

HAZAI SZILVA- ÉS KÖKÉNYGENOTÍPUSOK GENETIKAI JELLEMZÉSE MIKROSZATELLIT MARKEREKKEL

MAKOVICS-ZSOHÁR NOÉMI¹, SURÁNYI DEZSŐ², TÓTH MAGDOLNA³, KOVÁCS SZILVIA³,
SZÓKE FERENC⁴, HEGEDŰS ATTILA¹, HALÁSZ JÚLIA¹

¹Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék

²Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Gyümölcssteresztési Kutatóintézet Ceglédi Kutató Állomás

³Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermi Növények Tanszék

⁴4633 Lövöpetri, Petőfi u. 17.

KULCSSZAVAK: *Prunus spinosa*, *Prunus insititia*, *Prunus domestica*, SSR

A poliploid kökény (*Prunus spinosa* L. (2n = 4x)), a *Prunus insititia* Jusl. (2n = 6x) és az európai szilva (*Prunus domestica* L. (2n = 6x)) jelentős genetikai potenciált képviselnek Közép-Európában, ezáltal igen értékes alapanyagoknak számítanak a különböző nemesítési programokban. Mikroszateellit (SSR) markerek segítségével jellemeztük 17 kökény, kökényszilva és további 18 európai szilva tájfajta genetikai variabilitását és megkülönböztethetőségét, illetve filogenetikai kapcsolatát, mivel a vizsgált genotípusok genetikai hátterére vonatkozóan semmilyen molekuláris vizsgálat nem történt korábban. Diploid *Prunus*-fajok jellemzésére tervezett, öt SSR primert alkalmaztunk. Mind az 5 lokusz polimorfnek bizonyult, összesen 122 allélt mutattunk ki. Ez átlagosan 24,4 allélt jelent lokuszonként. A legnagyobb allélszámot (33) a CPSC021 és CPDCT044 lokuszokon állapítottuk meg, míg a legkisebbet (9) a BPPCT037 lokusz mutatta. A filogenetikai vizsgálat és a PCA analízis során kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a kökény és kökényszilva genotípusokat és az európai szilva tájfajtákat jelentős mértékű genetikai variabilitás jellemzi. Az eredmények mind gyakorlati, mind kultúrevolúciós szempontból értékes információt adtak, és további vizsgálatok fontos alapját képezik.

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Félszázánál több vad gyümölcsfaj honos a Kárpát-medencében, közöttük a kökény, a cseresznyeszilva és az európai szilva is, amit archeobotanikai leletek támasztanak alá. A kökény (*Prunus spinosa* L.) a *Rosales* renden belül a *Rosaceae* családba, a *Prunoideae* alcsaládba és a *Prunus* nemzetségbe tartozó vadgyümölcs. Európában őshonos faj, mely az egész világot meghódította a sarkkörök és Izland kivételével. Allotetraploid (2n = 4x = 32), őnméddő faj (REYNDERS-ALOISI és GRELLET, 1994; NUNES et al., 2006).

Feltételezések szerint a kökény a természet szilvának (*Prunus domestica* L.) az egyik őse lehet (CRANE és LAWRENCE, 1934). Egy korábbi elmélet szerint, szabadföldi keresztezési kísérletek alapján a tetraploid kökény és a diploid cseresznyeszilva (*Prunus cerasifera* Ehrh., 2n = 2x = 16) spontán hibridizációjával alakulhatott ki az allohexaploid szilva (2n = 6x = 48) ma ismert formája (RYBIN, 1936). További vélemények azonban (SALESSES, 1975) nem tartják elfogadhatónak a kökény szülőpartnerként való elismerését. Egy másik elmélet az európai szilva allopoliploid származását cáfolja, mely szerint egyedüli őse a *P. cerasifera* 2x, 4x, vagy 6x kromoszómaszámmal rendelkező változata lehet (ZOHARY, 1992). Így a szilva eredete mindmáig nem tisztázott teljesen, de az európai fajok közös őse bizonyosan Kelet-Ázsiából származik (CHIN et al., 2014). Termesztése azonban csaknem 5000 évre nyúlik vissza (TÓTH és SURÁNYI, 1980). A szilva alapfajai (kökény, cseresznyeszilva) és néhány európai szilva- és kökényszilva-típus honos hazánkban. A nyírségi (Besztercei, Nemtudom), Duna-Tisza közí és a borsodi (Bódi, Lószemű és Besztercei) termesztőtájak a legjelentősebbek (OKÁLYI, 1954; MOHÁCSY, 1960; TÓTH és SURÁNYI, 1980; SURÁNYI, 2006); a Duna-Tisza-közi, csongrádi (Vörös szilva) és a békési (Vörös szilva) termesztőtáj kisebb jelentőségű (TÓTH és SURÁNYI, 1980; SURÁNYI, 2006a). A szilva hazánkban taxonómiai és genetikai szempontból igen változatos képet mutat, amely nagyrészt a különböző *Prunus*-fajok spontán hibridizációjának köszönhető, ráadásul a helyi tájfajtákat évszázadokon át magról és sarjról egyaránt szaporították. A tájfajták fenntartása nemcsak az agrobiodiverzitás növelését jelenti, hanem értékes nemesítési alapanyagként is szolgálhat, így az „on farm” gén-

megőrzés nemcsak kulturális, hanem gazdasági szempontból is fontos törekvés.

A hazánkban fellelhető szilva tájfajták genetikai hátteréről eddig semmilyen információ nem volt elérhető, mivel a genetikai vizsgálatokat a poliploid genom jelentősen megnehezíti. A mikroszateellit markerezés (SSR: Simple Sequence Repeat = egyszerű szekvenciásméltódás) egy PCR-technikán alapuló molekuláris markerezési módszer (JACOB et al., 1991). A mikroszateellit a genomban tandem ismétlődő DNS-szekvenciamotívumok, melyek 2–5 bázispár méretűek lehetnek, általában a DNS nem-kódoló régiókban. Az SSR-régiók biztosította variabilitást számos *Prunus*-fajnál felhasználták a fajták azonosítására, illetve az egyes fajok filogenetikai elemzésére, a fajtaeredet és -azonosság igazolására (HORVATH et al., 2011). Génbanki tételek átfogó vizsgálatára is SSR-markereket használtak görög (MERKOUROPOULOS et al., 2016), svéd és norvég (SEHIC et al., 2015), tunéziai (TAMARZIT et al., 2015), valamint horvát és szerb (KAZIJA et al., 2014) szilvagűjtemények esetében.

Célkitűzéseink között szerepelt, hogy mikroszateellit markerek segítségével jellemezzük a kökény, kökényszilva és európai szilva tájfajta genetikai variabilitását és megkülönböztethetőségét. Továbbá eredményeink a fajok kultúrevolúciós kapcsolataira vonatkozó információval is gazdagíthatják ismereteinket, és adatokat adhatnak akár a *Prunus domestica* régóta vitatott eredetének tisztázásában is.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatainkba 17 kökény-, kökényszilva-fajtajelöltet (10 *P. spinosa* L., 4 *P. insititia* L. és 3 *P. spinosa* × *P. domestica*), illetve 18 európai szilva tájfajtát (*P. domestica* L.) vontunk be (1. táblázat).

A növények teljes genomi DNS-tartalmát fiatal levelekből, illetve rügyekből vontuk ki DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével, a gyártó utasításait követve. A DNS-kivonat mennyiségi és minőségi paramétereit NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) készülékkel ellenőriztük.

A mikroszateellit régiók amplifikálásához 5 primerpárt használtunk, amelyeket különböző *Prunus*-fajok vizsgálatára terveztek (2. táblázat). A PCR-t PTC 200 (MJ Research, Quebec, Kanada) típusú készülékben végeztük a primerekhez közlő, eltérő protokollok alapján. A PCR-reakcióhoz körülbelül 20–80 ng DNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban. A 10 × DreamTaq™ Green puffer (Fermentas, Szeged) KCl-ot és (NH₄)₂SO₄-ot is tartalmazott a DreamTaq™ DNS-polimeráz enzim (Fermentas) megfelelő működéséhez szükséges arányban. A PCR-reakcióelegy végső koncentrációja 4,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM az adott primerekből és 0,75 U DreamTaq™ DNS-polimeráz enzim volt.

A PCR sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A PCR-termékeket 1%-os TBE agarózgélben választottuk szét (30 perc, 80 V) és etidium-bromidos festéssel, UV-fénnyel átvilágítva tettük láthatóvá, 1 kb+ DNS-markert (Promega, Mannheim, Németország) használtunk. A PCR-fragmentumok méretének meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) automata DNS-szekvenátorral történt, amihez az 5' végen fluoreszcensen jelölt forward primereket használtunk a PCR során. A kapott adatokat az ABI Peak Scanner 1.0 programmal (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) elemeztük.

A hierarchikus klaszteranalízishez a fragmentumokat tartalmazó adatsort bináris formába alakítottuk át, ahol minden egyes fragmentum jelenlétét 1, míg hiányát 0 jelzi. A bináris adatokból a Jaccard-indexen alapuló genetikaitávolság-mátrix használatával dendrogramot szerkesztettünk, és 1000 ismétléssel bootstrap analízist végeztünk a PAST program (HAMMER et al., 2001) segítségével. A főkomponens-analízist (PCA) szintén a PAST szoftverrel hajtottuk végre.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITÁSUK

AZ SSR-LÓKUSZ POLIMORFIZMUSA

A vizsgálat során 5 primerpárt használtunk (2. táblázat), amelyeket különböző *Prunus*-fajokra terveztek és sikeresen alkalmaztak (DIRLEWANGER et al., 2002; MNEJJA et al., 2004; 2005). A több *Prunus*-fajnál is polimorfnek bizonyuló lokuszokat választottuk ki a vizsgálatainkhoz. Az SSR-szakaszokat határoló régiók

A VIZSGÁLT NÖVÉNYEK RENDSZERTANI BESOROLÁSA ÉS EREDETE

1. táblázat

GENOTÍPUS VAGY FAJTANÉV	FAJ	EREDET (TELEPÜLÉS, MEGYE VAGY ORSZÁG)
A1	<i>P. spinosa</i>	Apagy (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
B3	<i>P. insititia</i>	Berkesz (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
D2	<i>P. spinosa</i>	Szeghalom (Békés megye)
D4	<i>P. spinosa</i>	Mezőberény (Békés megye)
D5	<i>P. spinosa</i>	Mezőberény (Békés megye)
L1	<i>P. spinosa</i> × <i>P. domestica</i>	Lövöpetri (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
L2	<i>P. spinosa</i> × <i>P. domestica</i>	Lövöpetri (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
L4/1	<i>P. spinosa</i> × <i>P. domestica</i>	Lövöpetri (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
L5	<i>P. spinosa</i>	Lövöpetri (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
S2	<i>P. spinosa</i>	Sárospatak (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
S3	<i>P. spinosa</i>	Sárospatak (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
S3/B	<i>P. spinosa</i>	Sárospatak (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
T1	<i>P. insititia</i>	Mezőladány (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
T4	<i>P. insititia</i>	Mezőladány (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
U1	<i>P. spinosa</i>	Ujkenéz (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)
Z1	<i>P. insititia</i>	Nagykapos (Szlovákia)
Z3	<i>P. spinosa</i>	Pácin (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Besztercei Bb. 398	<i>P. domestica</i>	Cegléd (Pest megye)
Besztercei Nm.122.	<i>P. domestica</i>	Érd (Pest megye)
Besztercei	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Besztercei Nm.150.	<i>P. domestica</i>	Érd (Pest megye)
Besztercei Bt. 2	<i>P. domestica</i>	Cegléd (Pest megye)
Besztercei 105-58	<i>P. domestica</i>	Cegléd (Pest megye)
Fehérszilva 1.	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Fehérszilva 2.	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Fehérszilva 3.	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Fehérszilva 4.	<i>P. domestica</i>	Zádorfalva (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Vörös szilva 1.	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Vörös szilva 2.	<i>P. domestica</i>	Zádorfalva (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Vörös szilva 3.	<i>P. domestica</i>	Zádorfalva (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Gömöri nyakas 1.	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Gömöri nyakas 2.	<i>P. domestica</i>	Balog (Szlovákia)
Bódi szilva 1.	<i>P. domestica</i>	Aggtelek (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Bódi szilva 2.	<i>P. domestica</i>	Zádorfalva (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Nemtudom P3	<i>P. domestica</i>	Újfehértó (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye)

evolúciósan konzerváltak, így az egyes nemzetségek különböző fajainak elemzésére általában sikeresen használhatók (GHARBI et al., 2014; HORVATH et al., 2011).

Minden egyes lókuszt polimorfának bizonyult. A genotípusokban valamennyi primerpár használatkor 1-6 allélt detektáltunk. A tetraploid fajok esetében legfeljebb négy, a hexaploid fajoknál legfeljebb hat allél volt azonosítható. Amennyiben kevesebb allél fordult elő, feltételeztük, hogy valamelyik allél vagy allélok több példányban vannak jelen, de hogy pontosan melyik, az az SSR-vizsgálattal nem azonosítható. Az összes

A VIZSGÁLATHOZ FELHASZNÁLT, *PRUNUS*-FAJOKRA TERVEZETT MIKROSZATELLIT PRIMEREK

2. táblázat

SSR-LÓKUSZ	SZEKVENCIA (5' → 3')	FAJ	REFERENCIA	MÉRETTARTOMÁNY (BP)	ISMÉTLŐDŐ MOTÍVUM	PRIMERKÖTÉSI HŐMÉRSÉKLET (°C)
BPTCT007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTCTGAAGTTAGCGGTA	őszibarack	Dirlewanger et al. (2002)	143-151	(AG) ₂₂ (CG) ₂ (AG) ₄	57
BPPCT025	F: TCCTGCGTAGAAGAAGGTAGC R: CGACATAAAGTCCAATGGC	őszibarack	Dirlewanger et al. (2002)	178-202	(GA) ₂₉	57
BPPCT037	F: CATGGAAGAGGATCAAGTGC R: CTTGAAGGTAGTGCCAAAGC	őszibarack	Dirlewanger et al. (2002)	146-156	(GA) ₂₅	57
CPSCT021	F: GCCACTTCGGCTAAAAGAGA R: TCCATATCTCCTCTGCTTGA	japán szilva	Mnejja et al. (2004)	125-151	(GA) ₁₅	46
CPDCT044	F: ACATGCCGGGTAATTAGCAA R: AAAATGCACGTTCTGCTCC	mandula	Mnejja et al. (2005)	163-185	(GA) ₂₁	58

lókuszban 122 allélt találtunk, ez azt jelenti, hogy az átlagos allélszám 24,4 lókuszonként (3. táblázat). A legtöbb különböző allélt a CPSCT021 és a CPDCT044 lókuszokban azonosítottuk, mindkettőben külön-külön 33-at, míg a legkisebb allélszámot a BPPCT037 lókusz mutatta, ahol csupán 9 allél volt kimutatható. A BPTCT007 lókuszban 17 és BPPCT025 lókuszban 30 különböző allélt találtunk. A vizsgált 5 lókuszban a BPTCT007 lókusz egyedisége abban rejlik, hogy mind a kökény és kökényszilva genotípusokban, mind a szilva genotípusokban ugyanazokat az allélokat találtuk. A többi lókuszban is csupán kisebb eltérések voltak kimutathatók. A vizsgált öt lókusz adatait összegezve 100–268 bp között változott az allélok mérete. A legnagyobb mérettartománnyal a CPDCT044 lókusz rendelkezett, itt az allélok mérete 162–268 bp között mozgott. A legkisebb mérettartománya a BPPCT037 lókuszban volt tapasztalható (100–130 bp).

Mivel az allélszám szinte mindegyik lókuszban jelentős volt, az 5 lókusz alapján is mind a 17 kökény és kökényszilva egyed a 18 szilva tájfajtatól és egymástól is egyértelműen elkülöníthető volt és eltérő genotípussal rendelkezett. A kökénymintáknál négynél több allélt nem találtunk, a kökényszilva-genotípusokban és a vélt hibridekben több lókuszban is előfordult öt különböző allél. Az európai szilva genotípusok esetében viszont az 5 lókuszból 4-ben detektáltunk 6 allélt, és csak egy lókuszban volt kimutatható ennél kevesebb allél. Az ivaros szaporodó és idegentermékenyülő *Prunus*-fajok körében nem meglepő a jelentős mértékű genetikai variabilitás (MAKOVICS-ZSOHÁR és HALÁSZ, 2016). Az egyes genotípusok ploidszintjét mikroszateellit markerekkel nem lehet egyértelműen meghatározni, de az adatok segítséget nyújthatnak a kérdéses esetekben. Azok a kökény genotípusok, ahol több lókuszban is 4 allélt detektáltunk, nagy valószínűséggel tetraploidok (D2, L5, U1, Z3), a lókuszonként 5 alléllal jellemzett genotípusok penta- vagy hexaploidok lehetnek (T1, T4, B3). Az európai szilva hexaploid jellegét mutatja az egyes fajtáknál a vizsgált lókuszok többségében azonosított hat allél.

Az utóbbi években számos tanulmány foglalkozott *Prunus*-fajok SSR-analízisével, a BPTCT007, BPPCT025 és BPPCT037 lókuszokat tesztelték cseresznye, szilva és *P. cerasifera* genotípusokon is (DIRLEWANGER et al., 2002). A BPTCT007 lókusz kökény esetében az eredményeinkhez hasonló mérettartományt és allélszámot mutatott (HORVATH et al., 2011). A CPSCT02 és CPDCT044 lókuszok japánszilva és őszibarack esetében jóval kevesebb allélt mutattak, mint a vizsgált szilvafélékben, valószínűleg a magasabb ploidszint miatt (MNEJJA et al., 2005).

■ A VIZSGÁLT EGYEDEK GENETIKAI TÁVOLSÁGA

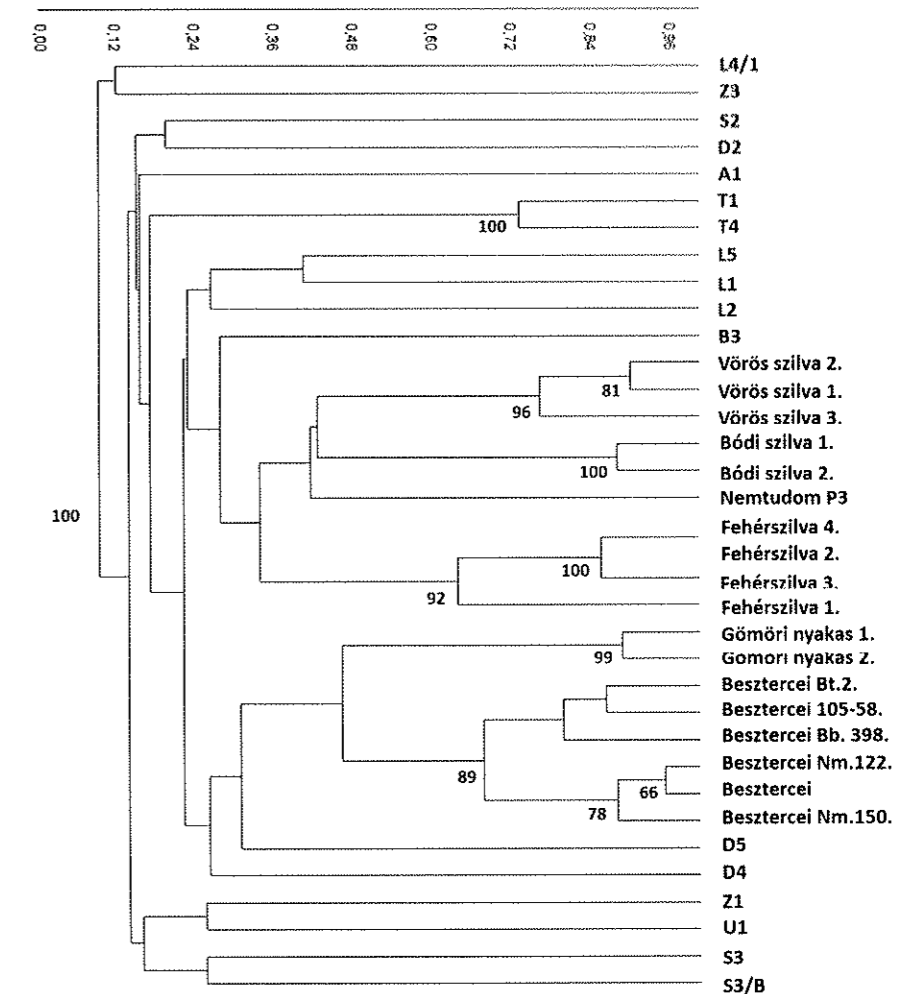
Mivel a vizsgált növényanyag a Kárpát-medence különböző pontjairól származik, genetikai hátterük nagy valószínűséggel eltérő, különösen az idegentermékenyülők esetében. Az 5 mikroszateellit markerrel kapott adatokkal klaszteranalízist végeztünk a PAST program segítségével, melynek az eredményét dendrogram szemlélteti

A VIZSGÁLT NÖVÉNYEK RENDSZERTANI BESOROLÁSA ÉS EREDETE

3. táblázat

LÓKUSZ	BPTCT007	BPPCT025	BPPCT037	CPST021	CPDCT044
Allélméret (bp)	122	132	100	120	162
	124	140	108	122	170
	126	142	110	124	180
	128	144	114	126	186
	130	150	116	128	198
	132	152	118	130	204
	134	154	120	132	206
	136	156	126	134	208
	138	158	130	136	210
	140	160		138	212
	142	162		140	214
	144	164		142	216
	146	166		144	218
	148	168		146	220
	150	170		148	222
	152	172		150	224
	154	174		152	226
		178		154	228
		180		156	230
		182		158	232
		184		160	234
		186		162	236
		188		164	238
		190		166	240
		192		170	242
		194		172	244
		206		174	246
		208		176	248
		210		180	250
		212		182	252
				184	254
				200	260
				208	268
Allélok száma	17	30	9	33	33

(1. ábra). A genetikai távolságok a fajok és fajták közötti rokonsági kapcsolatokat tükrözik. A szilva tájfajták önálló alcsoportokat képeznek a kökény és kökényszilva genotípusok között. A szilva tájfajták között az azonos névvel szereplő genotípusok közül csupán a Fehérszilva 4 és a Fehérszilva 2 mutatott 100%-os azonosságot. A többi esetben az azonos név alatt nem teljesen azonos genotípusokat találtunk, hiszen a vizsgált 5 lókuszt alapján is különbségek mutatkoztak a Vörös szilva, Gömöri nyakas és Bódi szilva néven különböző területekről begyűjtött genotípusok között. A tájfajták sok esetben a hasonló morfológiai bélyegek alapján azonos elnevezés alá kerültek, és mivel hosszú időn át magról is történt a szaporításuk (HARSÁNYI, 1997; SURÁNYI, 2006a; 2014; TÓTH et al., 2007), genetikailag nem egyöntetűek, de nagymértékben hasonlóak. Vizsgálati eredmé-



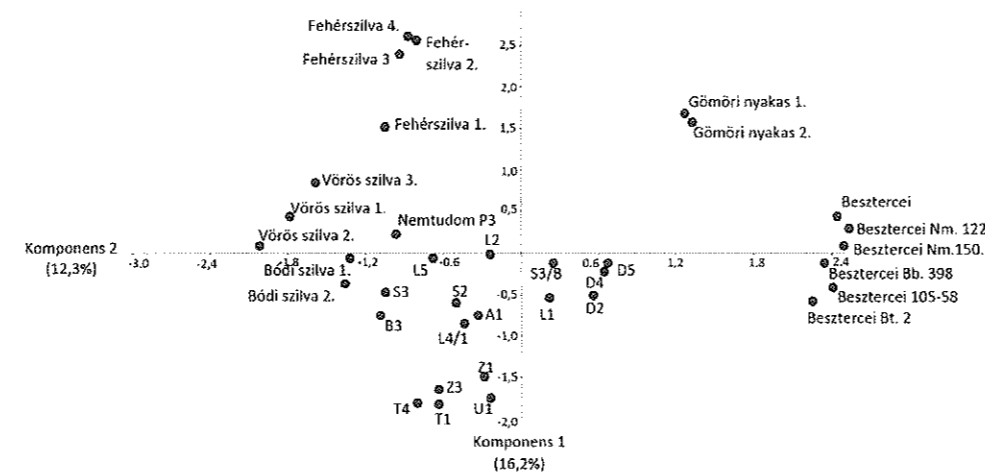
1. ÁBRA A vizsgált kökény, kökényszilva és fajhibridek, valamint az európai szilva tájfajták genetikai hasonlóságát ábrázoló, szomszédösszevonó (neighbor joining) algoritlussal készített dendrogram. Az 50%-nál nagyobb bootstrap értékek a statisztikailag megbízható kládokat jelölik.

nyeink adták az első kísérleti bizonyítékot e korábbi feltételezésekre. Genetikai különbségük néhány esetben morfológiailag is alátámasztható (TÓTH M. szóbeli közlés). Mindenképpen érdemes volna nagyobb mintaszám bevonásával feltérképezni a hazai tájfajták helyzetét e tekintetben. A Besztercei szilvák esetében régóta köztudott a fajtakörön belüli variabilitás, és a leromlás miatt indokolt volt a szelekció. A klónszelekcióval kiválasztott klónokról szóló első leírások (HARSÁNYI, 1979) szerint érési időben, gyümölcsnagyságban és termőképességben jobbak az alapfajtánál, majd a későbbi leírások (SURÁNYI, 2006a) már csak a termőképességben mutatkozó különbséget említik. A ceglédi génbank 50 Besztercei klónfajtájának vizsgálata eltéréseket mutatott több mint 10 különböző morfológiai paraméterben, valamint a PPV-ellenállóság mértékében is (SURÁNYI, 2006b). Az általunk vizsgált 6 Besztercei szilva mindegyike különböző SSR-genotípust mutatott, két csoportba sorolódtak 3-3 mintával, és külön alcsoportot képeztek a többi szilvafajta között.

A kőkény nagyon népszerű, egyre több célra felhasznált növény. Napjainkban gyümölcsét és virágát szinte kizárólag vadon termő növényekről gyűjtik. Ugyanakkor egyre nagyobb mértékű felhasználása miatt kifejezetten szükség lenne megbízhatóan termő, természetesen értékes fajtákra. Magyarországon Szőke Ferenc magánemesítő az elmúlt évtizedekben számos gazdaságilag értékes fajtajelöltet állított elő szelektív, és kisebb mértékben keresztezéses nemesítéssel. A fajtajelölteket szintén bevontuk a vizsgálatba genetikai háttérük feltérképezése érdekében. A fajtajelöltek között *P. spinosa*, *P. insititia*, valamint *P. spinosa* × *P. domestica* eredetű növények is találhatók (1. táblázat).

Az összes egyedről az L4/1-es és a Z3-as genotípusok különböznek a legjobban, külcsoportot képeznek, vagyis genetikailag ezek az egyedek esnek legtávolabb az összes többitől. A fajhibridék is egy kládot alkotnak a genom hibrid eredete miatt. Érdekes jelenség, hogy a Z1-es genotípus, amelyet *P. insititia*-nak feltételezt a nemesítő, a dendrogramon a *P. spinosa* genotípusok közé csoportosul. Ez azt jelenti, hogy a morfológiai bélyegek alapján történő besorolás nem feltétlenül vezet helyes eredményre.

A főkomponens-analízis (PCA) megerősítette a klaszteranalízis során nyert eredményeinket (2. ábra). Az első két főkomponens a teljes variabilitás 16,2%, illetve 12,3%-át magyarázza meg. A PCA vizsgálat rámutatott, hogy a Besztercei szilvák szépen elkülönülő csoportja jelentős genetikai távolságban áll a többi szilva, kőkényszilva és kőkény genotípustól. Az első főkomponens koordinátája határozottan elkülönítette egymástól a Fehérszilva tájfajtákat és a kőkény és kőkényszilva egyedek közül a T1, T4, U1, Z1 és a Z3 genotípusokat. A második főkomponens mentén a Besztercei és Gömöri nyakas szilvák csoportjai elkülönültek el megbízhatóan. A kőkény és kőkényszilva fajtajelöltek S-genotípusa a rokonsági kapcsolatokra vonatkozó eredményeinknek megfelelő képet mutatott (HALÁSZ et al., 2016).



2. ÁBRA A *Prunus spinosa*, *P. insititia*, *P. spinosa* × *P. domestica* és a *P. domestica* egyedek genetikai távolságát bemutató főkomponens analízis vizsgálat eredménye

A filogenetikai vizsgálat és a PCA analízis eredményei alapján megállapítható, hogy a kőkény genotípusokat és a szilva tájfajtákat jelentős mértékű genetikai variabilitás jellemzi. Igazoltuk továbbá, hogy a vizsgált egyedek mindegyike megkülönböztethető mindössze 5 SSR-markerral, ami a megnövekedett ploid szintből következő nagyobb allélszámmal magyarázható.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tanulmány elkészítése az OTKA K 112554 pályázat, az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-3-I.5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program (Makovics-Zsohár Noémi) valamint az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Halász Júlia) támogatásával készült.

CHARACTERIZATION OF HUNGARIAN PLUM AND BLACKTHORN GENOTYPES USING SSR MARKERS

MAKOVICS-ZSOHÁR, N.¹, SURÁNYI, D.², TÓTH, M.³, KOVÁCS, SZ.³, SZŐKE, F.⁴, HEGEDŰS, A.¹, HALÁSZ, J.¹

¹Szent István University of Budapest, Faculty of Horticultural Science, Department of Genetics and Plant Breeding

²National Agricultural Research and Innovation Centre, Fruticulture Research Institute

³Szent István University of Budapest, Faculty of Horticultural Science, Department of Pomology

⁴4633 Lövöpetri, Petőfi u. 17., Hungary

KEYWORDS: *Prunus spinosa*, *Prunus insititia*, *Prunus domestica*, SSR

SUMMARY

Polyploid *Prunus spinosa* (2n=4x), *P. insititia* (2n=6x) and *P. domestica* (2n=6x) represent enormous genetic potential in Central Europe, which can be exploited in breeding programs. For microsatellite analysis, 17 *P. spinosa* and *P. insititia* cultivar candidates, in addition to 18 *P. domestica* landrace cultivars, were used to estimate the genetic distance and perform neighbour-joining analysis based on Jaccard index since there is no information about the genetic structure of Hungarian plums, blackthorns and related species. A total of five simple sequence repeat (SSR) loci were screened using primers designed for different diploid *Prunus* species. All five loci proved to be polymorphic; a total of 122 alleles were identified which means 24.4 average allele number per locus. The highest allele number (33) was detected in the CPDCT021 and CPDCT044 loci, while the lowest allele number (9) was shown in BPPCT037. A phylogenetic and principal component analysis confirmed the high level of diversity and genetic differentiation present within the analysed genotypes. The results provided valuable information both for the practical and cultural aspects of evolution and form an important basis for further investigation.

TABLES AND FIGURES

TABLE 1. Taxonomic classification and origin of the tested cultivar candidates

TABLE 2. Used microsatellite primer pairs designed for different *Prunus* species

TABLE 3. Allele number and size (bp) in 5 loci

FIGURE 1. Neighbour joining dendrogram based on native *Prunus spinosa*, *P. insititia*, *P. spinosa* × *P. domestica* hybrid and *P. domestica* accessions based on SSR analysis

FIGURE 2. Principal component analysis of *Prunus spinosa*, *P. insititia* and *P. spinosa* × *P. domestica* cultivar candidates

IRODALOMJEGYZÉK

- CHIN SW, SHAW J, HABERLE R, WEN J, POTTER D (2014): Diversification of almonds, peaches, plums and cherries—Molecular systematics and biogeographic history of *Prunus* (Rosaceae). *Mol. Phylog. Evol.*, 76: 34–48.
- CRANE, M. B., ÉS LAWRENCE, W.J.C. (1934): *The genetics of garden plants*. In *The genetics of garden plants*. London, Macmillan. pp. XVI. 236.
- DIRLEWANGER, E., COSSON, P., TAVAUD, M., ARANZANA, M., POIZAT, C., ZANETTOA, A., ARÚS, P., LAIGRET, F. (2002): Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 105: 127–138.
- GHARBI, O., WÜNSCH, A., RODRIGO, J. (2014): Characterization of accessions of 'Reine Claude Verte' plum using *Prunus* SSR and phenotypic traits. *Sci. Hort.*, 169: 57–65.
- KAZIJA, D. H., JELAČIĆ, T., VUJEVIĆ, P., MILINOVIĆ, B., ČIČEK, D., BIŠKO, A., NIKOLIĆ, D. (2014): Plum germplasm in Croatia and neighboring countries assessed by microsatellites and DUS descriptors. *Tree Genet. Genomes.*, 10: 761–778.
- HALÁSZ, J., MAKOVICS-ZSOHÁR, N., SZŐKE, F., ERCISLI, S., HEGEDŰS, A. (2016): Simple sequence repeat and S-locus genotyping to explore genetic variability in polyploid *Prunus spinosa* and *P. insititia*. *Biochem. Genet.*, 1–12.

7. HAMMER R., HARPER D.A.T., RYAN P.D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. In: *Palaeontol Electron.* 4. (1): 9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
8. HARSÁNYI J. (1997): Szilva. 184-224. in: Tomcsányi P. (szerk.): Gyümölcsfajtáink. Gyakorlati pomológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
9. HORVATH, A., BALSEMIN, E., BARBOT, J.C., CHRISTMANN, H., MANZANO, G., REYNET, P., LAIGRET, F., MARIETTE, S. (2011): Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.). *Sci. Hort.*, 129: 283-293.
10. JACOB, H.J., LINDERPAINTNER, K., LINCOLN, S.E., KUSUMI, K., BUNKER, R.K., YO-PEI, M., GANTEN, D., DZAU, V.J., LANDER, E.S. (1991): Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*, 67: 213-224.
11. MAKOVICS-ZSOHÁR, N., HALÁSZ, J. (2016): Self-incompatibility system in polyploid fruit tree species- A review. *Int. J. Plant Rep. Biol.*, 8: 24-33.
12. MERKOUROPOULOS, G., GANOPOULOS, I., TSAFTARIS, A., PAPAPOPOULOS, I., DROGOUDI, P. (2016): Combination of high resolution melting (HRM) analysis and SSR molecular markers speeds up plum genotyping: case study genotyping the Greek plum GeneBank collection. *Plant Genetic Resources.* 1, 10.
13. MNEJJA, M., GARCIA, J., HOWAD, W., BADENES, M. L., ARÚS, P. (2004): Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Mol. Ecol. Notes.*, 4: 163-166.
14. MNEJJA, M., GARCIA, J., HOWAD, W., ARÚS, P. (2005): Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Mol. Ecol. Notes.*, 5. (3): 531-535.
15. MOHÁCSY M. (1960): A szilva termesztése és házi feldolgozása. 2. kiad. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
16. NUNES, M. D. S., SANTOS, R. A. M., FERREIRA, S. M., VIEIRA, J., VIEIRA, C. P. (2006): Variability patterns and positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pollen SFB gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) population. *New Phytol.*, 172. (3): 577-587.
17. OKÁLYI I. (1954-1956): Gyümölcsstermetés I-II. köt. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
18. REYNDERS-ALOISI, S., GRELLET, F. (1994): Characterization of the ribosomal DNA units in two related *Prunus* species (*P. cerasifera* and *P. spinosa*). *Plant Cell Rep.*, 13: 641-646.
19. RYBIN, V. A. (1936): Spontane und experiment aller zeugte Bastarde zwischen Schwarzdorn und Kruschpflaume und das Abstammungsproblem der Kulturplume. *Planta.*, 25: 22-58.
20. SALESSES, G. (1975): Quelques données concernant la cytogenétique des pruniers et l'origine du prunier domestique. *Acta Hort.*, 48: 59-65.
21. SEHIC, J., NYBOM, H., HJELTNES, S. H., GAŠI, F. (2015): Genetic diversity and structure of Nordic plum germplasm preserved ex situ and on-farm. *Sci. Hort.*, 190: 195-202.
22. SURÁNYI D. (2006a): Szilva. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
23. SURÁNYI D. (2006b): Nemzeti- és szivügyünk: a Besztercei szilva (történeti-pomológiai tanulmány). *Tájékoztatói lapok*, 4. (1): 65-77.
24. SURÁNYI D. (2014): Szilvafajtáink. p. 402-419. in: Soltész M. (szerk.): Magyar gyümölcsfajták. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
25. TAMARZIT, H. B., WALKER, D., MUSTAPHA, S. B., ABDALLAH, D., BARAKET, G., HANNACHI, A. S., AZZOUZI, S. Z. (2015): DNA variation and polymorphism in Tunisian plum species (*Prunus* spp): contribution of flow cytometry and molecular markers. *Genet. Mol. Res.*, 14. (4): 18034-18046.
26. TÓTH E., SURÁNYI D. (1980): Szilva. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
27. TÓTH, M., HUDÁK, K., GEISZLER, J. (2007): Gyümölcsfajta-kutatás az Aggteleki Nemzeti Park területén. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók (Szerk.: Kiss J., Heszky L.), MTA, Budapest, p. 181.
28. ZOHARY, D. (1992): Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* EHRH. x *P. spinosa* L. allo-polyploid? *Euphytica*, 60. (1): 75-77.