

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

A domesztikáció hatása a mandula genetikai variabilitására

Galiba Gábor
Kertészmérnök BSc IV. évfolyam

Konzulens: Dr. Szikriszt Bernadett, PhD, tanszéki mérnök
Dr. Halász Júlia, PhD, egyetemi docens

Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. CÉLKITŰZÉS	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A mandula (<i>Prunus dulcis</i>) jellemzése	5
3.2. Molekuláris markerek a mandula genetikai vizsgálatára	6
3.2.1. A RAPD-technika	7
3.2.2. Az AFLP-technika	9
3.2.3. Mikroszatellit (SSR) markerezés	9
3.2.4. SSR-markerek használata mandulában	12
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	15
4.1. Növényanyag	15
4.2. DNS-kivonás	20
4.3. PCR-analízis	20
4.4. Fragmentumméret meghatározása	20
4.5. Bioinformatikai elemzések	21
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	22
5.1. Mikroszatellit-polimorfizmus és a heterozigótaság mértéke	22
5.2. A fajták egymáshoz viszonyított genetikai távolsága	26
6. ÖSSZEFOGLALÁS	33
7. IRODALOMJEGYZÉK	35
Köszönetnyilvánítás	39

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt harminc évben Magyarország mandulatermesztése jelentős mértékben csökkent, a mandula importja ugyanakkor megnőtt, főleg kaliforniai és spanyol mandulát vásárolunk. Egyfelől belátható, hogy Magyarország a melegigényes mandula termesztése terén nem versenyezhet a mediterrán vagy más melegebb éghajlatú területekkel, másfelől egyre több szakértő szerint a hazánk számára e faj termesztésében rejlő lehetőségeket minimálisan sem használjuk ki jelenleg. Az elmúlt néhány évtizedben világszerte terjednek az öntermékenyülő fajták, melyek Magyarországon jelenleg nem elérhetők. Magyarországon mandulanemesítés (alanyfajták nemesítésén kívül) jelenleg nincs, ugyanakkor a külföldön népszerű fajták ellenőrzött kipróbálása is várat magára.

A mandulaágazat azonban a világ számos pontján a magyar trendektől jelentősen eltérő pályán fut. A közép-ázsiai országokban honosított kaliforniai és mediterrán fajtákon kívül a helyben termő magonc fák termését használják. Törökországban megkezdődött a szelekciós nemesítés, a legértékesebb egyedek kiválogatása a nagy genetikai változékonyságot mutató helyi genotípusok közül. A kelet- és közép-európai tetszhalott állapottal szemben Olaszországban, Franciaországban, Spanyolországban, és különösen Kaliforniában napjainkban is gőzerővel folyik újabb fajták előállítás.

A gazdasági eredményre irányuló nemesítés és az azt kiszolgáló alkalmazott kutatás mellett a gyümölcsfákkal kapcsolatos kutatások az elmúlt években számos tudományos érdekességre is fényt derítettek. Jelenleg a kutatások legizgalmasabb vetülete, hogy a gyümölcsfák milyen genetikai/genomikai változásokon estek át a domesztikációjuk során, vagyis a termesztésük legkorábbi formáitól napjainkig eltelt időszak során. Az a tény, hogy az ember mindig a számára legkedvezőbb formákat válogatta ki, és ezek elterjesztését segítette több ezer év során, jelentős genetikai következményekkel jártak. Tanszékünk a közelmúltban igazolta, hogy a kajszi európai elterjedésében viszonylag recens történelmi folyamatok is komoly hatást gyakoroltak.

Több faj esetében (pl. kajszi, cseresznye) igazolódott, hogy a géncentrum felé közelítve egyre jelentősebb a genetikai variabilitás. Kérdés azonban, hogy mandula esetében is bizonyítható-e ez a tétel, illetve milyen folyamatok befolyásolják a mandula genetikai változékonyságát. A különböző földrajzi régiókból származó mandulák polimorfizmusának vizsgálata a faj kultúrevolúciós történetére vonatkozóan értékes információkkal szolgálhat.

2. CÉLKITŰZÉS

Az elmúlt években számos közlemény foglalkozott a mandula genetikai sokféleségének feltárásával. A vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott és legtöbb adatot adó módszer az SSR-analízis volt. A munkacsoportok többsége helyi genotípusokat hasonlított össze nemzetközileg ismert fajtákkal. Korábban semmilyen elemzés nem történt a magyar mandulafajtákkal kapcsolatban, ezért munkák során kiemelt jelentőségű volt a magyar fajták és a Magyarországon előforduló genotípusok vizsgálata.

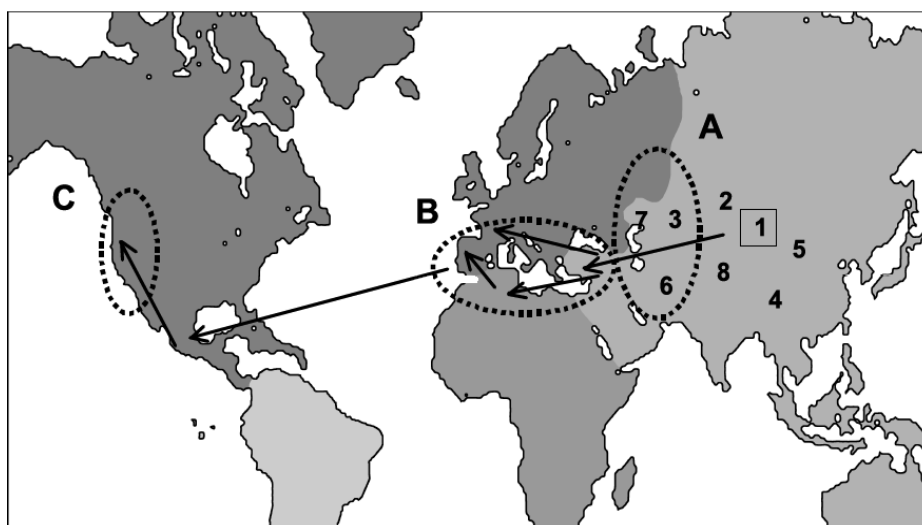
Ennek alapján kutatásaink során a következő célokat tűztük ki:

- különböző földrajzi területekről származó mandulafajták és vadon élő mandulagenotípusok genetikai változékonyságának felmérése mikroszatellit markerek segítségével,
- a genetikai diverzitás mértékének jellemzése az alábbi bioinformatikai adatokkal: elméletileg várt heterozigótaság, megfigyelt heterozigótaság, fixációs index, génáramlás, Shannon-index és a minták közti genetikai távolságértékek,
- az adatok alapján a domesztikáció hatásának jellemzése a mandula genetikai variabilitására.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A mandula (*Prunus dulcis*) jellemzése

A mandula [*P. dulcis* (Mill.) D. A. Webb.; syn. *P. amygdalus* Batsch] a *Rosaceae* családon belül a *Prunoideae* alcsaládba, a *Prunus* nemzetségbe tartozik. A *Rosaceae* családot a mérsékelt égöv egyik legfontosabb növénycsaládjaként tartják számon. Számos gazdaságilag fontos fajt foglal magába, mint például az alma, kajszi, szilva, meggy, cseresznye, mandula, szamóca és rózsza. Kertészeti szempontból a mandula az olajos magvúak közé tartozik, a mandulabél kiváló energiaforrás nagy lipidtartalma miatt. A vad mandulafajok magvai jelentős amigdalintartalmuk következtében általában keserűek (Kester és Gradziel, 1996). A világ fő mandulatermesztő vidéke Közép-Kalifornia, mely a teljes termelés közel felét adja, további jelentős termesztk a Földközi-tenger partjain fekvő országok, különös tekintettel Spanyolország. A mai termesztett mandula valószínűleg a közép-ázsiai hegyvidékekről származik. Számos vad faj is él ezen a Dél-Kínában fekvő Tien-san hegységtől Irán és Irak területéig húzódó vidéken (Grasselly, 1976;). A *P. fenzliana* (Fritsch), *P. bucharica*, *P. kuramica* és a Balkán-félszigetről származó *P. webbii* (Spach) állnak a legközelebbi rokonságban a termesztett mandulával (Browicz és Zohary, 1996). A mandula kultúrevolúciója, elterjedése a termesztett és az ezekhez kapcsolható vad változatok alapján három fő területhez köthető, az ázsiai, mediterrán és kaliforniai régiókhoz (1. ábra) (Grasselly 1976).



1. ábra A mandula [*Prunus dulcis* (1)] és más rokon *Prunus* fajok [*P. bucharica* (2), *P. fenzliana* (3), *P. davidiana* (4), *P. persica* (5), *P. scoparia* (6), *P. webbii* (7) és *P. argentea* (8)] származása, illetve a termesztett mandula elterjedésének útvonala. A betűk a három fő termesztési régiót jelölik: ázsiai (A), mediterrán (B) és kaliforniai (C) (Martínez-Gómez és mts., 2007).

A mandulanemesítés három fő irányvonala a hozam növelése (öntermékenyülés, kései virágzás, virágsűrűség és termőképesség), a termés minőségének javítása (érés idő, bél keserűsége) és a termesztési költségek csökkentése (kártévőkkel és kórokozókkal szembeni rezisztencia, szárazságtűrés). A molekuláris technikák fejlődésével számos, a termesztési érték szempontjából fontos tulajdonság öröklődése nyomon követhetővé vált, ezért a nemesítést elősegítő DNS-alapú kutatások kiemelkedő jelentőségűek (Martínez-Gómez és mts., 2007).

A mandulára a nagy polimorfizmust mutató, multiallélikus *S*-lókuszt által meghatározott gametofitikus inkompatibilitási rendszer jellemző (de Nettancourt, 2001). Az *S*-lókuszt egy *S*-ribonukleáz (*S*-RN-áz) enzimfehérjét kódol a bibében, amely a saját pollentömlő RNS-ét lebontva gátolja annak növekedését (McClure és mts., 1989). A mandula egy tipikus idegentermékenyülő növényfaj, ami meghatározó hatással lehet mind a vadon élő egyedek, mind a termesztett fajták genetikai sokféleségére, hasonlóképpen más gyümölcsfajokhoz (Halász és mts., 2007; 2010a).

3.2. Molekuláris markerek a mandula genetikai vizsgálatára

A molekuláris markerek a DNS-molekula adott régióiban megtalálható nukleotidvariációk, amelyek mendeli módon öröklődnek. A marker kötődhet egy bizonyos génhez is, de néha csupán egy ismeretlen funkciójú DNS-régió. A DNS-alapú molekuláris markerek számos előnyt jelentenek a kutatások során: gyors, precíz adatokkal szolgálnak, nagymértékű megkülönböztető képesség jellemzi őket, a környezeti hatások nem befolyásolják az eredményt, valamint kapcsolt vagy funkcionális markerként bizonyos tulajdonságok korai szelekcióját teszik lehetővé. A korai szelekció a nemesítés során döntő fontosságú, mivel a gyümölcsfák számos (a virágokkal vagy terméssel kapcsolatos) tulajdonsága csak egy hosszú (3-6 éves) juvenilis időszak után válik jellemezhetővé. A molekuláris markerek a markerekre alapozott szelekció (MAS) mellett a genetikai variabilitás jellemzésére, a pedigré meghatározására és a mandulafajták azonosítására egyaránt alkalmasak (Martínez-Gómez és mts., 2003). A vadon élő és a termesztett mandulák genetikai vizsgálatára számos markerezési technika alkalmazható, többek között az RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR és SNP analízisek. A technikák főbb előnyeit és hátrányait az 1. táblázatban foglaltuk össze (Agarwal és mts., 2008).

Az RFLP markerek kodominánsak és gyakorlatilag korlátlan számú marker kimutatására alkalmasak, ezáltal hatékony módszert nyújtanak a fajok és fajták közötti kapcsolatok felderítésére. A technika hátrányai (pl. munka- és időigényes valamint gyakran igényli radioizotópok használatát)

miatt azonban csupán elvétele alkalmazták az RFLP-analízist a mandula genetikai variabilitásának vizsgálatára vagy fajtaazonosításra (Viruel, 1995). A PCR-alapú markerek jelentős mértékben megnövelték a genetikai sokféleség jellemzésének és a fontos tulajdonságok térképezésének lehetőségét. A technika legfontosabb előnye, hogy az izotóp használatát a széles körben hozzáférhető PCR amplifikáció helyettesíti.

3.2.1. A RAPD-technika

A RAPD (random amplified polymorphic DNA) egy PCR-alapú technika, mely véletlenszerűen kiválasztott primereket használ. Az egyszerű, rövid oligonukleotidok a genomi DNS számos régióját amplifikálják, a minták közti különbséget a primer kötődési helyeinek száma és a felszaporított DNS-szakaszok hossza adja. A RAPD-markereket domináns öröklődésüként tartják számon. A vizsgálat ismételhetősége a különböző laboratóriumok között vitatott. Ezt a technikát főként a mandula genetikai variabilitásának kutatására alkalmazták.

A kaliforniai mandulafajták létrehozásakor a közép- és délnyugat-ázsiai populációk erősen szelektált alcsoportjaira támaszkodtak. Bartolozzi és mts. (1998) 17 mandula genotípus genetikai rokonságát jellemezték 37 RAPD-marker felhasználásával. Az idegentermékenyülés ellenére a fajták között megfigyelt genetikai variabilitás csak korlátozott mértékűnek bizonyult. A közös fragmentumok aránya alapján számított hasonlósági index viszonylag nagy értéket mutatott. A mandula és az őszibarack közötti hasonlóság a várthoz képest sokkal kisebb volt.

Martins és mts. (2003) 30 portugál és 10 egyéb eredetű fajta genetikai sokféleségét és rokonságát vizsgálta RAPD és ISSR-markerek segítségével. Ezenkívül további öt Foz Coa (észak-portugál) régióbeli egyedet, valamint hat olaszországi és spanyol *P. webbii* egyedet vizsgáltak. Kísérleteikhez több mint 70 (RAPD és ISSR) primert használtak fel, melyek közül hat RAPD és öt ISSR jól ismételhető, nagy polimorfizmust adott. A 124 PCR fragmentum közül 120 bizonyult polimorfnak. A klasztelizációs eljárás alapján szerkesztett dendrogram a tesztelt növények négy csoportját különítette el: a *P. dulcis* fajtái, egy Foz Coa régióbeli egyed, *P. webbii* valamint a külcsoportként használt *P. persica* (L.) Batsch. A Foz Coa feltételezhetően a *P. dulcis* és *P. webbii* hibridje. A *P. dulcis* fajtáinak genetikai diverzitása nagymértékű volt (a hasonlósági koefficiens értéke 0,97 és 0,65 között változott), így a vizsgált mandulafajták valamennyien jól megkülönböztethetők voltak egymástól. A portugál mandulafajták genetikai változékonysága a *P. dulcis* csoportjával megegyezett, a portugál fajták heterogén csoportot képeztek.

Egy évvel később Martins és mts. (2004) ugyanezen RAPD és ISSR markerkészlet felhasználásával mikroszaporított mandulanövények genetikai stabilitását jellemezték. A 'Boa Costa' nevű fajta magoncának klónját vizsgálták. A vizsgált klón 4 illetve 6 éve *in vitro* kultúrában

fenntartott egyedeinek szomaklonális variabilitását RAPD és ISSR mintázatuk összehasonlításával értékelték. Összesen 7172 fragmentum mutatott monomorf mintázatot minden növény esetén, igazolva ezzel azok genetikai azonosságát. Eredményeik bizonyították, hogy a hónaljhajításokból származó klónok szaporítása során alkalmazott körülmények nem okoznak genetikai változást a mikroszaporított növényekben.

2008-ban Gouta és mts. összesen 22 tunéziai és egyetlen marokkói mandulafajtát vizsgáltak, s hasonlítottak össze mediterrán és USA-beli fajtákkal 12 RAPD primer alkalmazásával. Minden primer polimorf mintázatot eredményezett, a polimorf fragmentumok száma 6 és 13 között változott. A mandula genotípusok közötti jelentős mértékű genetikai sokféleséget (a hasonlósági érték 0,45 és 0,94 között változott) a legtöbb fajta esetében az önmeddőséggel valamint a Tunézián belüli eltérő éghajlatú régiókkal magyarázták. Az UPGMA fa a fajták hat csoportját különítette el egy kulcsoport mellett, melyet a többi fajtától nagy távolságban elhelyezkedő 'Laurane' és 'Genco' fajták alkottak. Az alkalmazott RAPD markerekkel a téves néven nyilvántartott genotípusok is azonosíthatók voltak.

Mirali és mts. (2003) RAPD markerekkel 19 (8 őshonos szíriai és 11 egyéb eredetű) mandulafajtát vizsgáltak, melyek két szíriai génbankból származtak. Vizsgálataikhoz 40 primert használtak fel, melyek közül csupán egy nem adott polimorf mintázatot. A hasonlósági mátrix a tesztelt genotípusok korlátozott mértékű genetikai diverzitását mutatta (0,78 átlagos hasonlósági index mellett). A klaszteranalízis a fajtákat két csoportba osztotta, melyektől egy iráni fajta és a francia 'Ferralise' fajta egyaránt jelentős távolságban helyezkedett el. A RAPD markereken alapuló UPGMA analízis a vizsgált szíriai fajták földrajzi származásával összhangban álló eredményre vezetett.

Shiran és mts. (2007) RAPD-markerek segítségével iráni mandulafajtákat, ezek idegen fajtákkal valamint három közeli rokon mandulafajjal való [*Prunus communis* (L.) Arcang., *P. orientalis* (Mill.) Koehne és *P. scoparia*] rokonsági kapcsolatát vizsgálták. 80 RAPD primer közül 42 adott megismételhető eredményt, s mutatott jelentős polimorfizmust. Összesen 664 polimorf RAPD-markert mutattak ki. Mind a RAPD, mind az SSR-technika hatékonyan elkülönítette a különböző genotípusokat, de a 'Monagha' és 'Sefied' fajták megkülönböztetése csak RAPD-primerek segítségével volt lehetséges. Eredményeik arra világítanak rá, hogy a tesztelt fajták genetikai variabilitása nagymértékű. A két alkalmazott marker alapján szerkesztett UPGMA dendrogramok topológiája jelentős hasonlóságot mutatott. Mindkét dendrogram a fajok/fajták ismert földrajzi elterjedésének és/vagy pedigréjének megfelelően tükrözte a rokonsági kapcsolatokat. A *P. communis* fajjal azonos csoportba sorolt mandulafajták feltételezhetően közeli rokonságban állnak ezzel a fajjal. A *P. orientalis* és *P. scoparia* a *P. dulcis* faj egyedeitől elkülönülő csoportban foglaltak helyet. Sharma és mts. (2012) 32 indiai mandula diverzitását vizsgálták 16

RAPD-primerrel. Összesen 87 polimorf fragmentumot kaptak, eredményeik jól korreláltak a morfológiai bélyegekkkel végzett felméréssel.

3.2.2. Az AFLP-technika

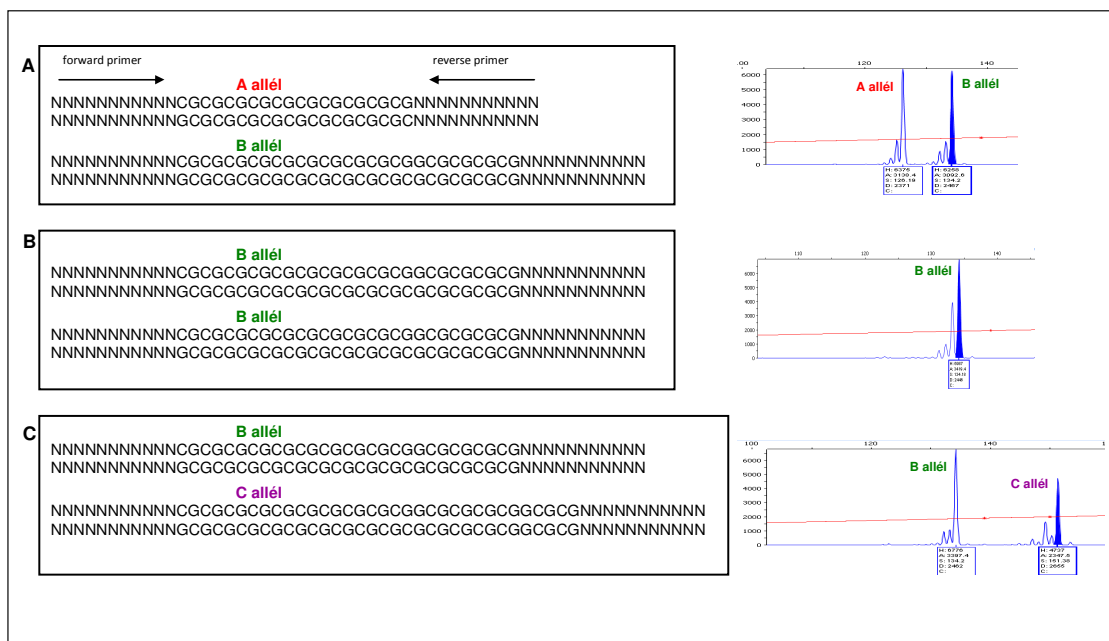
A gyors és hatékony technikaként számon tartott AFLP-technika (amplified fragment length polymorphism) DNS-ujjlenyomatok készítéséhez valamint molekuláris jellemzéshez egyaránt alkalmas. A genomi DNS restrikciós enzimekkel való emésztését követően a kapott DNS-fragmentumok ragadós végeihez specifikus adapterszekvenciákat kapcsolnak. Az adapterek és a csatlakozó hasított vég ismert szekvenciája lesz a restrikciós fragmentumok primerkötő helye az amplifikáció során.

Martins és mts. (2001) harmincöt portugál mandulafajtát és 5 vadnak feltételezett genotípust vizsgáltak egy nemesítési program előkészítése során. Az alkalmazott PCR-markerek közül az AFLP technikával sikerült nagyfokú polimorfizmus kimutatása, valamint az ismételhetőség tekintetében is az AFLP bizonyult a legmegbízhatóbbnak. Sorkheh és mts. 2007-ben nyolc iráni valamint 28 európai és egyesült államokbeli mandulafajta AFLP-vizsgálatát végezték el. Néhány fenotípusos jelleget is figyelemmel követtek, így a virágzás- illetve érésidőt, termékenyülést valamint a magbél és termés bizonyos tulajdonságait. A fragmentumok 96 %-a mutatkozott polimorfnak, a genetikai hasonlóság értéke 0,50 és 0,96 között változott. Az AFLP és a fenotípusos jellegek alapján képzett hasonlósági csoportok között jelentős mértékű eltérés volt. Az AFLP- és morfológiai eredményeket alapul véve megállapítható, hogy az iráni mandulafajtákat közös eredet jellemzi, de a francia, egyesült államokbeli és spanyol fajtáktól jelentősen különböznek. A mandulafajták AFLP analízise nagymértékű genetikai variabilitást mutatott ki, ami nemesítési programokban felhasználható lehet.

3.2.3. Mikroszatellit (SSR) markerezés

Az SSR (Simple Sequence Repeat - egyszerű szekvencia ismétlődés, Jacob és mts.,1991), vagy más néven mikroszatellit markerezés szintén PCR-alapú technika, mely a növényeknél széles körben alkalmazott eljárás genetikai ujjlenyomat készítésére. Mikroszatellitnek nevezzük a DNS olyan nem kódoló régióit, amelyekben di-, tri-, tetra-, esetleg pentanukleotidok tandem (azonos orientációjú) elrendeződésben egymást követve ismétlődnek. Az ismétlések száma 2 és 100 között változhat. A növények genomjára nagymértékben jellemző az ilyen típusú ismétlődő szakaszok jelenléte.

Az SSR-allélok a mendeli törvények alapján kodominánsan öröklődnek, vagyis használatukkal a homo- és heterozigóta egyedek is elkülöníthetők. Az egyes allélok az ismétlődések száma alapján különböztethetők meg (2. ábra). Mivel az ismétlődő régiók határszekvenciái nagyfokú konzerváltságot mutatnak, így az ezekre tervezett primerekkel sikeresen és megbízhatóan szaporíthatók fel a régiók. A kapott termékek hosszának meghatározásával lehetővé válik egyedi DNS-ujjlenyomatok készítése, mivel az allélösszetétel fajoként és fajtánként változatos lehet. Az SSR-régiók eukariótákban nagy számban fordulnak elő, meglehetősen környezeti hatásoktól független, a génkölsönhatások sem befolyásolják őket, és gyorsan, megbízhatóan kaphatunk róluk információkat, ami egyszerű méretbeli különbségként észlelhető, így az eredmények könnyen összehasonlíthatók és cserélhetők az egyes laboratóriumok között. Ráadásul nem csak egy fajon belül, hanem a rokon fajok esetében is evolúciósan konzervatívak a határoló szekvenciák, így az egyes esetekben fejlesztett primerek sikeresen alkalmazhatók más fajok vizsgálatára is.



2. ábra Három (A, B és C) DNS-minta eltérő hosszúságú, dinukleotid ismétlődéseket tartalmazó mikroszatellit régiója. Az A (126 bp és 134 bp) és C (134 bp és 151 bp) minta heterozigóta, míg a B (134 bp és 134 bp) minta homozigóta ugyanazon SSR-lókuszban. A pontos méreteket (bp) a jobb oldalon látható kromatogram mutatja (Peak Scanner).

Nagyfokú polimorfizmusa, genombeli gyakori előfordulása és kodomináns öröklésmenete révén a módszer alkalmas a különböző növényfajok közötti genetikai variabilitás vizsgálatára, valamint a közeli rokonfajok genetikai kapcsolatának megállapítására (Gupta és mts., 1996). A mikroszatellitek kodominánsok, így teljes információt nyújtanak a vizsgált lókusz alléljairól. Nagy az allélváltozékonyság a populáción belül, a mikroszatellit lókuszok heterozigótasági indexe

általában nagyon magas. Öröklődésük egyszerű mendeli szabályok szerint történik és így könnyen alkalmazhatók kapcsoltsági csoportok elemzésére. Rendkívüli variabilitásukat és gyakoriságukat a növényi genomokban sok kutatócsoport bizonyította. Jelenleg a növényi genomok elemzésére az egyik legalkalmasabb markernek tekinthetők (Gupta és Varshney, 2000).

Mindezen tulajdonságok teszik a mikroszatellit markerezést kiválóan alkalmassá mind növények, mind állatok esetében genotípusok elkülönítésére, törvényszéki humán vizsgálatokra, betegségek diagnosztizálására, populációk tanulmányozására vagy akár a származás föltérképezésére. Hátránya azonban, hogy ismeretet igényel a határszekvencia bázissorrendjéről, így a markerek kifejllesztése hosszadalmas és költséges folyamat lehet.

A mikroszatellitok kimutatására legelőször a Southern blot technikát alkalmazták radioaktív jelöléssel. Később, a PCR-technika felfedezését követően Jeffreys és mts. (1988) beszámoltak a miniszatellitok humán DNS-mintából PCR-technikával történő amplifikálásáról. Az amplifikált mikroszatellit fragmentumok elválasztására és az eredmények értékelésére a poliakrilamid illetve agaróz gélek mintázatát alkalmazták és alkalmazzák némely esetekben ma is. Ehhez képest jelentős mértékű javulást eredményezett a fluoreszcens jelölésű primerek használata, az ezen alapuló lézersugaras detektálhatóság és ezáltal a folyamat automatizálhatósága. A fluoreszcens jelölés ugyan gyorsabbá és nagy felbontásúvá tette a mikroszatellit analízist, de ezzel jelentősen növelte a kutatás költségét is. Rasouli és mts. (2012) különböző kimutatási technikákat hasonlítottak össze mandula SSR-vizsgálatok során. A hosszabb ideig tartó, ezüst festéssel, akrilamid gélen detektált fragmentumok, valamint a kapilláris elektroforézis és fluoreszcens jelölt primerek költséges alkalmazása helyett különböző, nagyobb felbontóképességű és olcsóbb agarózgéleket teszteltek. Négy SSR-primerrel vizsgáltak 12 eltérő eredetű mandulafajtát, majd összehasonlították a kapott fragmentummintázatokat. Véleményük szerint a minőséget és eredményességet figyelembe véve a MetaPhor agaróz bizonyult ideálisnak. A gélfestési technikák hatékonyságának összevetésével megállapították, hogy nincs különbség az etidium-bromid és a GelRed festés között, ugyanakkor ez utóbbi kevésbé toxikus az emberi szervezetre, bár lényegesen költségesebb eljárás. Korábban ugyanez a kutatócsoport egy hasonló, a technikákat összevető kísérlete során egyértelműen bizonyította, hogy 1-5 bp-nyi különbség nem mutatható ki a MetaPhor agaróz gélek használatával (Sánchez-Pérez és mts., 2006), így ez a technika kapcsoltsági géntérképek készítésénél optimális, amikor ismert, ennél nagyobb méretbeli különbségű markereket alkalmaznak. Fajták, populációk, különböző gyűjtemények variabilitásának pontos felmérésére, genotípusok azonosítására a kapilláris elektroforézisen alapuló fragmentumhossz-analízis a legpontosabb és legmegbízhatóbb.

3.2.4. SSR-markerek használata mandulában

Különböző *Prunus* fajok vizsgálatára számos, szinte a teljes genomot lefedő SSR-markert azonosítottak őszibarack, kajszi, japánszilva valamint cseresznye fajokból (Cipriani és mts., 1999; Dirlewanger és mts., 2002; Mnejja és mts., 2004). Mandula SSR-markereket Testolin és mts. (2004) fejlesztettek. Martínez-Gómez és mts. (2003a) 30 *P. dulcis* és 35 *P. persica* fajt vizsgáltak SSR-markerekkel. A mandulafajtáknál (0,38-0,88) a heterozigótaság mértéke az őszibarack fajtákhoz képest (0,05-0,33) jóval nagyobb volt, ami a két faj közti eltérő termékenyülési viszonyoknak tudható be. A mandulafajták túlnyomó többsége önmeddő, míg az őszibarackfajták mindegyike öntermékenyülő. A vizsgált mandulafajtákat két fő csoportba sorolták, melyek közül az egyik csoport a kaliforniai fajtákat, a másik főként az európai fajtákat tartalmazta. Ezek az eredmények igazolták, hogy az SSR-markerek a mandulafajták genetikai jellemzéséhez értékes segítséget adnak.

Később Dangl és mts. (2009) kaliforniai mandulafajták SSR-analízise során kiválasztott 12 olyan primerpárt, mely a közeli rokonságban álló fajták megkülönböztetésére is alkalmas. Fernandez i Martí és mts. (2009) egy átfogó tanulmány keretében 93 mandula genotípust (köztük 63 spanyol fajtát) hasonlítottak össze. Kísérletükben a megfigyelt heterozigótaság (0,72) magasabbnak bizonyult a korábban tanulmányozott mandulafajtákhoz képest.

A tunéziai mandulák 10 SSR primer felhasználásával Gouta és mts., (2010) által elvégzett vizsgálata a korábbi RAPD-analízisük (Gouta és mts., 2008) eredményeihez hasonló következtetésekre vezetett. A heterozigótaság értéke 0,68 volt. A RAPD technika segítségével sikeresen elkülönítették az északi és déli fajtákat, míg az SSR analízissel az ország középső és déli területein termesztett fajtákat is sikerült megkülönböztetni az összes többi fajtától. A 25 polimorf mintázatot eredményező SSR primerrel ötvenegy iráni és azerbajdzsáni fajta illetve tájfajta vizsgálatát végezték el, s rokonságukat UPGMA dendrogramon ábrázolták. A tanulmányozott mandulagenotípusok öt fő csoportot alkottak. Később a különböző tunéziai területekről származó 54 helyi fajtát jellemezték részletesebben 10 SSR primerrel (Gouta és mts., 2012). Összesen 130 allélt és 250 genotípust detektáltak. Mindössze két mikroszatellit lókuszt (CPDCT042 és CPDCT025) elegendőnek bizonyult az összes genotípus megkülönböztetésére, így az eredményeket sikeresen használták fel a nemzeti fajtagyűjteményben lévő fajták azonosságának ellenőrzéséhez.

Shiran és mts. (2007) szintén vizsgáltak iráni fajtákat, mely során 26 SSR primer közül 18 bizonyult polimorfnak. Az allélok száma lókuszonként 3 és 10 között változott. A fajták heterozigótasága 0,29 és 0,71 közötti értéket mutatott, és az iráni valamint a többi mediterrán és egyesült államokbeli fajta heterozigótasági értéke között nem volt kimutatható különbség. Az iráni Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet 71 tételből álló mandulagyűjteményét morfológiai és molekuláris szinten 2012-ben vizsgálták részletesen (Zeinalabedini és mts., 2012). A 11 SSR-

primerrel nyert eredmények nem minden esetben feleltek meg a 20 morfológiai tulajdonságokon alapuló csoportosításnak. Kadkhodaei és mts. (2011) 39 morfológiai markert (17 kvantitatív, 22 kvalitatív) és 9 SSR-markert használtak 53 iráni mandula vizsgálatára. Mindkét vizsgálati módszerrel a fajták 2 nagy csoportba voltak sorolhatók.

Xie és mts. (2006) 23 kínai és 15 nemzetközileg ismert mandulafajta 16 SSR lókuszának genetikai variabilitását vizsgálták. Kísérleteikhez 8 EST-SSR és nyolc genomi SSR markert használtak. Az eredetileg őszibarack vizsgálatára tervezett genomi SSR primereket sikeresen használták mandulafajták genetikai vizsgálatához. Az EST-SSR primereket mandula szekvenciák alapján dolgozták ki. A 16 SSR lókusz közül hat lókusz 117 alléljának DNS-szekvenciáját is meghatározták a 38 mandulafajta esetében. Kilencvennyolc allélszekvencia esetén a határoló régiókban sem inszerció, sem delécio nem volt megfigyelhető. Egyes SSR lókuszokban ún. allél homopláziát (olyan szekvencia-variációk, melyek nem okoznak méretváltozást) mutattak ki, ami báziscseréket és más szekvenciaváltozásokat takar. Ennek következtében, ha csak az SSR allélméreteket veszik alapul, könnyen alábecsülhetik a mandula genetikai variabilitását. Két SSR lókusz esetében is megfigyeltek báziscseréket az ismétlődő régiókban, ami a pontmutációk felhalmozódására utal. Az ismétlődő motívumok megszakítása növeli az allélok stabilitását és csökkenti az újabb allélok keletkezésének valószínűségét. Az ilyen vizsgálatok az SSR adatok mögött álló evolúciós folyamatok feltárásához járulhatnak hozzá.

A morfológiai, fehérje és kloroplasztisz SSR-markerekhez képest a genomi SSR markerek bizonyultak a leggyakoribb, s legnagyobb mértékű polimorfizmussal jellemezhető markereknek (Zeinalabedini és mts., 2010). A morfológiai jellegek alapján Ladizinsky és mts. (1999) feltételezték, hogy a *P. fenzliana* áll a termesztett mandulához legközelebb, amit Zeinalabedini és mts. (2010) genomi és kloroplasztisz SSR markerekkel igazoltak.

Delplancke és mts. (2011) sejtmagi és kloroplasztisz SSR-markereket felhasználva a *P. dulcis* és a *P. orientalis* fajokat vizsgálták. Összesen 562 egyedet teszteltek 22 SSR-primerrel. Munkájuk eredményeként világossá vált, hogy a *P. dulcis* és a *P. orientalis* között jelentős mértékű hibridizációt mutattak ki, a génáramlás mindkét faj irányába azonos intenzitású volt. Ennek következtében mindkét fajban kiemelkedően nagymértékű genetikai variabilitást tapasztaltak.

Ezzel szemben a kajszi (Bourguiba és mts., 2012) és cseresznye (Mariette és mts., 2010) fajok genetikai változékonyságának SSR-markerekkel történő vizsgálata során jelentős mértékű palacknyak effektust mutattak, melyet a domesztikáció következményeként értékeltek.

1. táblázat A molekuláris markerezési technikák összehasonlítása (Szikriszt és mts., 2011)

Szempontok	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	ISSR	SNP
Genombeli gyakoriság	nagy	nagy	nagy	mérsékelt	mérsékelt	mérsékelt
Ismételhetőség	jó	bizonytalan	jó	jó	jó	jó
Polimorfizmus mértéke	közepes	közepes	közepes	közepes	közepes	közepes
PCR-alapú technika	nem	igen	igen	igen	igen	igen
Lókuszt-specifitás	igen	nem	nem	nem	nem	nem
Kidolgozás költségei	alacsony	alacsony	mérsékelt	magas	alacsony	magas
Igényelt DNS-mennyiség (µg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05	0.05
DNS-minőség	jó	jó	közepes	közepes	közepes	jó
Felhasználás egyszerűsége	nehéz	könnyű	könnyű	könnyű	könnyű	könnyű
Vizsgálat költségei	magas	alacsony	mérsékelt	alacsony	alacsony	alacsony
Automatizálhatóság	kevésbé	közepes	közepes	igen	közepes	igen
Expresszió	kodomináns	domináns	domináns	kodomináns	domináns	kodomináns
Fő felhasználási terület	fizikai térképezés	gén-jelölés		genetikai változékonyság vizsgálata		

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

A vizsgált magyar és ukrán fajták, hibridek a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszék szigetcsépi és soroksári ültetvényéből, valamint a Római Gyümölcskutató Intézetből (CRA-Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma) származnak. A felhagyott ültetvényekben található idős fákról a Tétényi-fennsíkon gyűjtöttünk mintát (7 db), valamint a Gellérthegyen egy XIX. századi őszibarackültetvényben használt keserű magvú alanyokból fennmaradt fákról (7 db), továbbá alanymag-termő fákról Ceglédről (10 db), illetve 3 idős fáról Monorról. A kaliforniai fajtákat Dr. Craig Ledbetter, a törökországi genotípusokat (az Erzurum régió északi részén fekvő Bademli községből 11 db és a Van tó Akdamar nevű szigetéről, 11 db) Dr. Sezai Ercisli, a marokkói genotípusokat (Földközi-tenger marokkói partvidéke, 11 db) Dr. Ossama Kodad bocsátotta rendelkezésünkre. Vizsgálatainkat kiterjesztettük még a kirgizisztáni Osh város környékén vadon előforduló 9 növényegyedre is. Három vad mandulafaj (*Prunus tenella*, *Prunus webbii*, *Prunus arabica*) egy-egy egyedét is vizsgáltuk (2. táblázat).

2. táblázat A dolgozatban vizsgált növények származása

Mintanév	Származás
17 K	A Fergana-völgyben (Kirgizisztán, Osh város mellett) gyűjtött vadon élő magoncok
18 K	
19 K	
21 K	
22 K	
23 K	
32 K	
35 K	
36 K	
11 G	A Gellérthegyben egy XIX. századi őszibarack-ültetvényben használt keserű magvú alanyokból fennmaradt fák
1 G	
6 G	
9 G	
16 G	
21 G	
31 G	
SG 1 T	A Tétényi-fennsíkon felhagyott ültetvényekből fennmaradt fák
SG 2 T	
SG 3 T	
SG 4 T	
Sz.P. 14 T	
19 F T	
30 T	
Afrnitsplates	ismeretlen eredetű
Csrenomorszki	ukrán fajta
Eriane	francia fajta
Nyikitszkij	ukrán fajta
Pozdnij	ukrán fajta

Saint Caterina	Ismeretlen eredetű olasz, önmeddő fajta
Diósdí félpapírhéjú	Magyar Gyula Diósdon szelektálta 1919-ben
Tétényi bőtermő	A 'Burbank magonca' fajta szabad beporzásából nyert magoncai közül Brózik Sándor szelektálta.
Tétényi kedvenc	Brózik Sándor nemesítette, a Bt 6 × Bt7 jelű törzsfák keresztezésével.
Tétényi keményhéjú	A Bt 6 × Bt7 jelű fák keresztezésével Brózik Sándor állította elő.
Tétényi rekord	A 'Budatétényi 6' jelű fajtajelölt szabad megporzású magoncaiból Brózik Sándor és Nagy Domonkosné szelektálta.
Szigetcsépi 58	A Kertészeti Egyetem szigetcsépi telepén, a 'Diósdí félpapírhéjú' szabad megporzásból nyert magoncai közül Tamássy István és Pejovics Bogdán szelektálta.
Szigetcsépi 55	A Kertészeti Egyetem szigetcsépi telepén, a 'Burbank magonca' szabad megporzásból nyert magoncai közül Tamássy István és Pejovics Bogdán szelektálta.
Szigetcsépi 92	A 'Diósdí félpapírhéjú' szabad beporzásából nyert magoncok közül Tamássy István és Pejovics Bogdán szelektálta.
Óriás kagyló	Gyűjteményes fajta, több típusa is ismert.
Supernova	Öntermékenyülő olasz fajta, feltehetően a 'Fascionello' fajtából röntgensugárzással nyert mutáns (Róma)
Falsa Barese	Ismeretlen eredetű, öntermékenyülő olasz fajta (Apúlia)
Filippo Ceo	Ismeretlen eredetű, öntermékenyülő olasz fajta, (Apúlia)
Tuono	Ismeretlen eredetű, öntermékenyülő olasz fajta, (Apúlia)
Genco	Ismeretlen eredetű, öntermékenyülő olasz fajta, (Apúlia)
A1	Törökországban a Van tó Akdamar nevű szigetén vadon élő egyedek
A2	
A6	
A25	
A26	
A27	
A30	
A32	
A36	
A40	
A41	
B1	Törökországban az Erzurum régió északi részén fekvő Bademli községben vadon élő egyedek
B3	
B5	
B6	

B7	Törökországban az Erzurum régió északi részén fekvő Bademli községben vadon élő egyedek
B13	
B18	
B20	
B24	
B30	
B31	
C.431	Alanymag-termő fák Ceglédről
C.446	
C.449	
C.471	
1/117	
2/3	
2/78	
3/48	
3/58	
4/45	
11	A Földközi-tenger marokkói partvidékén vadon élő egyedek
SA4	
A10	
K4	
T3	
Sf1	
AK11	
19 2	
B4	
SA7	
8	
Mission	'Languedoc szabad megporzás (?)
Thompson	'Nonpareil' × 'Mission' (?)
Nonpareil	Kaliforniában 1879-ben szelektált magonc, fő árufajta, 'Languedoc' szabad megporzás (?)

Monterey	'Nonpareil' × 'Mission'
Ne plus ultra	Kaliforniában 1879-ben szelektált magonc, 'Languedoc' szabad megporzás (?)
Monor 1-1	Idős fák Monoron
Monor 2/1	
Monor 3/1	
<i>Prunus arabica</i> (Olivier) <u>Meikle</u>	Vad fajok
<i>Prunus tenella</i> (L.) Batsch	
<i>Prunus webbii</i> (<u>Spach</u>) <u>Vierh.</u>	

4.2. DNS-kivonás

A genomi DNS-t fiatal levelekből a DNeasy Plant Mini Kittel vontuk ki (Qiagen, Hilden, Németország).

4.3. PCR-analízis

A mikroszatellit-régiók amplifikálásához 10 primerpárt használtunk, melyet különböző *Prunus* fajokból fejlesztettek ki (3. táblázat). A PCR-t PTC 200 (MJ Research, Quebec, Kanada) típusú készülékben végeztük a primerekhez közölt, eltérő protokollok alapján. A PCR-hez kb. 25 ng DNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban. Az 1 × PCR puffer (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), és 2,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 0,4 µM az adott primerekből és 0,625 U *Taq* DNS-polimeráz (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada).

3. táblázat A vizsgálatokhoz felhasznált különböző primerek adatai

SSR-lókusz	Faj	Referencia	Primerkötődési hőmérséklet (°C)
EPDCU 5100	mandula	Howad és mts., 2005	57
CPSCT 021	japán szilva	Mnejja és mts., 2004	46
BPPCT 025	őszibarack	Dirlewanger és mts., 2002	57
CPPCT 044	őszibarack	Aranzana és mts., 2002.	58
UDP 96005	őszibarack	Cipriani és mts., 1999	57
CPDCT025	mandula	Mnejja és mts., 2005	62
EPDCU 3083	mandula	Howad és mts., 2005	57
BPPCT 038	őszibarack	Dirlewanger és mts., 2002	57
BPTCT007	őszibarack	Dirlewanger és mts., 2002	57
BPPCT 001	őszibarack	Dirlewanger és mts., 2002	57

4.4. Fragmentumméretetek meghatározása

A PCR sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A PCR-termékeket 2 %-os TAE agaróz gélben választottuk szét (1 h 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.

4.5. Bioinformatikai elemzések

A vizsgálatokból nyert adatok alapján a következő paramétereket számoltuk ki: lókuszonkénti allélszám, várható heterozigótaság ($H_e = 1 - \sum p_i^2$, ahol p_i az i . allél gyakorisága) (Nei, 1978), megfigyelt heterozigótaság (H_o , a heterozigóta genotípusok száma osztva az összes genotípus számával), fixációs index ($F_{ST} = 1 - H_o/H_e$) (Wright, 1965) és génáramlás (N_m) (Nei, 1978). A csoportátlag (UPGMA) klaszteranalízist a Popgene 1.32 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>) programmal végeztük. A dendrogramot a TREEVIEW programmal készítettük (Page, 1996).

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1. Mikroszatellit-polimorfizmus és a heterozigótaság mértéke

A kutatásunkhoz használt tíz primerpárt eredetileg különböző *Prunus* fajokra tervezték, őszibarack, japánszilva és mandula genomokból (3. táblázat, Anyag és módszer). A tíz primerből 9 sikeres PCR-amplifikációt eredményezett, egy primerrel nem minden esetben volt megfelelő PCR-termék (BPPCT 001, őszibarack). Mindez a primerek által amplifikált mikroszatellit régiók alcsaládon belüli konzerváltságát jelzi, amit csonthéjas gyümölcsök esetében már számos esetben igazoltak (Folta és Gardiner, 2009). A kilenc primerpárral nyert fragmentumok agaróz gélelektroforézis során nem adtak összetett (komplex) mintázatot, így meghatároztattuk az amplifikált fragmentumok pontos méretét. Eredményeink igazolták, hogy a nagyobb felbontó képességű vizsgálat elengedhetetlenül fontos az eredmények helyes értékeléséhez, hiszen több lókusznál is 1-2 bp-os különbség jelentkezett az egyes allélok méretében. Az allélokat a kapilláris elektroforézissel működő automata szekvenáló készülék használatával egyértelműen meg lehetett különböztetni.

Minden egyes lókusznál polimorf volt. Minden egyedben valamennyi primerpár használatával kettő vagy egy allélt detektáltunk, az egy allélt hordozó genotípusokat homozigótának tekintettük. A 4. táblázat a vizsgált lókuszok variabilitását jellemző paramétereket mutatja be. A 9 lókuszban összesen 149 allélt detektáltunk, ez átlagban 16,56 allél lókuszonként. Hasonló érték, 17,2 lókuszonkénti átlagos allélszám jellemezte a Fernández i Martí és mts. (2009) által vizsgált növényanyagot is, amelyben 93 genotípust vizsgáltak 19 SSR-primerrel. A minták között 63 különböző földrajzi régiókból és nemesítési programokból származó spanyol fajta és nemesítési alapanyag, valamint külföldi fajták szerepeltek.

4. táblázat A kísérletben felhasznált 9 primerre jellemző adatok, az allélok hossza, száma és a lókuszok variabilitásának paraméterei a teljes mintapopuláción

Lókusz	Faj	Méret- tartomány (bp)	Allélok száma	Effektív allélok száma (N_e)	Megfigyelt heterozigótaság (H_o)	Elméletileg várt heterozigótaság (H_e)	Wright- féle fixációs index (F_{ST})	Génáramlás (N_m)
EPDCU 5100	<i>P. dulcis</i>	161–173	4	1,24	0,20	0,20	0,50	0,25
CPSCT 021	<i>P. salicina</i>	123–173	18	6,91	0,77	0,86	0,55	0,21
BPPCT 025	<i>P. persica</i>	155–198	16	8,75	0,82	0,89	0,53	0,22
CPPCT 044	<i>P. persica</i>	160–230	17	5,28	0,63	0,81	0,61	0,16
UDP 96005	<i>P. persica</i>	86–136	17	8,32	0,70	0,88	0,60	0,17
CPDCT025	<i>P. dulcis</i>	158–198	16	8,99	0,76	0,89	0,57	0,19
EPDCU 3083	<i>P. dulcis</i>	116–160	20	6,67	0,72	0,85	0,58	0,18
BPPCT 038	<i>P. persica</i>	100–150	20	10,12	0,76	0,91	0,58	0,18
BPTCT007	<i>P. persica</i>	123–166	21	10,43	0,68	0,91	0,62	0,15
Átlag			16,56	7,41	0,67	0,80	0,58	0,18
Szórás			5,05	2,85	0,19	0,23		

Vizsgálatunkban a lókuszonkénti allélszám 4 és 21 között mozgott. Az allélok mérete 86 és 230 bp között változott. A legnagyobb allélszám (21) az őszibarack genomból ismert BPTCT007 lókuszt jellemezte, ez Fernández i Martí és mts. (2009) vizsgálatában 16 allélt adott, melyek mérete 125-162 bp volt, míg a mi mintapopulációnkban 123–166 bp között változott. A legkevesebb allélszám (4) az EPDCU 5100, mandula genomból izolált lókuszt jellemezte, ami pontosan megegyezett a Fernández i Martí és mts. (2009) vizsgálatában e lókuszban kimutatott allélszámmal. Az allélméretek azonban valamelyest eltérnek: a mi eredményeink alapján 161-173 bp, szemben a korábban meghatározott 171-177 bp mérettartománnyal. A legnagyobb mérettartománybeli eltérést az UDP 96005 lókuszt eredményei adták: a vizsgálatainkban 86–136 bp, ami Fernández i Martí és mts. (2009) munkájában 123–175 bp volt. A Shannon-féle diverzitás index jól használható a különböző területekre jellemző variabilitás összevetésére (Khan, 2006). A 2,16 I érték nagy genetikai variabilitásra utal, ahogyan az egy önmeddő faj esetében várható. A diverzitás index a magyarországi mintakör esetében volt a legnagyobb, ami összefügg azzal is, hogy e területről vizsgáltuk a legnagyobb mintaszámot.

Az összes lókuszt átlagában a várt heterozigótaság (H_e) mértéke 0,80 volt (4. táblázat). A H_e értékek az EPDCU5100 lókuszt esetében megállapított 0,20, valamint a BPPCT038 és BPTCT007 lókuszok esetében jellemző 0,91 szélső értékek között fordultak elő. A megfigyelt heterozigótaság (H_o) 0,20 és 0,82 között változott, a lókuszok átlaga 0,67 volt. A H_o mértéke spanyol fajták esetén 0,72 volt (Fernandez i Martí és mts., 2009) kínai fajták esetén 0,69 (Xie és mts., 2006), míg az egyesült államokbeli és mediterrán fajtáknál 0,59 (Martínez-Gómez és mts., 2003) volt korábbi vizsgálatok alapján, amihez saját eredményünk is nagyon hasonló értéket mutat.

A Wright-féle *fixációs index* (F_{ST}), amely a megfigyelt heterozigótaságot (H_o) összehasonlítja az elméletileg várt heterozigótasággal (H_e), ezzel kifejezve az allélikus fixáció mértékét, 0,50 és 0,62 értékek között mozgott a vizsgált lókuszok esetében. Az index átlagos értéke $F_{ST}=0,58$ volt, ami nagyon jelentős mértékű genetikai differenciálódásra utal (Hartl és Clark, 1997), és ennek megfelelően viszonylag kicsi génáramlási értéket.

Vizsgálataink során a genetikai változékonyságot jellemző paramétereket meghatároztuk a teljes mintakörre (97 fajta illetve genotípus) vonatkozóan, valamint a származási hely alcsoportokba (Kirigizisztán, Törökország, Magyarország, Marokkó és USA) vagy termékenyülési fenotípus alapján (öntermékenyülő) alcsoportokba sorolt fajták körére is.

5. táblázat A teljes mintakör és a földrajzi területekre elkülönülten jellemző SSR-adatok

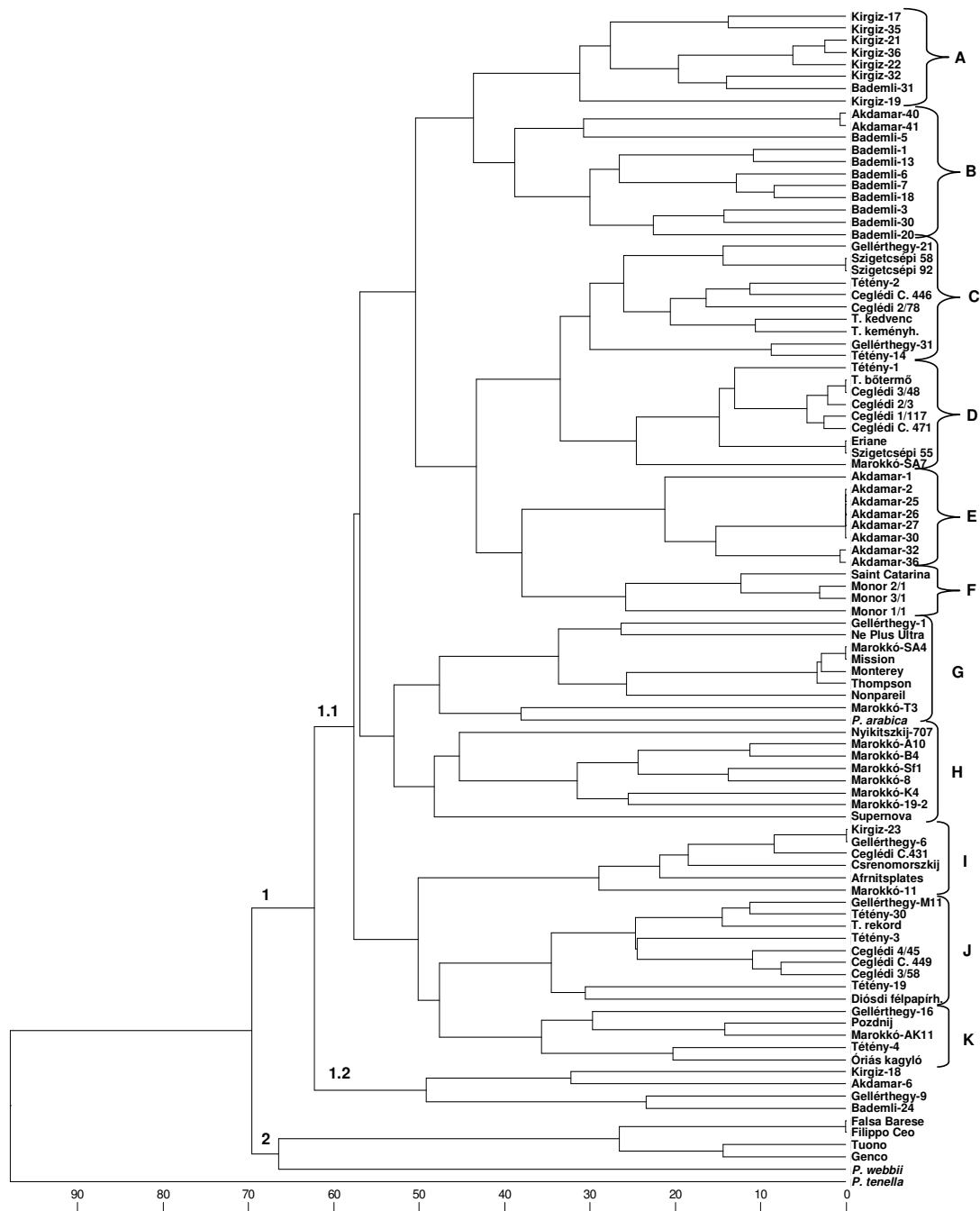
Földrajzi csoportok	Kirgizisztán	Törökország	Magyarország	Marokkó	USA	Öntermékenyülők	Teljes
Allélok száma	3,89	7,78	9,67	7,44	4,22	3,56	16,56
Effektív allélok száma (N_e)	2,79	4,64	4,80	4,66	2,97	2,66	7,41
Shannon-index	1,11	1,58	1,72	1,63	1,15	1,02	2,16
Megfigyelt heterozigótaság (H_o)	0,60	0,68	0,69	0,71	0,65	0,53	0,67
Elméletileg várt heterozigótaság (H_e)	0,64	0,72	0,74	0,75	0,65	0,61	0,80
Wright-féle fixációs index (F_{ST})	0,50	0,52	0,52	0,51	0,45	0,52	0,58
Génáramlás (N_m)	0,25	0,23	0,23	0,24	0,30	0,23	0,18

A legtöbb allélt (9,67) a magyar mandulákban mutattuk ki a vizsgált lokuszok többségében (5. táblázat). Ez nem meglepő, mert ezekből a mintákból volt a legtöbb (37 minta), és több területről (Cegléd, Monor, Gellérthegy, Tétény), különféle fenotípusú (pl. édes és keserű magbelű), eltérő hasznosítású (alany vagy magtermő fák) és eredetű (rég felhagyott ültetvények fái, szelektált tájfajták, nemesítési programokból származó áruajták) genotípusokat gyűjtöttünk. A legkevesebb allélt (3,89) a kirgizisztáni mintacsoport adta, ami várható volt, hiszen ezek a növények mindössze két mandulafa magoncait reprezentálják. A törökországi és marokkói növények hasonló allélszámmal rendelkeznek (7,78 és 7,44), mindkét mintapopulációt nagyobb földrajzi területről gyűjtöttük.

Az egyes csoportok közötti leginkább szembetűnő eltérés az öntermékenyülő fajtákra jellemző megfigyelt heterozigótaság 0,53-as értéke, ami valamennyi többi csoport értékétől jóval kisebb. Ahogyan az más *Prunus* fajok esetében is ismert, az öntermékenyülés kialakulásával a heterozigótaság mértéke csökken (Halász és mts., 2010b). Tekintve, hogy a mandula esetében az öntermékenyülés viszonylag új jelenség (alig néhány évtizede vannak megfelelő minőségű áruajták), a beltenyésztésre utaló jeleket mindeztáig nem közölt a szakirodalom. Vizsgálatunk alapján azonban feltehető, hogy az apúliai régióban kialakult öntermékenyülő fajták evolúciója során azonos vagy közel rokon genotípusok kereszteződése is bekövetkezett, aminek első jeleként érthető az e fajtakörre jellemző megfigyelt variabilitás enyhe mértékű csökkenése. Az öntermékenyülő olasz fajták kisebb allélszáma (3,56) összefügg a heterozigótaság korlátozottabb mértékével. A vizsgált mandulák között az olasz fajták kivételével nem találhatók öntermékenyülő genotípusok (Halász és mts., nem közölt adatok).

5.2. A fajták egymáshoz viszonyított genetikai távolsága

A kilenc SSR-marker adataiból meghatároztuk a Nei-féle genetikai távolság adatokat (Nei, 1972), melyek alapján a mandulagenotípusok genetikai rokonságának megállapításához UPGMA módszerrel dendrogramot szerkesztettünk (Popgene v.1.32 program). A 3. ábrán bemutatott dendrogram több csoportba rendezte a fajtákat.



3. ábra A vizsgált mandulagenotípusok genetikai kapcsolatát szemléltető UPGMA dendrogram (Popgene v.1.32 program).

A *Prunus tenella* vad faj kulcsoportot alkotott, valamennyi egyéb mintától jelentős mértékű genetikai távolság jellemezte. A *P. tenella* nagy genetikai távolsága a vizsgált 94 mandula (*Prunus dulcis*) genotípustól érthető, hiszen két különböző *Prunus* faj egyedeiről van szó. Ehhez hasonlóan látható, hogy a *P. webbi* faj egyede is elkülönül a vizsgált fajták nagy részétől. Figyelemre méltó azonban, hogy a 'Falsa Barese', 'Filippo Ceo', 'Tuono' és 'Genco' mandulafajtákhoz viszonylag közelebb helyezkedik el (2-es ág), mint a többi (1-es ágon található) fajtához. Ezek a fajták két paraméterben különböznek valamennyi egyéb vizsgált fajtától, egyrészt öntermékenyülők, másrészt Olaszország apúliai régiójából származnak. Godini (2002) hipotézise szerint az apúliai régióból szelekcióval kiemelt fajták öntermékenyülési képessége az öntermékenyülő *P. webbii* fajból introgresszió útján átkerült S_F -allélnak köszönhető. Később a hipotézist úgy módosították, hogy az öntermékenyülést okozó allél a *P. dulcis* fajon belül alakult ki, és innen jutott át introgresszióval a *P. webbii* fajba (Boskovic és mts., 2007). Mindkét hipotézisnek az az alapja, hogy a termesztett mandula és az apúliai régióban vadon élő *P. webbii* egyedek egymással kereszteződhetnek (Browicz és Zohary, 1996). Eredményeink a két faj között meglévő ivaros kapcsolatot meggyőzően támasztják alá, kimutatva, hogy a *P. webbii* genetikailag közelebb áll az apúliai mandulafajtákhoz, mint bármelyik más fajtához.

Az 1. ágon belül további két ág különböztethető meg, melyek közül az 1.2 ág négy, különböző földrajzi eredetű egyedet foglal magában. Az 1.1. ág egyedei 11 csoportba sorolhatók, melyeket A-K jelekkel láttunk el (3. ábra). Az A csoport egy török eredetű egyed kivételével kizárólag kirgiz egyedeket tartalmazott. A csoport elkülönülésének feltehetően legfontosabb oka, hogy a vizsgált egyedek egy idős fa magoncpopulációját alkotják, így közeli rokonságban állnak. Az egyetlen kirgiz minta (Kirgiz-18), mely az A csoporttól jelentős genetikai távolságot mutat (1.2 csoport). Ez az egyed a területen található másik idős fa magonca, így az előző csoport tagjaival feltehetően nem áll kapcsolatban.

Testvércsoportjában (B) ugyanakkor kizárólag török eredetű mandulák helyezkednek el, túlnyomó többségében a Bademli régióból származó egyedek. Törökország ezen területén emberemlékezet óta találhatók mandulafák (Ercisli szóbeli közlése), erről kapta nevét, melynek magyar jelentése „mandulás kert”. Megfigyelhető, hogy a csoporton belül a két akdamar-szigeti egyed elkülönülő alcsoportot alkot. Feltűnő továbbá, hogy a Bademli-24 egyed kivételével (1.2 ág) valamennyi Bademli környékén élő, vizsgált egyed ebbe a csoportba rendeződött.

A C és D testvércsoportokba elsősorban magyar fajták/genotípusok tartoznak. Feltűnő azonban, hogy a különböző területekről származó egyedek nem alkotnak elkülönülő kládokat; a tétényi fajták és idős fák, a ceglédi alany magtermő fák valamint a Szigetcsépi nevű fajták, továbbá a keserűmagvú XIX. századi mandulaalanyok (Gellérthegy jelű minták) keverten rendeződnek el.

Eredményeink pontosságát hűen tükrözi, hogy a 'Tétényi kedvenc' és 'Tétényi keményhéjú' fajták egymáshoz közel találhatók a C csoporton belül, míg a 'Tétényi bőtermő' a D csoportban található. A 'Tétényi kedvenc' és 'Tétényi keményhéjú' fajták ugyanazon szülő növényektől, a Budatétényi 6 × Budatétényi 7 jelű törzsfák keresztezéséből származnak, ezzel szemben a 'Tétényi bőtermő' fajtát a 'Burbank magonca' nevű fajta szabad megporzásából származó magoncok közül szelektálta Brózik Sándor (Brózik, 1998). A 'Szigetcsépi 55' szintén a 'Burbank magonca' fajta hibridje, ami e két fajta azonos csoportbeli elhelyezkedését magyarázza (Brózik, 1998).

Érdekes megfigyelni, hogy a C csoportba tartozó 'Szigetcsépi 58' és 'Szigetcsépi 92' fajták milyen távol helyezkednek el a 'Diósi félpapírhéjú' fajtától, jóllehet nyilvántartott pedigréjük alapján ennek leszármazottai (Brózik és Apostol, 2003). Ezek alapján feltételezhető, hogy a Genetika és Növénynevelés Tanszék régi mandulaültetvényében megtalált 'Diósi félpapírhéjú'-ként nyilvántartott fa nem volt fajtaazonos. Érdekes a 'Szigetcsépi 58' és az 'Eriane' nevű fajta hasonló SSR-profilja. Tekintve, hogy az 'Eriane' francia fajtát ugyanabban az ültetvényben gyűjtöttük, ahol közel félszáz évvel korábban a 'Szigetcsépi 58' fajta szelekciója megtörtént (Pejovics, 1968), elképzelhető, hogy például pollenadóként részese a 'Szigetcsépi 58' pedigréjének.

A Tétényi-fennsík felhagyott ültetvényeiben található egyedek nem egyeztek meg egyetlen tétényi vagy más vizsgált régi magyar fajtaival, ugyanakkor mindig ezek közelébe rendeződtek, így legalább is távolabbi rokonságuk bizonyítottan látszik. Tekintettel arra, hogy sok esetben a ceglédi alanymag-termő fákhoz közel helyezkedtek el, az is elképzelhető, hogy a Tétényi-fennsík felhagyott ültetvényeiben talált idős fák az egykori ültetvény alanyai voltak.

Az E csoportban kizárólag a törökországi Van-tó Akdamar szigetén élő egyedek találhatók meg. Ezek nagy részének genotípusa alig mutat eltérést egymástól, ami önmeddő növények esetén legvalószínűbb módon az alapító hatással magyarázható, mely a kultúrnövények evolúciója szempontjából is ismert jelenség (Ladinsky, 1984). Akdamar szigetére valamikor feltehetően mindössze néhány egyed (mag) kerülhetett, és a ma a szigeten élő fák ezek leszármazottai. A több kilométeres tengersáv valószínűleg a megporzó rovarok átjutását sem teszi lehetővé, így a földrajzi izoláció miatt a populációt a mai napig változatlanul kis genetikai variabilitás jellemzi.

A csoportok közül különösen érdekes az F jelű, mely egy olasz fajtát és három, Monor környékén talált idős fát tartalmaz. Ezek közelebbi/távolabbi rokonságának magyarázata nem ismert.

Az eddig ismertetett csoportoktól viszonylag nagy genetikai távolságra helyezkednek el a G és H csoportok. A G csoport elsősorban a híres amerikai árufajtákat tömöríti, ami nem meglepő, hiszen a 'Mission', a 'Nonpareil' és a 'Ne plus ultra' fajok feltehetően mind a 'Languedoc' fajta szabad megporzásából származó magoncok, amit közös csoportba rendeződésük is alátámaszt. A

‘Monterey’ fajta a ‘Nonpareil’ × ‘Mission’ keresztezésével jött létre, amit alátámaszt, hogy dendrogramunkon a két fajta között helyezkedik el. A ‘Thompson’ esetében ugyanezt a származást valószínűsítették, elsősorban az önmeddőséget meghatározó genotípus alapján (Kester és mts., 1994). Később SSR vizsgálatokkal ezt a pedigrét megerősítették (Dangl és mts., 2009), a mi eredményeink további bizonyítékot adnak ehhez. Távolsági rokonságot mutat a G csoporton belül az USA fajtákhoz egy marokkói és egy magyar genotípus is.

A marokkói genotípushoz legközelebb a *P. arabica* faj áll. Igen érdekes, hogy ez a faj nem különül el élesen (külcsoport) a *P. dulcis* fajtától, mint a *P. tenella*. A *P. arabica* az Észak-Afrikától távol eső Közel-Keleten honos növény. Érdekes azonban számításba venni, hogy a faj a félsivatagos körülmények között is előfordul (Browicz és Zohary, 1996), mely adaptációs képesség Marokkó vidékein is jelentős előnyt adhatna e fajnak. A föníciaiak közel 2500 évvel ezelőtt számos gyümölcs terjesztésében részt vettek. A közelmúltban a Genetika és Növénynevelés Tanszék munkatársai marokkói kollégáikkal együttműködve a kajszi ilyen irányú terjedését alátámasztó adatok birtokába jutottak (Halász szóbeli közlése), amit eredményeink a mandula esetére is kiterjeszthetnek. Pejovics (1968) is tett említést arra vonatkozóan, hogy a föníciaiak a Közel-Keletről mandulát szállítottak a Földközi-tenger partvidékén található országokba. Ilyen módon a *P. arabica* is eljuthatott Marokkóba, ahol kereszteződhetett Marokkó északi részén kivadulva élő más európai mandulafajtákkal. Ennek részletesebb vizsgálata érdekes eredményekhez vezethet a jövőben.

A ‘Supernova’ jelenléte ebben a csoportban (a csoport minden tagjával jelentős genetikai távolságot mutat) azért érdekes, mert eredeti feltételezett pedigréjét (2. táblázat) egy későbbi vizsgálat eredményeként módosítani javasolták (Marchese és mts., 2008). A szerzők úgy találták, hogy valójában azonos a ‘Tuono’ fajtával. Ha a vizsgált egyedek fajtaazonosak voltak, ami valószínűnek látszik, mert a mintákat a Római Gyümölcskutató Intézet bocsátotta rendelkezésünkre, úgy eredményeink nem igazolják a ‘Tuono’ fajtával való azonosságot.

Az I csoport különböző földrajzi eredetű egyedeket foglal magában (kirgiz, magyar, ukrán és észak-afrikai). Ilyen módon sajnos az ‘Afrnitsplates’ fajta eredetére vonatkozóan sem kaptunk használható információt. A J csoportban kizárólag magyar, de Magyarország területén belül több régióba tartozó fajta/egyed található, ahogyan a K csoportban is. Az utóbbi csoportban marokkói és ukrán fajták is találhatók. Ezek között a viszonylag távolabbi genetikai kapcsolat magyarázata nem ismert.

Végezetül megállapítható, hogy a dendrogramon bizonyos földrajzi eredetű (pl. kirgiz, török, észak-amerikai) egyedek jól elkülönülő csoportokat alkotnak. Ezen esetekben a genetikai kapcsolat vagy a populáció közös allélkészletére utal (pl. a török egyedek) vagy a nemesítési

programok közös kiinduló egyedeire (pl. észak-amerikai fajták). A modern nemesítési programokban a genetikai variabilitás erre visszavezethető csökkenését már korábban igazolták (Lansari és mts., 1994).

Érdekes, hogy a két vizsgált török populáció legtöbb egyede egymástól jól elkülönülő kládokat alkotott. Ebben egyrészt szerepe lehet az akdamari populáció már említett szűk allélkészletének, illetve annak, hogy Bademli térségében a vadon élő mandulák a *P. webbii* fajjal hibridizálódhatnak. Ezek *S*-genotípusában több *P. webbii* allélt is kimutattak a tanszék munkatársai (Halász, személyes közlés). Felmerül a kérdés, hogy ez esetben a vizsgálatban szereplő *P. webbii* miért nem került közelebb a Bademli egyedeket tömörítő csoporthoz? Ennek nyilvánvaló oka, hogy a vizsgált *P. webbii* az apúliai régióból származik, ami szintén jelentős genetikai eltérést mutathat a kelet-anatóliai *P. webbii* egyedektől. Ennek tisztázásához a térség *P. webbii* populációjának vizsgálatára lenne szükség.

A magyar fajták C és D csoportja, valamint az I, J és a K csoport tagjait egymáshoz képest jelentős mértékű genetikai eltérés jellemzi. Ennek oka azért nem tisztázható jelenleg, mert mindkét ágon megtalálható valamennyi területre (Tétény, Cegléd, Gellérthegy) jellemző egyed. További lókuszos vizsgálata esetleg megerősítheti vagy kétségbe vonhatja ezt a jelentős mértékű elkülönülést. A Gellérthegyen élő, keserű magvú alanyként a XIX. században használt fák leszármazottjai (Rapaics, 1932) mutatták a legkevésbé klád-specifikus elrendeződést, tagjai megtalálhatók voltak hat csoportban (C, G, I, J, K csoportok, illetve az 1.2. ág). Ezen csoportok fele jellemzően magyar fajtákat tömörített, míg a többi csoport esetében vagy a hasonlóság viszonylag csekély mértéke (G), és/vagy a csoportok rendkívül vegyes elrendezése (I és 1.2. ág) miatt nem értékelendő túl ez az elrendeződés. . Ahogyan a keserű magvúság esetében, úgy más fenotípusos tulajdonságok (például héjkeménység) alapján sem rendeződtek az egyedek önálló csoportokba.

Végeredményben megállapítható, hogy a mandulát Közép-Ázsiától az Egyesült Államokig nagy genetikai variabilitás jellemzi. A modern nemesítési programokban preferált genotípusok célzott használatával, illetve természetes körülmények között (pl. földrajzi izoláció hatására) láthatók a genetikai variabilitás csökkenésének jelei. A genetikai változékonyság azonban mégsem mutat olyan mértékű, a domesztikációnak tulajdonítható, negatív irányú változást, mint más fajok (például kajszi, őszibarack) esetében. Ebben szerepe van a más fajokkal (*P. webbii*, *P. orientalis*, esetleg *P. arabica*) történt fajkereszteződés (introgresszió) jelenségének is. Ilyen folyamatok vezetnek az eltérő földrajzi környezetben élő populációk differenciálódásához, elkülönüléséhez.

A másik jelentős ok, hogy a genetikai variabilitás leszűkülése minden csonthéjas faj esetében a heterozigótaság mértékének csökkenésével járt együtt, ami az öntermékenyülés

kialakulása után következett be. Mandula esetében az öntermékenyülés viszonylag új jelenség, de már kimutatható volt az öntermékenyülő fajták heterozigótaságának kismértékű csökkenése. Mindez a nemesítési programok gyakorlatával együtt a termesztett mandula genetikai variabilitására a jövőben reális veszélyt jelent. Eredményeink felhívják a figyelmet arra is, hogy a gyümölcsfák genetikai alapjainak formálása terén a termékenyülési fenotípus megváltozása kiemelkedő jelentőségű.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Több gyümölcstermő fa esetében igazolódott, hogy a géncentrum felé közelítve egyre jelentősebb a fajra jellemző genetikai variabilitás. Munkám célja volt annak föltérképezése, hogy mandula [*P. dulcis* (Mill.) D. A. Webb.] esetében is bizonyítható-e ez a tétel, illetve milyen folyamatok befolyásolják a mandula genetikai változékonyságát. A különböző földrajzi régiókból származó mandulák polimorfizmusának vizsgálata a faj kultúrevolúciós történetére vonatkozóan értékes információkkal szolgálhat.

A vizsgálatokhoz mikroszatellit (SSR) markereket használtunk, összesen 10, mandulára vagy más *Prunus* fajra kidolgozott primerpárral. A vizsgált mintakör magyarországi, török, marokkói, kirgiz, kaliforniai és olasz eredetű öntermékenyülő mandula genotípusokat (fajták, felhagyott ültetvény területén élő fák, hajdani ültetvény alanyfái és természetes populációk egyedei), továbbá három vad fajt tartalmazott, összesen 97 mintát. A PCR-fragmentumok méretének meghatározása automata DNS-szekvenátorral történt, az adatok kiértékeléséhez a Popgene 1.32 és a TREEVIEW programokat használtuk.

A tíz primerből 9 sikeres PCR-amplifikációt eredményezett. A 9 lókuszban összesen 149 allélt detektáltunk, ez átlagban 16,56 allél lókuszonként. Vizsgálatunkban a lókuszonkénti allélszám 4 és 21 között mozgott. Az allélok mérete 86 és 230 bp között változott. A legnagyobb allélszám (21) az őszibarack genomból ismert BPTCT007 lókuszt, a legkisebb allélszám (4) az EPDCU 5100, mandula genomból izolált lókuszt jellemezte. A Shannon-féle diverzitás index nagy genetikai variabilitásra utalt. A megfigyelt heterozigótaság (H_o) a lókuszek átlagában 0,67 volt, ami hasonló a más vizsgálatok esetében spanyol, kínai és kaliforniai fajták esetében meghatározott értékekhez. A Wright-féle *fixációs index* (F_{ST}), átlagos értéke 0,58 volt, ami jelentős mértékű genetikai differenciálódásra utal.

A származási hely alapján alkotott alcsoportok között a legjelentősebb különbség az öntermékenyülő mandulafajták kisebb allélszáma és megfigyelt heterozigótaság értéke volt. Vizsgálatunk alapján feltehető, hogy az olaszországi apúliai régióban kialakult öntermékenyülő fajták evolúciója során azonos vagy közeli rokon genotípusok kereszteződése is bekövetkezett, aminek első jelei már láthatók a variabilitás kismértékű csökkenésében. A kaliforniai fajták kisebb allélszáma a modern nemesítési programok hatását mutatja.

Meghatároztuk a Nei-féle genetikai távolság adatokat, melyek alapján a mandulagenotípusok rokonságának megállapításához UPGMA módszerrel dendrogramot

szerkesztettünk. A dendrogramon bizonyos földrajzi eredetű (pl. kirgiz, török, észak-amerikai) egyedek jól elkülönülő csoportokat alkotnak, ugyanakkor fenotípusos tulajdonságok (pl. keserű magvúság, héjkeménység) alapján nem rendeződtek az egyedek önálló csoportokba.

A magyar fajták néhány csoportját egymáshoz képest jelentős mértékű genetikai eltérés jellemzi. Ennek tisztázásához további vizsgálatok szükségesek, de munkánk során több fajta ismert pedigréjét sikerült megerősíteni. Az Akdamar szigetén élő egyedek nagy részének genotípusa alig mutat egymástól eltérést, ami önmeddő növények esetén legvalószínűbb módon az alapító hatással és ez esetben a földrajzi izolációval magyarázható. Érdekes, hogy a másik törökországi mandulapopuláció (Bademli) legtöbb egyede az akdamari manduláktól jól elkülönülő csoportot alkotott. Ebben egyrészt szerepe lehet az akdamari populáció szűk allélkészletének, illetve annak, hogy Bademli térségében a vadon élő mandulák a *P. webbii* fajjal hibridizálódhatnak.

Végeredményben megállapítható, hogy a mandulát Közép-Ázsiától az Egyesült Államokig nagy genetikai variabilitás jellemzi. A modern nemesítési programokban preferált genotípusok célzott használatával, illetve természetes körülmények között (pl. földrajzi izoláció hatására) láthatók a genetikai variabilitás csökkenésének jelei. A genetikai változékonyság azonban mégsem mutat olyan mértékű, a domesztikációnak tulajdonítható, negatív irányú változást, mint más fajok (például kajszi, őszibarack) esetében. Ebben szerepe van a vad fajokkal (*P. webbii*, *P. orientalis*, esetleg *P. arabica*) történő fajkereszteződés (introgresszió) jelenségének is. Ilyen folyamatok vezetnek az eltérő földrajzi környezetben élő populációk differenciálódásához, elkülönüléséhez.

A másik jelentős ok, hogy a genetikai variabilitás leszűkülése minden csonthéjas faj esetében a heterozigótáság mértékének csökkenésével járt együtt, ami az öntermékenyülés kialakulása után következett be. Mandula esetében az öntermékenyülés viszonylag új jelenség, de már kimutatható volt az öntermékenyülő fajták heterozigótáságának kismértékű csökkenése. Mindez a nemesítési programok gyakorlatával együtt a termesztett mandula genetikai variabilitására a jövőben reális veszélyt jelent. Eredményeink felhívják a figyelmet arra is, hogy a gyümölcsfák genetikai alapjainak formálása terén a termékenyülési fenotípus megváltozása kiemelkedő jelentőségű.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. AGARWAL, M., SHRIVASTAVA, N., PADH, H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.*, 27: 617-631.
2. BARTOLOZZI, F., WARBURTON, M. L., ARULSEKAR, S., GRADZIEL, T. M. (1998): Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123: 381-387.
3. BOŠKOVIĆ, R., TOBUTT, K.R., ORTEGA, E., SUTHERLAND, B.G., GODINI, A. (2007): Self-(in)compatibility of almonds *P. dulcis* and *P. webbii*: detection and cloning of 'wild-type Sf' and new self-compatibility alleles encoding inactive S-RNases. *Mol Genet Genomics* 278(6):665-76.
4. BOURGUIBA, H., AUDERGON, JM., KRICHEN, L., TRIFI-FARAH, N., ALI MAMOUNI, TRABELSI, S. BOUCHAÏB KHADARI (2012): Genetic diversity and differentiation of grafted and seed propagated apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Maghreb region. *Scientia Horticulturae*, 13: 7-13.
5. BROWICZ, K., ZOHARY, D. (1996): The genus *Amygdalus* L. (Rosaceae): Species relationships, distribution and evolution under domestication. *Genet Resour Crop Evol* 43:229-247.
6. BRÓZIK S. (1998): Mandula. In: Gyümölcsfajta-ismeret és használat (Szerk.: Soltész M.). Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp.: 330-335.
7. BRÓZIK S., APOSTOL J. (2003): A mandulafajták leírása. In: Mandula (Szerk.: Brózik S., Kállay T., Apostol J.), Mezőgazda kiadó, Budapest. pp.: 55-61.
8. CIPRIANI, G., LOT, G., HUANG, W. G., MARRAZZO, M. T., PETERLUNGER, E., TESTOLIN, R. (1999): AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 65-72.
9. DANGL, G., YANG, J., GOLINO, D., GRADZIEL, T. (2009): A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 168: 41-48.
10. DE NETTENCOURT, D. (2001): Incompatibility in angiosperms. New York: Springer-Verlag.
11. DELPLANCKE, M., ALVAREZ, N., ESPÍNDOLA, A., JOLY, H., BENOIT, L., BROUCK, E., ARRIGO, N. (2011): Gene flow among wild and domesticated almond species: insights from chloroplast and nuclear markers. *Evolutionary Applications* 5(4): 317-329.
12. DIRLEWANGER, E., COSSON, P., TAVAUD, M., ARANZANA, M., POIZAT, C., ZANETTO, 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.
13. FERNANDEZ I MARTI, A., ALONSO, J. M., ESPIAU, M. T., RUBIO-CABETAS, M. J., SOCIAS I COMPANY, R. (2009): Genetic diversity in Spanish and foreign almond germplasm assessed by molecular characterization with simple sequence repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 134: 535-542.
14. GODINI A (2002): Almond fruitfulness and role of self-fertility. *Acta Hort* 591:191-201
15. GOUTA, G., KSIA, E.; BUHNER-ZAHARIEVA, T.; MLIKI, A.; GOGORCENA, Y.(2012): Development of an SSR-based identification key for Tunisian local almonds. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 69 (2): 108-113.

16. GOUTA, H., KSIA, E., BUHNER, T., MORENO, M. Á., ZARROUK, M., MLIKI, A., GOGORCENA, Y. (2010): Assessment of genetic diversity and relatedness among Tunisian almond germplasm using SSR markers. *Hereditas*, 147: 283-292.
17. GOUTA, H., KSIA, E., ZOGLAMI, N., ZARROUK, M., MLIKI, A. (2008): Genetic diversity and phylogenetic relationships among Tunisian almond cultivars revealed by RAPD markers. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 83: 707-712.
18. GRASSELLY, C. (1976): Les espèces sauvages d'amandier. *Options Méditerran* 32:28-44.
19. GUPTA, P. K., BALYAN, I. S., SHARMA, P. C., RAMESH, B. (1996): Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr. Sci. India*, 70: 45-54.
20. HALÁSZ, J., FODOR, Á., PEDRYC, A., HEGEDŰS, A. (2010a): S-genotyping of Eastern European almond cultivars: identification and characterization of new (S₃₆-S₃₉) self-incompatibility ribonuclease alleles. *Plant Breeding*, 129: 227-232.
21. HALÁSZ, J., PEDRYC, A., ERCISLI, S., YILMAZ, K.U., HEGEDŰS, A. (2010b): S-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 135(5): 410-417.
22. HALÁSZ, J., PEDRYC, A., HEGEDŰS, A. (2007): Origin and dissemination of the pollen-part mutated S_C-haplotype which confers self-compatibility in apricot (*Prunus armeniaca*). *New Phytol.*, 176: 792-803.
23. HOWAD, W., YAMAMOTO, T., DIRLEWANGER, E., TESTOLIN, R., COSSON, P., CIPRIANI, G., MONFORTE, A.J., GEORGI, L., ABBOTT, A.G., ARÚS, P. (2005): Mapping With a Few Plants: Using Selective Mapping for Microsatellite Saturation of the *Prunus* Reference Map. *Genetics* 171:1305-1309
24. JACOB, H.J., LINDERPAINTNER, K., LINCOLN, S.E., KUSUMI, K., BUNKER, R.K., YI-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. évf. p. 213-224.
25. JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76 - 79.
26. KESTER, D. E., GRADZIEL, T. M. (1996) Almonds (*Prunus*) In: *Fruit Breeding*. Wiley & Sons. (Szerk. Moore J.N., Janick J.), New York, USA, pp 1-97.
27. KESTER, D.E., GRADZIEL, T.M., MICKE, W.C. (1994): Identifying pollen incompatibility groups in Californian almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119: 106-109.
28. LADIZINSKY, G. (1999): On the origin of almond. *Genet. Res. Crop Ev.*, 46: 143-147.
29. LADZINSKY (1985): Founder effect in crop plant evolution. *Economic Botany*, 39: 191-199.
30. LANSARI, A., KESTER, D.E., IEZZONI, A.F. (1994): Inbreeding, coancestry, and founding clones of almonds of California, Mediterranean shores, and Russia. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 1279-1285.
31. MARCHESE, A., BOSKOVIC, R.I., MARTÍNEZ-GARCÍA, P.J., TOBUTT, K.R. (2008): The origin of the self-compatible almond 'Supernova'. *Plant Breeding* 127: 105-107.
32. MARIETTE, S., TAVAUD, M., ARUNYAWAT, U., CAPDEVILLE, G., MILLAN, M., SALIN, F. (2010): Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*, 11: 77.
33. MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., ARULSEKAR, S., POTTER, D., GRADZIEL, T. M. (2003a): An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica*, 131: 313-322.
34. MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., SÁNCHEZ-PÉREZ, R., DICENTA, F., HOWARD, W., ARÚS, P., GRADZIEL, T. M. (2007): Almond In: *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Fruits and Nuts* (Szerk.: Kole, C.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

35. MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., SOZZI, G. O., SÁNCHEZ-PÉREZ, R., RUBIO, M., GRADZIEL, T. M. (2003b): New approaches to *Prunus* tree crop breeding. J. Food Agric. Environ., 1: 52-63.
36. MARTINS, M., FARINHA, A., FERREIRA, E., CORDEIRO, V., MONTEIRO, A., TENREIRO, R., OLIVEIRA, M. (2001): Molecular analysis of the genetic variability of Portuguese almond collections. Acta Hort., 546: 449-452.
37. MARTINS, M., SARMENTO, D., OLIVEIRA, M. M. (2004): Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep., 23: 492-496.
38. MARTINS, M., TENREIRO, R., OLIVEIRA, M. M. (2003): Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep., 22: 71-78.
39. MCCLURE, B.A., HARING, V., EBERT, P.R., ANDERSON, M.A., SIMPSON, R.J., SAKIYAMA, F., CLARKE, A.E. (1989): Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. Nature, 342: 955-957.
40. MIRALI, N., NABULSI, I. (2003): Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. Sci. Hortic.-Amsterdam, 98: 461-471.
41. MNEJJA, M., GARCIA-MAS, 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.
42. NEI, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89 évf. p. 583-590.
43. P.K. GUPTA & R.K. VARSHNEY (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163-185.
44. PAGE, R.D. (1996): TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12 évf. p. 357-358.
45. PEJOVICS B. (1968): A mandula egyes biológiai és termesztési sajátosságai. Kandidátusi értekezés. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest (Kézirat)
46. RAPAICS R. (1932): A magyarság virágai. Királyi Magyar Természettudományi Társulat, Budapest.
47. RASOULI, M., MOUSAVI, A., MOHAMMADPARAST, B., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. (2012): Optimization of the analysis of almond DNA simple sequence repeats (SSRs) through submarine electrophoresis using different agaroses and staining protocols. Journal of Nuts 3(2):17-20
48. S. KADKHODAEI, M. SHAHNAZARI, M. KHAYYAM NEKOUEI, M. GHASEMI, H. ETMINANI, A. IMANI, ARBAKARIYA B. ARIFFI (2011): A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among cultivated almonds (*Prunus dulcis*). AJCS 5(1):82-91
49. SÁNCHEZ-PÉREZ, R., BALLESTER, J., DICENTA, F., ARÚS, P., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. (2006): Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. Sci. Hortic.-Amsterdam, 108: 310-316.
50. SHARMA, D., KAURI, R., KUMAR, K., BHARDWAJ, S.V. (2012): Genetic diversity among selected genotypes of almond *Prunus dulcis* Miller D.A. Webb assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. African Journal of Biotechnology Vol. 11(83), pp. 14877-14883
51. SHIRAN, B., AMIRBAKHTIAR, N., KIANI, S., MOHAMMADI, S., SAYED-TABATABAEI, B. E., MORADI, H. (2007): Molecular characterization and genetic

- relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Sci. Hortic.-Amsterdam*, 111: 280-292.
52. SORKHEH, K., SHIRAN, B., GRADZIEL, T., EPPERSON, B., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., ASADI, E. (2007): Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 156: 327-344.
 53. SZIKRISZT, B., HEGEDŰS, A., HALÁSZ, J. (2011): Review of genetic diversity studies in almond (*Prunus dulcis*). *Acta Agron. Hung.*, 59(4): 379–395. DOI: 10.1556/AAgr.59.2011.4.9
 54. TESTOLIN, R., MESSINA, R., LAIN, O., MARRAZZO, M. T., HUANG, W. G., CIPRIANI, G. (2004): Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 459-461.
 55. VIRUEL, M. A. (1995): Construcción de un mapa genético con marcadores moleculares en almendro (*Prunus amygdalus* Batsch.). Estudio de la variabilidad intraespecífica y aplicación a la identificación varietal. Unpublished Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
 56. WRIGHT, S. (1965): The interpretation of population structure by F statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19 évf. p. 395–420.
 57. XIE, H., SUI, Y., CHANG, F.-Q., XU, Y., MA, R.-C. (2006): SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theor. Appl. Genet.*, 112: 366-372.
 58. ZEINALABEDINI, M., KHAYAM-NEKOU, M., GRIGORIAN, V., GRADZIEL, T. M., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. (2010): The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Sci. Hortic.-Amsterdam*, 125: 593-601.
 59. ZEINALABEDINI, M., SOHRABI, S., NIKOUMANESH, K., IMANI, A., MARDI, M. (2012): Phenotypic and molecular variability and genetic structure of Iranian almond cultivars. *Plant Syst Evol* 298:1917–1929

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, **Dr. Halász Júliának** és **Dr. Szikriszt Bernadettnek** nélkülözhetetlen segítségüket, munkám során nyújtott értékes tanácsaikat és türelmüket.

Külön köszönöm **Dr. Hegedűs Attila** segítségét az eredmények kiértékelésében.

Köszönettel tartozom **Dr. Pedryc Andrzejnek**, a BCE Genetika és Növénynemesítés Tanszék vezetőjének.

A növényanyag rendelkezésünkre bocsátásáért köszönettel tartozom **Prof. Carlo Fideghellinek** (CRA-Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma, Olaszország), **Dr. Craig Ledbetternek** (Agricultural Research Service, USA), **Dr. Sezai Ercislinek** (Ataturk University, Törökország), **Dr. Ossama Kodadnak** (National School of Agriculture, Marokkó), **Gutermuth Ádámnak** és **Rácz-Szabó Róbert** (BCE Kísérleti Üzem és Tangazdaság) és **Skola Istvánnak** (Ceglédi Gyümölcstermesztési Kutató-Fejlesztő Intézet Kht.).

Végül szeretném megköszönni a BCE **Genetika és Növénynemesítés Tanszék** valamennyi munkatársának kedvességét és segítőkészségét.

A kutatást az OTKA PD78124 sz. pályázat támogatta.