték, amit mi 66-ra bővítettük ki.

Ezzel magyarázható a PIC értékekben felfedezhető különbség is. Mivel négy fajta ('Fiesta', 'Florina', 'Prima', 'Starking') mind a két vizsgálatban szerepelt, ez jó alkalmat teremtett az eredmények ismételhetőségének a tesztelésére, amely a megbízhatóság elengedhetetlen követelménye. Ez minden esetben megegyezett, kivételt csak a CH05e03

marker képezett ahol három bp-nyi csúszást tapasztaltunk az értékekben, feltehetően az alkalmazott markerek különbözősége miatt.

**5. táblázat.** Az amplifikált allélok száma és mérettartománya (bp), a markerek PIC (Polymorphism Information Content) értéke (8: (Liebhard et al. 2002) illetve 66: (saját eredmény) genotípus eredményei alapján) és kromoszóma lokalizációja.  $PIC=1-\sum p_i^2$  (Anderson et al. 1993) A számított 'C' értéket az optimális primerkombináció kiválasztásához használtuk.

SSR név	<i>forward primer szekvencia</i> <i>reverse primer szekvencia</i> 5' → 3'	Allél	Allél-	PIC	Allél	Allél-	PIC	C
		méret	szám		méret	szám		
		Liebhard et al. 2002			Saját eredmény			
<b>CH03g07</b>	<i>aat aag cat tca aag caa tcc g</i> <i>ttt tic caa atc gag ttt cgt t</i>	119-181	5	0.77	119-179	7	0.74	0.235
<b>CH04e03</b>	<i>ttg aag atg ttt ggc tgt gc</i> <i>tgc atg tct gtc tcc tcc at</i>	179-222	11	0.88	178-222	12	0.77	0.206
<b>CH04g10</b>	<i>caa aga tgt ggt gtg aag agg a</i> <i>gga ggc aaa aag agt gaa cct</i>	127-168	5	0.83	127-168	6	0.60	0.377
<b>CH05c02</b>	<i>tta aac tgt cac caa atc cac a</i> <i>gcg aag ctt tag aga gac atc c</i>	168-200	4	0.60	160-200	7	0.70	0.256
<b>CH05d11</b>	<i>cac aac ctg ata tcc ggg ac</i> <i>gag aag gtc gta cat tcc tca a</i>	171-211	5	0.69	169-211	10	0.67	0.299
<b>CH05e03</b>	<i>cga ata ttt tca ctg tga ctg gg</i> <i>caa gtt gtt gta ctg ctg cga c</i>	158-190	10	0.87	160-193	13	0.83	0.128

**6. táblázat.** A mikroszatellit markerekkel felszaporított allélok méretei (bp) és azok gyakorisági megoszlása (%)

CH03g07		CH04e03		CH04g10		CH05c02		CH05d11		CH05e03	
méret	gyakoriság	méret	gyakoriság	méret	gyakoriság	méret	gyakoriság	méret	gyakoriság	méret	gyakoriság
<b>119</b>	25.6%	<b>178</b>	2.5%	<b>127</b>	4.4%	<b>160</b>	5.3%	<b>169</b>	13.7%	<b>160</b>	0.8%
<b>123</b>	17.6%	<b>184</b>	4.2%	<b>135</b>	60.0%	<b>168</b>	50.0%	<b>171</b>	5.1%	<b>163</b>	16.4%
<b>127</b>	9.6%	<b>186</b>	10.1%	<b>137</b>	14.4%	<b>170</b>	14.0%	<b>173</b>	53.0%	<b>164</b>	4.1%
<b>129</b>	38.4%	<b>190</b>	6.7%	<b>139</b>	1.1%	<b>172</b>	3.5%	<b>175</b>	10.3%	<b>168</b>	3.3%
<b>153</b>	0.8%	<b>196</b>	20.2%	<b>143</b>	8.9%	<b>174</b>	11.4%	<b>181</b>	0.9%	<b>172</b>	3.3%
<b>165</b>	4.0%	<b>198</b>	41.2%	<b>168</b>	11.1%	<b>176</b>	4.4%	<b>187</b>	2.6%	<b>173</b>	11.5%
<b>179</b>	4.0%	<b>202</b>	5.9%			<b>200</b>	11.4%	<b>195</b>	0.9%	<b>175</b>	0.8%
		<b>204</b>	3.4%					<b>197</b>	12.0%	<b>176</b>	0.8%
		<b>208</b>	2.5%					<b>205</b>	0.9%	<b>179</b>	15.6%
		<b>210</b>	1.7%					<b>211</b>	0.9%	<b>181</b>	0.8%
		<b>216</b>	0.8%							<b>185</b>	29.5%
		<b>222</b>	0.8%							<b>191</b>	9.8%
										<b>193</b>	3.3%

Ez is alátámasztja azt a nézetet, miszerint az allélek egymáshoz viszonyított relatív mérete a legfontosabb értékszám, mivel jónéhány tényező befolyásolhatja a fragmentumok gélben való mozgását és pontos méretük meghatározását.

Liebhard és mtsai (2002) 10 bp-os molekulatömeg (létra)markert használtak a kiértékeléshez, amely meglepő módon pontos eredményekhez juttatta őket, mivel a többi 5 marker esetében az allélméreték a mieinkkel megegyeztek. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy a CH05e03 marker esetében az említett szerzők a 'Starking' fajtára 186:188 bp méretű alléllösszetételt publikáltak le, míg mi az allélokat homozigótának találtuk (191:191) és nem 189:191-nek amit a három bp-nyi csúszást figyelembevéve kapnunk kellett volna. Mivel a 'Starking' fajta összes szomatikus rügmütánsa az adott marker esetében csak egy – 191 bp



méretű – fragmentumot produkált, feltételezhetően ez az allél homozigóta ezekben a fajtákban. A Liebhard és mtsai (2002) által kapott 186 bp méretű fragmentumot feltehetően a polimeráz enzim ‘csúsza’ okozta (stutter bands). Egy eltérést tapasztaltunk még az eredményeink között, a ‘Prima’ fajta esetében, ahol mi egy új allélt detektáltunk (165 bp) a CH03g07-es marker esetében.

Az allélek nagyobb száma általában magasabb PIC értékekkel jár együtt, azonban ez nem minden esetben van így. Ezt az egyes allélek gyakorisági megoszlásának a különbözőségével magyarázható, amelyet a 6. táblázat mutat be. Például a 10 alléllal jellemezhető CH05d11-es marker esetében a 173 bp méretű allél nagy gyakorisága alacsonyabb heterozigotizációs (PIC) értéket eredményezett, mint pl. a csak 7 alléllal – de azok egyenletesebb eloszlásával – jellemezhető CH03g07-es marker esetében. Szinte minden mikroszatellit marker esetében találhatunk egy-két nagy gyakorisággal jellemezhető allélt. Feltehetően ezek tekinthetők a mikroszatellit ismétlődések alapértékeinek, amelyekből a DNS replikáció során az ismétlődések számának növekedésével illetve csökkenésével alakulnak ki az új allélformák.

Az összes almafajta allélösszetételét mind a hat mikroszatellit markerrel a 7. táblázat mutatja be. Azokban az esetekben, ahol csak 1 fragmentum szaporodott fel, ezt az allélméretet kétszer tüntettük fel, mivel a genotípust homozigótának feltételeztük. Annak eldöntésére, hogy ez egy valódi homozigóta allél, vagy esetleg null alléllal állunk szemben, egy jól megválasztott keresztezést követő szegregáló populációra van szükség. (A gyakorlatban az adott fragmentum intenzitása alapján – a homozigóta allél csúcsa sokkal magasabb – következtethetünk erre.)

A heterozigóták aránya 41% és 83% közöttinek bizonyult, átlagosan 70%. Ezek az értékek hasonlóak a már többi szerző által leközlött eredményekhez (Gianfranceschi et al. (1998), Hokanson et al. (1998), Liebhard et al. (2002) és csak kicsit kisebbek a Laurens és mtsai (2004) által publikáltakhoz képest. A CH04g10-es marker eredményezte a legtöbb homozigóta allélt (59%) így a legkisebb az elkülönítő képessége.

Öt fajtánál kaptunk legalább egy marker esetében hármas allélmintázatot, ami a fajták triploid ploid szintjére utal, azonban közülük csak három valódi triploid fajta (‘Charden’, ‘Jonagold’, ‘Sir Prize’). Az ‘Akane’ and ‘Pinova’ fajták esetében a létszámfeletti allél feltehetően egy másik lókusztól szaporodott fel. Feltehetően nem a PCR reakciók melléktermékei, mivel többszöri ismétlésben is hasonló mintázatot mutattak. Arról, hogy több lókusztól is szaporíthatunk fel allélokat mikroszatellit primerekkel az alma esetében, már más szerzők is beszámoltak (Guilford et al. (1997) and Liebhard et al. (2002).

Érdekes módon a ‘Mutsu’ fajta esetében, amely egy közismert és közkedvelt triploid hibrid (Golden Delicious X Indo keresztezésből származik), minden marker esetében csak egy illetve két allélt sikerült felszaporítanunk, nem kaptunk hármas allélmintázatot. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a szülők allélméretei sok esetben megegyezhetnek, vagy nagymértékben homozigóták, vagy esetleg még null-allél(ok) is szerepet játszottak ebben.

7. táblázat. 66 almafajta allélmintázata az alkalmazott 6 mikroszatellit markerrel.

FAJTÁK	CH03g07	CH04e03	CH04g10	CH05c02	CH05d11	CH05e03
<b>Akane</b>	123:179	196:210:216	135:143	170:200	173:173	185:185
<b>Angold</b>	119:129	198:198	135:135	168:170	171:173	173:185
<b>Braeburn</b>	127:129	198:202	168:168	168:168	171:173	191:191
<b>Charden</b>	119:129:129	198:198:198	135:135:135	168:174:200	169:173:175	175:179:185
<b>Elstar</b>	119:119	190:198	135:135	168:170	173:187	164:179
<b>Red Elstar</b>	119:119	190:198	135:135	168:170	173:187	164:179
<b>Fiesta</b>	119:123	186:196	135:135	168:168	173:197	164:185
<b>Florina</b>	123:127	196:198	135:168	168:200	173:197	163:191
<b>Freedom</b>	129:129	198:198	135:135	168:168	173:187	179:191
<b>Fuji</b>	119:127	196:198	143:168	168:168	173:197	163:191
<b>Gala</b>	119:129	196:198	135:135	168:170	173:173	173:185
<b>Galaxy</b>	119:129	196:198	135:135	168:170	173:173	173:185
<b>Imperial Gala</b>	119:129	196:198	135:135	168:170	173:173	173:185
<b>Regal Prince (Gala Must)</b>	119:129	196:198	135:135	168:170	173:173	173:185
<b>Royal Gala</b>	119:129	196:198	135:135	168:170	173:173	173:185
<b>Gloster</b>	123:129	198:198	127:137	160:168	195:197	160:191
<b>Golden Delicious</b>	119:129	198:198	135:135	168:174	169:173	179:185
<b>Goldenir (Lysgolden)</b>	119:129	198:198	135:135	168:174	169:173	179:185
<b>Golden Reinders</b>	119:129	198:198	135:135	168:174	169:173	179:185
<b>Golden Spur</b>	119:129	198:198	135:135	168:174	169:173	179:185
<b>Gibson Golden Delicious</b>	119:129	198:198	135:135	168:174	169:173	179:185
<b>Goldstar</b>	119:129	190:198	135:143	168:170	173:173	185:193
<b>Granny Smith</b>	129:153	196:198	127:137	160:172	171:173	168:181
<b>Greensleeves</b>	129:129	190:198	135:143	170:174	171:173	173:185
<b>Idared</b>	123:129	186:198	135:135	168:200	173:197	172:185
<b>Red Idared</b>	123:129	186:198	135:135	168:200	173:197	172:185
<b>Jerseymac</b>	165:165	184:198	135:137	160:176	173:197	163:173
<b>Jonager</b>	123:127	196:196	135:135	170:200	173:175	168:185
<b>Jonagold</b>	119:123:129	186:198:198	135:135:135	168:174:200	169:173:175	163:179:185
<b>Jonathan</b>	119:123	186:196	135:135	168:200	173:175	163:185
<b>Jonathan M41</b>	119:123	186:196	135:135	168:200	173:175	163:185
<b>Jonathan Csányi1</b>	119:123	186:196	135:135	168:200	173:175	163:185
<b>Red Jonathan</b>	119:123	186:196	135:135	168:200	173:175	163:185

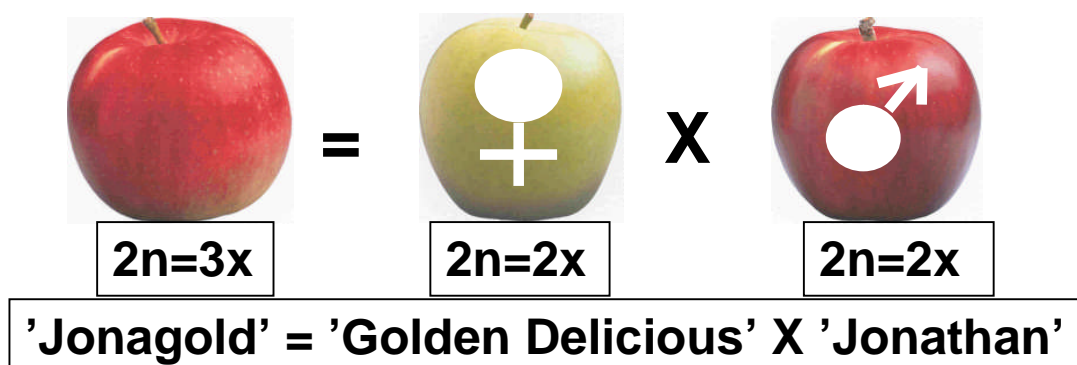
7. táblázat folytatása

FAJTÁK	CH03g07	CH04e03	CH04g10	CH05c02	CH05d11	CH05e03
<b>Szatmárcsekei Jonathan</b>	119:123	186:196	135:135	168:200	173:175	163:185
<b>Watson Jonathan</b>	119:123	186:196	135:135	168:200	173:175	163:185
<b>Judeline</b>	123:129	196:198	135:135	168:174	173:173	163:185
<b>Julyred</b>	165:165	184:198	135:143	160:176	175:197	163:163
<b>Liberty</b>	123:129	178:198	137:137	168:168	173:211	163:176
<b>McIntosh</b>	129:165	184:198	139:143	168:168	173:175	163:163
<b>Mizsei</b>	123:129	186:208	135:135	160:168	173:173	163:185
<b>Mutsu</b>	129:129:179	198:198:198	135:135:135	168:168:168	173:173:173	173:173:179
<b>Ozark Gold</b>	119:129	196:198	135:168	168:172	173:173	168:179
<b>Pilot</b>	129:179	196:196	135:135	168:168	173:173	164:185
<b>Pink Lady</b>	129:129	198:204	135:137	160:168	169:171	168:179
<b>Pinova</b>	119:127:129	198:222	127:135	168:174	169:173	163:179:185
<b>Piros</b>	165:179	196:198	135:135	168:176	173:175	173:173
<b>Poiana</b>	129:129	190:198	135:137	170:174	169:171	163:185
<b>Prima</b>	129:165	184:204	135:143	168:176	169:173	179:185
<b>Reanda</b>	119:129	196:208	135:137	168:168	173:181	173:185
<b>Red Rome Van Well</b>	123:129	186:198	135:135	168:168	173:173	163:163
<b>Red Stayman</b>	127:129	196:204	127:135	168:172	169:173	163:191
<b>Reglindis</b>	129:179	198:198	135:135	168:168	169:173	173:173
<b>Relinda</b>	123:129	196:208	135:143	168:172	173:173	172:185
<b>Remo</b>	119:123	178:190	135:135	168:170	173:173	163:172
<b>Rewena</b>	119:123	178:210	135:135	168:168	173:173	164:185
<b>Rubinola</b>	129:129	184:198	135:135	168:176	173:173	179:193
<b>Sampion</b>	119:129	190:198	135:135	170:174	169:173	179:193
<b>Sir Prize</b>	119:123:129	198:198:204	135:135:135	168:168:168	169:169:173	173:179:179
<b>Snygold</b>	129:129	198:198	135:135	170:174	173:205	173:179
<b>Starking Delicious</b>	127:129	198:202	137:168	168:168	173:197	191:191
<b>Starkrimson Delicious</b>	127:129	198:202	137:168	168:168	173:197	191:191
<b>Redchief Delicious</b>	127:129	198:202	137:168	168:168	173:197	191:191
<b>Redspur Delicious</b>	127:129	198:202	137:168	168:168	173:197	191:191
<b>Topred Delicious</b>	127:129	198:202	137:168	168:168	173:197	191:191
<b>Wellspur Delicious</b>	127:129	198:202	137:168	168:168	173:197	191:191
<b>Topaz</b>	119:129	190:198	135:135	168:168	169:173	185:193

**A 7. táblázat aláírása:** A számok az allélek pontos méretét jelentik bp-ban megadva. A primerekkel nem megkülönböztethető szomatikus mutánsok szürkével vannak kiemelve. Azoknál a triploid fajtáknál, ahol csak két allél szaporodott fel, az intenzívebb allélról feltételeztük, hogy két azonos méretű allélt tartalmaz. Ezt a feltételezett harmadik allélt dőlt betűvel jeleztük.

Az is előfordulhat, hogy ez csak véletlenül adódott így, mivel egy másik tanulmányban (Kitahara et al. 2005) a 10 alkalmazott mikroszatellit marker közül hat hármas allélmintázatot adott.

A kapott adatok megbízhatóságát támasztják alá a 'Jonagold' hibridfajta allélmintázatai is, amelyben a szülői allélmintázatok összeadódnak (2. ábra). Triploid hibrid úgy keletkezhet, ha differenciálatlan petesejtet termékenyít meg a pollen egyik generatív sejtjéje.



FAJTÁK	CH03g07	CH04g10	CH04e03	CH05c02	CH05d11	CH05e03
<b>Golden Delicious</b>	119:129	135 <sup>2</sup>	198 <sup>2</sup>	168:174	169:173	179:185
<b>Jonagold</b>	119:123:129	135 <sup>3</sup>	186:198:198	168:174:200	169:173:175	163:179:185
<b>Jonathan</b>	119:123	135 <sup>2</sup>	186:196	168:200	173:175	163:185

**2. ábra.** A 'Jonagold', 'Golden Delicious' és 'Jonathan' fajták mikroszatellit allélmintázata, amelyek segítségével nemcsak a 'Jonagold' hibrideredete bizonyítható, hanem az is, hogy a kialakításában a 'Jonathan' volt a pollenadó.

A CH04e03-mas marker a legáruklodóbb, mert ennél nincs megegyező méretű allél a két szülőfajtában. Ez alapján még az is megállapítható, hogy a 'Jonagold' fajta kialakításában a 'Jonathan' volt a pollenadó fajta, mivel csak a 186 bp méretű allélja szerepel a hibridben. A többi marker esetében ez azért nem derül ki, mert van a szülőknek azonos méretű alléljuk.

A vizsgált genotípusok között nem szerepel még egy olyan hibrid, amelynek mindkét szülőfajtája is jelen lenne. Olyan azonban több is, mikor csak az egyik szülő szerepel. A legtöbb esetben ez a 'Golden Delicious', amely 13 új fajta ('Angold', 'Charden', 'Elstar', 'Gala', 'Greensleeves', 'Jonagold', 'Mutsu', 'Ozark Gold', 'Pink Lady', 'Pinova', 'Sampion', 'Sir Prize', 'Snygold') előállításánál mint egyik szülőfajta szerepelt. A 8. táblázat allélmintázataiból egyértelműen látszik, hogy a 'Golden Delicious' legalább egy allélformája megtalálható kivétel nélkül minden hibridjében, ami szintén az eredmények használhatóságát támasztja alá.

Ezek alapján nyilvánvaló, hogy a mikroszatellit markerek kiválóan felhasználhatók hibridviszonyok nyomkövetésére, ismeretlen esetekben a szülői partnerek azonosítására is (Cabe et al. 2005, Kitahara et al. 2005).

8. táblázat: A 'Golden Delicious', és 13 olyan új hibrid allélmintázata, amelyek kialakításában a 'Golden Delicious' volt az egyik alkalmazott szülő.

Fajták	Pedigré	CH03g07	CH04e03	CH04g10	CH05c02	CH05d11	CH05e03
Angold	Antonovka o.p. x <u>Golden Delicious</u>	119:129	198:198	135:135	168:170	171:173	173:185
Charden	<u>Golden Delicious</u> x Clochard Renet	119:129:129	198:198:198	135:135:135	168:174:200	169:173:175	175:179:185
Elstar	<u>Golden Delicious</u> x Ingrid Marie	119:119	190:198	135:135	168:170	173:187	164:179
Gala	<u>Golden Delicious</u> x Kidd's Orange Red	119:129	196:198	135:135	168:170	173:173	173:185
Greensleeves	James Grieve x <u>Golden Delicious</u>	129:129	190:198	135:143	170:174	171:173	173:185
Jonagold	<u>Golden Delicious</u> x Jonathan	119:123:129	186:198:198	135:135:135	168:174:200	169:173:175	163:179:185
Mutsu	<u>Golden Delicious</u> x Indo	129:129:179	198:198:198	135:135:135	168:168:168	173:173:173	173:173:179
Ozark Gold	<u>Golden Delicious</u> x (Conrad x Red Delicious)	119:129	196:198	135:168	168:172	173:173	168:179
Pink Lady	Lady Williams x <u>Golden Delicious</u>	129:129	198:204	135:137	160:168	169:171	168:179
Pinova	Clivia x <u>Golden Delicious</u>	119:127:129	198:222	127:135	168:174	169:173	163:179:185
Sampion	<u>Golden Delicious</u> x Cox Orange renet	119:129	190:198	135:135	170:174	169:173	179:193
Sir Prize	<u>Golden Delicious</u> x PRI 14-152	119:123:129	198:198:204	135:135:135	168:168:168	169:169:173	173:179:179
Snygold	<u>Golden Delicious</u> magonca	129:129	198:198	135:135	170:174	173:205	173:179
<b>Golden Delicious</b>	<b>Grimes Golden magonca</b>	<b>119:129</b>	<b>198:198</b>	<b>135:135</b>	<b>168:174</b>	<b>169:173</b>	<b>179:185</b>

Speciális esetben még azt is meg tudjuk állapítani – ahogyan azt a ‘Jonagold fajta esetében is láttuk –, hogy a hibrid kialakítása során melyik fajta volt a pollen, illetve ovulum donor.

A vizsgált fajták molekuláris elkülönítéséhez (a szomatikus mutánsokat leszámítva) mindössze 4 mikroszatellit marker (CH03g07, CH04e03, CH05d11, CH05e03) is elegendőnek bizonyult (9. táblázat). A rügymutánsok egymástól és az alapfajtától is elkülöníthetetlennek bizonyultak. Ez nem is meglepő, mivel ezek a szomatikus mutánsok genetikailag nagyon közel állnak egymáshoz, genomjuk mindössze néhány kis régióban térhet el egymástól, ami a gyümölcs színezettség, vagy pl. zamat stb. eltéréseket okozhatja. Ezért véleményünk szerint nincs értelme ezeknél a fajtáknál az elkülönítéshez újabb mikroszatellit markereket bevonni, ezt a későbbiekben AFLP technikával tervezzük elvégezni.

9. táblázat. A fajták elkülönítéséhez szükséges markerek optimális kombinációjának kiválasztása.

Marker kombinációk	Elkülöníthetetlen párok száma	
	Tapasztalt	Számított
<b>CH05e03</b>	64	132.5
<b>CH05e03 + CH04e03</b>	10	27.3
<b>CH05e03 + CH04e03 + CH03g07</b>	2	6.4
<b>CH05e03 + CH04e03 + CH03g07 + CH05d11</b>	<b>0</b>	1.9

A számított ( $X_k$ ) és a tapasztalati értékek összehasonlítása Tessier és mtsai 1999 alapján. Ebben a vizsgálatban a szomatikus mutánsokat egy fajtának tekintettük.

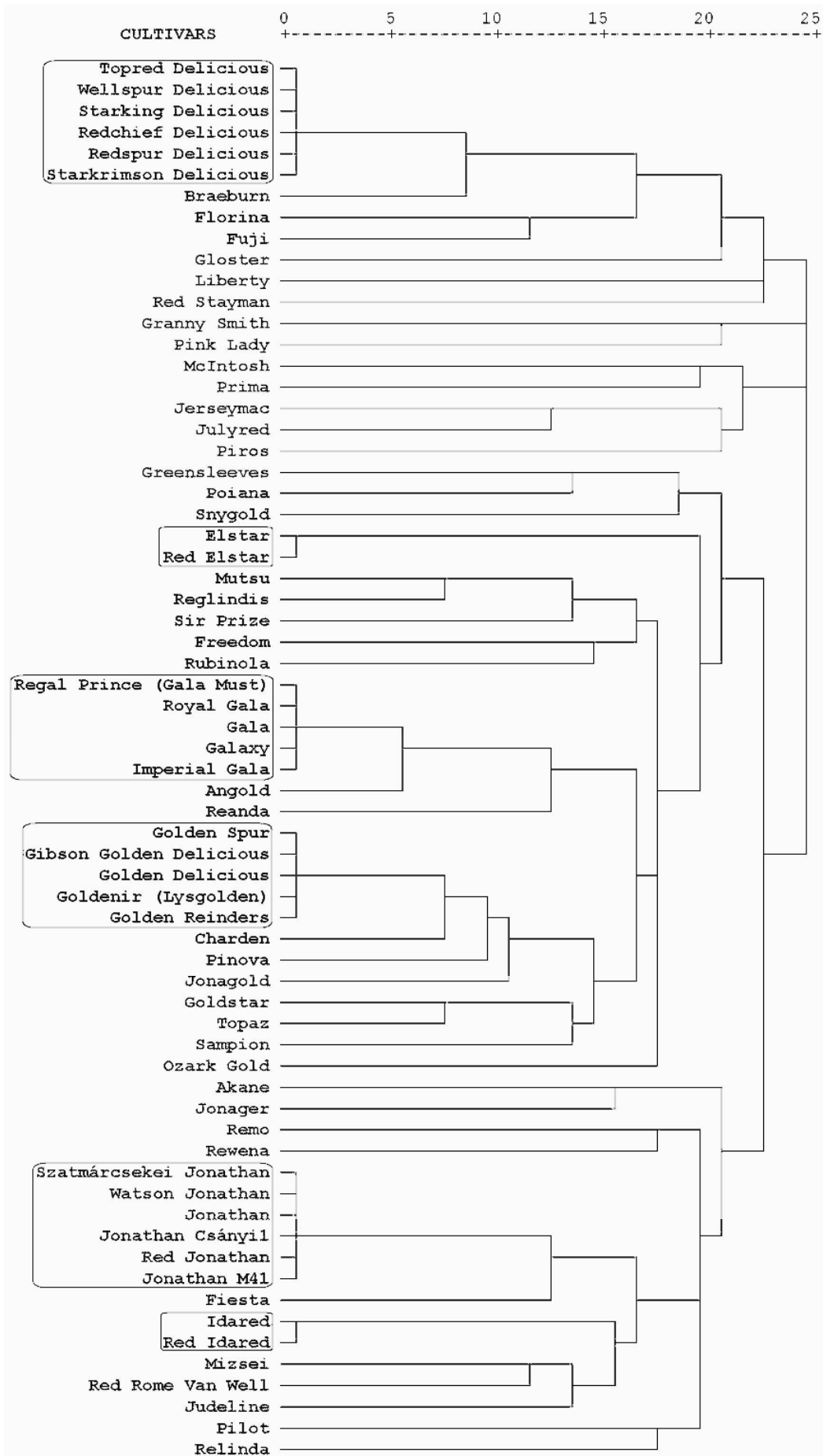
A három legmagasabb heterozigotitási értékkel bíró mikroszatellit markerrel (CH05e03, CH04e03, CH03g07) mindössze két genotípus pár (‘Topaz’ – ‘Goldstar’ és a ‘Starking’ – ‘Braeburn’) nem volt egymástól megkülönböztethető. A sorban a CH05c02-es marker a következő heterozigotitási szempontból, azonban ez a marker még mindig nem képes elkülöníteni a ‘Starking’ fajtát a ‘Braeburn’-től. A CH05d11-es marker azonban mindkét genotípus párt képes megkülönböztetni, ezért az elkülönítéshez azt a markert használtuk fel, függetlenül attól, hogy kicsit kisebb a heterozigotitási értéke, mint a CH05d11-es markernek.

Annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott fajta allélmintázata mind a 6 lókuszt esetében megegyezzen  $1.79 \times 10^{-4}$ -nek adódott, ami 1:5587 aránynak felel meg. Ez is bizonyítja, hogy a mikroszatellit markerek milyen nagyszerűen felhasználhatók almafajták elkülönítéséhez és hogy más típusú markerrendszerre csak a rügymutánsok elkülönítésénél lehet szükség.

Elkészítettük a 6 SSR lókuszt alapján a fajták dendrogramját is (3. ábra) amely az ismert pedigre adatokkal jól összhangban áll.

*Erwinia amylovora* - rezisztenciával kapcsolt markereket ezidáig ezekkel a mikroszatellit markerekkel nem találtunk.

3. ábra. A vizsgált fajták dendrogramja 6 SSR lókuszt eredményei alapján



A kutatásból készített közlemények jegyzéke

1. Dobránszki, J –Magyar-Tábori, K. – Jámbor-Benczúr, E. – Kiss, E. - Lazányi, J.– Bubán, T. Effects of conditioning of apple shoots with meta-topolin on the morphogenic activity of in vitro leaves. *Acta Agronomica Hungarica* 50(2) p. 117-126. 2002.
2. Magyar-Tábori K. –Dobránszki J. - Jámbor-Benczúr E. High in vitro shoot proliferation in the apple cultivar Jonagold induced by benzyladenine-analogues. *Acta Agronomica Hungarica* 50(2) p. 191-195. 2002.
3. Dobránszki, J. - Hudák, I. - Magyar-Tábori, K. - Jámbor-Benczúr, E. - Galli, Zs. - Kiss, E. Role of different cytokinins in the shoot regeneration of apple leaves. *Plant Biotechnology: Progress & Developments*, September 7-13. 2003., Stara Lesna, Slovak Republic. p. 9.
4. Hudák, I. - Dobránszki, J. - Magyar-Tábori, K. - Jámbor-Benczúr, E. - Galli, Zs. - Kiss, E. Effects of benzyladenine analogues on the organogenetic ability of apple leaves. *Plant Biotechnology: Progress & Developments*, September 7-13. 2003., Stara Lesna, Slovak Republic. p. 22.
5. Dobránszki, J. - Jámbor-Benczúr, E. - Hudák, I. - Magyar-Tábori, K. Aromás oldalláncú citokininek hatása in vitro alma levél szöveti szerkezetére. Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly *Tudományos Ülésszak*. 2003. november 6-7., Budapest. p. 72-73.
6. Dobránszki, J. - Jámbor-Benczúr, E. - Magyar-Tábori, K. - Kiss, E. Effects of aromatic cytokinins on leaf histology regarding subsequent shoot regeneration in apple. COST843 Action WG1., Oviedo, Spain 28<sup>th</sup> January- 1<sup>st</sup> February 2004. p.3-4.
7. Dobránszki, J. - Hudák, I. - Magyar-Tábori, K. - Jámbor-Benczúr, E. - Galli, Zs. - Kiss, E. Effects of different cytokinins on the shoot regeneration from apple leaves of 'Royal Gala' and 'M.26'. *International Journal of Horticultural Science* 10(1): 69-75. 2004.
8. Dobránszki, J. - Hudák, I. - Magyar-Tábori, K. - Jámbor-Benczúr, E. - Galli, Zs. - Kiss, E. How can influence different cytokinins the process of shoot regeneration from apple leaves in 'Royal Gala' and 'M.26'. 5th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. September 12-17. 2004. Debrecen p. 108.
9. Galli, Z. - Halász, G. – Kiss, E. – Dobránszki, J. – Kutyik, T. – Agócs, E. - Heszky, L.E. Using SSR markers to distinguish apple cultivars. 5th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. September 12-17. 2004. Debrecen p. 199.
10. Hudák, I. - Dobránszki, J. - Magyar-Tábori, K. - Jámbor-Benczúr, E. - Galli, Zs. - Kiss, E. Effects of aromatic cytokinins on the organogenesis in apple. COST843 Final Conference, COST843 and COST851 Joint Meeting. 28<sup>th</sup> June-3<sup>rd</sup> July 2005. Stara Lesna, Slovak Republic. Book of Abstracts. ISBN 80-89088-41-4 p. 82-84.
11. Dobránszki, J. - Hudák, I. - Magyar-Tábori, K. - Jámbor-Benczúr, E. - Galli, Zs. - Kiss, E. Role of different cytokinins in the process of shoot regeneration from apple leaves. COST843 Final Conference, COST843 and COST851 Joint Meeting. 28<sup>th</sup> June-3<sup>rd</sup> July 2005. Stara Lesna, Slovak Republic. Book of Abstracts. ISBN 80-89088-41-4 p. 79-81.
12. Dobránszki, J. - Jámbor-Benczúr, E. - Reményi M. L. - Magyar-Tábori, K. - Hudák, I. - Kiss, E. - Galli, Zs. Effects of aromatic cytokinins on structural characteristics of leaves and their post-effects on subsequent shoot regeneration from in vitro apple leaves of 'Royal Gala'. *International Journal of Horticultural Science* 1 (11): 41-46. 2005.
13. Galli, Z. - Halász, G. – Kiss, E. – Heszky, L.E. – Dobránszki, J. Molecular Identification of Commercial Apple Cultivars with Microsatellite Markers. *HortScience*. 40(7):1974-1977. 2005.
14. Galli, Zs. - Halász, G. – Kiss, E. – Dobránszki, J. - Heszky, L. Molecular Fingerprinting of Commercial Apple Cultivars. *Hungarian Agricultural Research*. 14(3). p. 4-8. 2005.