

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Alcea rosea fajták genetikai ujjlenyomata

Berki Zita Johanna

Kertészmérnök BSc, IV. évfolyam

Konzulens:

Dr. György Zsuzsanna: egyetemi adjunktus

Budapest, 2014

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzés.....	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1. Bevezetés.....	6
3.2. Rendszertan és rokon fajok	6
3.3. Botanikai leírás	6
3.4. Származása, elterjedése	7
3.5. <i>Alcea rosea</i> , a haszonnövény	8
3.5.1. <i>Alcea rosea</i> , a dísnövény.....	8
3.5.2. <i>Alcea rosea</i> , a gyógynövény	8
3.6. Termesztése	9
3.7. Nemesítése	9
3.8. A genetikai variabilitás vizsgálata	12
3.8.1. RAPD	12
3.8.2. AFLP	13
3.8.3. SSR	13
3.8.4. Transzpozonok.....	13
3.8.5. ISSR	14
3.8.5.1. ISSR módszer alkalmazása fajta azonossági vizsgálatokban	15
3.8.5.2. Molekuláris markerek alkalmazása a <i>Malvaceae</i> családban.....	16
4. Anyag és módszer	18
4.1. Növényanyag	18
4.2. DNS kivonás	19
4.3. PCR vizsgálat	20
4.4. Az adatok kiértékelése	21
5. Eredmények és következtetések	22
5.1. DNS kivonás	22
5.2. ISSR-PCR.....	23
5.3. Az adatok értékelése	23
6. Következtetések	30
7. Összefoglaló.....	31
8. Summary.....	32
9. Irodalomjegyzék	33
10. Köszönetnyilvánítás.....	36

Rövidítések jegyzéke

A.A.S	All America Selections
AFLP	Amplifikált fragmenthossz- polimorfizmus
bp	bázispár
DKI	NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet - Érdi Kutató Állomás (Dísznövény Kutató Intézet)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleozid-trifoszfátok
ISSR	Inter simple sequence repeat
kb	kilobázis
NAIK	Nemzeti Agrárkutató és Innovációs Központ
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal
PCR	polimeráz láncreakció
RAPD	Random amolifikált polimorfikus DNS
RNS	ribonukleinsav
SSR	mikroszatellit régió
TBE	tris-bórsav-Edta
UV	ultraibolya

1. Bevezetés

A Magyarországon őshonos kerti mályvarózsa a parasztkertek alapnövénye volt. Magas díszítőértékét az adja, hogy egész nyáron virágzik, hosszú virágszárán alulról felfelé folyamatosan hozza az új, látványos virágokat. A festészetben is megjelent Szinyei Merse Pál Málvák (1. ábra), illetve Munkácsi Mihály Virágcsendélet málvákkal című képén. Ez a dísnövényfaj nemcsak Magyarországon, hanem Németországban is nagy népszerűségnek örvend. Európában egyedülként Dr. Kováts Zoltán foglalkozott nemesítésével. Munkájának célja a növényfaj díszkertekben és közterületeken való alkalmazása volt. Az általa nemesített öt fajtasorozat külföldön nagy népszerűségnek örvend, alapanyagként máig használják a nemesítési munkálatokban. A legújabb cél a mályvarózsa elleni rezisztencia kialakítása, mivel sajnos ez a betegség jelenti a legnagyobb veszélyt a növényekre, és a *Malvaceae* család összes tagja érzékeny a rozsdás fertőzésre (Szabó Mária, szóbeli közlés).



1. ábra. Szinyei Merse Pál: Málvák.

2. Célkitűzés

A Dr. Kováts Zoltán által nemesített *Alcea rosea* 'Balaton' fajtasorozat első tagja (lilarózsaszín) 1957-ben kapott állami elismerést. Ez a fajta 1971-ben a Sluis & Groot holland cég bejelentése után az észak-amerikai All America Selections (A.A.S.) elismerését is elnyerte. A teljes fajtasorozat 1975-re készült el, melynek mind a hat tagja elnyerte a hazai elismerést, illetve az A.A.S. elismerését is. Magját az egész világon való terjesztés céljával a Sluis & Groot forgalmazta a nemesítő megbízásából. A később előállított bíborszínű fajtát, mely szintén megkapta az A.A.S. illetve a Fleuroselect elismerését, a Hem Zalden nevű cég forgalmazta, azonban ez a társaság már nem Magyarországon termeltette a szaporítóanyagot valamint a licencdíjat sem fizette, ami ellentétben állt a szerződésben foglaltakkal (Kováts Zoltán feljegyzései).

A nemzetközileg is mértékadó Fleuroselect társaság minden évben értékeli az újonnan nemesített fajtákat, és az általuk legszebbnek ítélt növénynek egy díjat ad. 2012-ben ezt az arany érmet a Takii cég 'Spring Celebrities' nevű *Alcea rosea* fajtasorozata kapta. Érdekesség, hogy ezek az *Alcea rosea* fajták csíranövény, palánta és virágos növény formájában is kinézetre teljesen megegyeznek a Kováts Zoltán féle 'Balaton' fajtasorozattal. A Takii cég az utódja annak a dán Ohlsens Encke cégnek, amit annak idején az Agrimpex megbízott a magok Nyugat-Európai forgalmazásával. Célunk volt a Kovács Zoltán által nemesített fajták és a Takii fajták összehasonlítása molekuláris markerekkel, annak érdekében, hogy kiderüljön, van-e kapcsolat (esetleg azonosság) a két fajtasorozat között.

A munka során:

- DNS-t vontunk ki mindkét fajtakörbe tartozó fajták egyedeiből,
- PCR alapú ISSR markerezési technikával vizsgáltuk őket,
- majd kiértékeljük az eredményeket és levontuk a következtetéseket.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Bevezetés

Az *Alcea rosea*, magyar nevén kerti mályvarózsa, egy ma Magyarországon vadon nem előforduló kerti dísznövény (Rácz *et al.*, 1984). A fajon belül egyes változatait gyógynövényként tartják számon, pl: *Alcea rosea* var. *nigra* (Németh, 1993). A kertekben ültetett mályvák között létezik egynyári és kétnyári, a gyógynövényként termesztett változat pedig évelő lágyszárú növény (Schmidt, 2002, Németh, 1993). Érdekesség, hogy Japánban, Kiotóban minden év május 15-én megrendezik az Aoi Matsurit, egy fesztivált, ami a mályvarózsról kapta a nevét és ennek a növénynek a levelei alkotják a díszítést. Ennek oka, hogy a Kiotóban található Kamo Shrine szentély komplexum címerében a kétlevelű mályvarózsa szerepel (Anonymus, 2014a).

3.2. Rendszertan és rokon fajok

A faj a *Malvales* rendbe, ezen belül pedig a *Malvaceae* családba tartozik. Ezen a családon belül további öt alcsaládba sorolták a rokon fajokat. A faj a *Malvoideae* alcsalád tagja és a körülbelül hatvan másik *Alcea* faj mellett szoros kapcsolatot mutat többek között az *Althea officinalis*-sal (Orvosi ziliz) és a *Gossypium hirsutum*-mal (Hegyvidéki gyapot). Az *Althea* és *Alcea* nemzetség tagjait a virág átmérőjének hossza alapján lehet megkülönböztetni. A 30 mm-es átmérő alatt *Althea*, 30 mm felett pedig *Alcea* nemzetségbe soroljuk a fajokat. Az *Alcea* azonban sok esetben az *Althea* szinonímájaként jelenik meg, ez koronként és szerzőnként változik. Linné 1753-ban még külön nemzetséggként közölte az *Althea*-t és az *Alcea*-t (Kováts Zoltán feljegyzései). Közeli rokon faj az *Alcea biennis*, amely kétéves, 50-150 cm magas növény. Szára felálló, egyszerű vagy elágazó és mind a levél mind a levélnyél csillagszőrös. Virága 30 mm-nél nagyobb, színe halvány rózsaszín, de létezik fehér mutánsa is, amely kiváló keresztezési alapanyag, júliustól októberig virágzik. Szórványosan elterjedt keleti faj (Simon, 2000). Legismertebb dísznövény rokonai a *Hibiscus* (Törökrózsa) félék. Érdekesség még, hogy ugyan nem egy alcsaládba, de egy családba tartozik például a majomkenyérfával (*Adansonia digitata*), a hársakkal (*Tilioidae*) és a kakaófával (*Theobroma cacao*). Ezekről azonban mind életformájában, mind terméstípusában eltér (Udvardy, 2008).

3.3. Botanikai leírás

Az *Alcea rosea* változó magasságú faj, a hagyományos 150-200 cm magasság mellett vannak törpe növekedésű, 40-150 cm magas fajták is. Nem-elágazó szárral és mélyre hatoló

karógyökérrel rendelkezik, 5 karéjú levelei kerekdedek. Virágai nagyok, átmérőjük 30 mm körül van, majdnem ülők, végálló füzérszerű fürtöt alkotnak. A hímelőző virágoknak ötszögletű, csupasz porzócsőve és oldalállású, fonalas termője van, amelyben a termőlevelek száma 18-40 lehet (Baker, 1890 idézte Kováts Zoltán feljegyzéseiben). Virágszíne széles skálán változik. Júniustól októberig virágzik (Rácz *et al.*, 1984). Lapított papsajt terméséből a magok könnyen peregnek. Kromoszómaszáma 42, csakúgy, mint a többi *Alcea* fajnak. Ez azért fontos, mert a nemesítési munka során nehézséget okoz, hogy a nem azonos kromoszómaszámú vonalak keresztezésével a hibrid steril lesz. Ennek legjobb példája a 'Háros' fajta. A nemesítési munkák során sikerült előállítani elágazó szárú fajtát is (Szabó Mária, szóbeli közlés).



2. ábra. *Alcea rosea* (<http://doctorschar.com/archives/hollyhock-althea-rosea/>)

3.4. Származása, elterjedése

Magyarországon őshonos, a Balkán-félszigetről származik. Az 1400-as években került Európába, (Anonymus, 2014b). Kivadulásra nem hajlamos, kerteken kívül nem fordul elő. Napjainkban Európában főként Németországban kedvelt dísznövény, de Kínában és Japánban

is népszerű (Tang, 2007). A Mályvafélék rendjébe tartozó több mint hétszáz faj hazája a trópusokon van, a mérsékelt égövben kevesebb, hideg vidéken egyáltalán nem él meg (Gerő, 1897, Kováts Zoltán feljegyzései). Az *Althea* nemzetség tagjai mind a trópusi Ázsia és Afrika területein honosak (Anonymus, 2014c).

Az *Alcea biennis* keleti eredetű, elterjedési területe Dél- és Közép-Európa. Kétéves, 50-150 cm magas növény (Kováts Zoltán feljegyzései).

Az *Alcea officinalis* ártéri mocsarakban, szikeseken, gyomtársulásokban elterjedt rokon faj (Simon, 2000).

3.5. *Alcea rosea*, a haszonnövény

3.5.1. *Alcea rosea*, a dísznövény

A kerti mályvarózsa a parasztkertek alapnövénye volt. Magas díszítőértékét az adja, hogy egész nyáron virágzik, hosszú virágszárán alulról felfelé folyamatosan hozza az új, látványos virágokat. Ez a dísznövényfaj Európában nemcsak Magyarországon, hanem Németországban is nagy népszerűségnek örvend. Európán kívül főleg a távol-keleti országokban terjedt el mint dísznövény (Kováts Zoltán feljegyzései).

3.5.2. *Alcea rosea*, a gyógynövény

A gyógyszeripar magas nyálkatartalma miatt a virágját használja köhögéscsillapító gyógyszerek készítésére és hurutos megbetegedések kezelésére (Németh., 1993). Nem csak virágának, de levelének és gyökerének is van gyógyhatása. Az ázsiai népgyógyászat széles körben használja különböző hurutos megbetegedések kezelésére, mint például vizeleti zavarok, hasmenés és székrekedés. Iránban gyökerének kivonatát különböző vese panaszok kezelésére tesztelik napjainkban (Ahmadi *et al.*, 2012). Virágában és levelében nagy molekulatömegű, mucin jellegű poliszacharidok találhatóak. A magjainak vizes oldatából készített kivonat alkaloidokat, szénhidrátokat, valamint flavonoidokat tartalmaz. A virágok forrázásával köhögéscsillapító főzetet, míg a virágszirmok langyos vagy hideg vízben való áztatásával antioxidáns tartalmú teát kapunk. Nem csak teaként használható, hanem vizes borogatással külső, fekélyes és gyulladt sebek kezelésére is (Al-Snafi, 2013).

Az élelmiszeripar természetes eredetű festékeként való felhasználás okán foglalkozik vele (Schmidt, 2002).

3.6. Termesztése

Nem vízigényes, fényben gazdag, szélvédett helyen bőven virágzik. Szaporítása magról történik. Magjai már első évben jól csíráznak, a magvetés ideje március-április. Csírázás után cserepezhetjük, de állandó helyre is vethetjük. Termesztése során figyelni kell arra, hogy tápanyagigényes növény. Kedveli a napfényes fekvést. A mályvarozsda, mályvabolha, mályvamoly, ormányos bogarak, takácsatka és a levéltetű ellen kell védekezni (Schmidt, 2002).

3.7. Nemesítése

Az *Alcea rosea* nemesítésével Európában egyedülként Dr. Kováts Zoltán kezdett foglalkozni, azzal a céllal, hogy a közterületeken való alkalmazhatóság végett a növény magasságát csökkentse, szárát elágazóvá formálja, az életformáját úgy alakítsa, hogy már első évben hozzon virágot, illetve, hogy virága tömöttebb legyen. Jelenleg a legfontosabb cél a mályvarozsda elleni rezisztencia kialakítása, hiszen ez a legveszélyesebb kórokozó, amely esős nyarakon nagy arányban fertőzi a fajt. Virágainak színe a teljes színskálát lefedi. Öt magyar nemesítésű fajtacsoport létezik: 'Hungaria', 'Balaton', 'Pannonia', 'Háros' és a 'Festőmályvák'. A nemesítési munkában Dr. Kováts Zoltán nemesítő új növekedési formákat és virágformákat állított elő, az új fajtatípusokat (1. táblázat) illetve fajtákat külföldön magyar mályva néven forgalmazzák (Schmidt, 2002).

1. táblázat. A magyar nemesítésű *Alcea rosea* fajtakörök és fontosabb tulajdonságaik.

	Magasság	Növekedési típus	Színskála	Virágtípus
'Hungaria'	100-150 cm	bokros	fehértől bordó	Anemone
'Balaton'	60-80 cm	bokros	fehértől bordó	Laciniata
'Pannonia'	40 cm	bokros	fehértől bordó	Laciniata
'Háros'	150-200 cm	bokros	rózsaszín-lila	Anemone
'Festőmályvák'	150-200 cm	szálas	sötétbordó (fekete)	Anemone

A 'Balaton' fajtacsoport egy törpenövekedésű, 60 cm magas, fajhibridizációs módszerrel nemesített 6 elismert fajtaival rendelkező sorozat (3. ábra). Az *Alcea rosea (annua)* és az *Alcea biennis* Winterl keresztezésével állította elő Dr. Kováts Zoltán. A fajta 1957-ben államilag, 1971-ben pedig az All America Selection cég által elismert fajta lett. A sorozat első tagja a lilarózsaszín volt, melynek színe leginkább hasonlít a vad fajéra. Ennek a 10000 töves

ültetvényében jelent meg egy spontán mutáció következtében a fehér színű, mely a második fajta lett a csoportban. 1975-re elkészült a hat tagból álló sorozat. 1975-ben a Sluis & Groot katalógusának címlapjára került, és a nemesítő – Kováts Zoltán – megbízásából ez a cég lett a forgalmazója a magnak, így terjedhetett el az egész világon. Később a fajtakör hetedik tagját, a bíborszínű fajtát is előállították, melyet a Hem Zaden nevű cég forgalmaz (Kováts Zoltán feljegyzései, Szabó Mária szóbeli közlés).



3. ábra. ‘Balaton’ fajtakör színei: balról jobbra: fehér, sárga, lazac, mályvalila, piros, sötétrozaszín, bíborfelhő (fotó: Szabó Mária).

A 2003. évi LII. törvény „A növényfajták állami elismeréséről, valamint a szaporítóanyagok előállításáról és forgalomba hozataláról” az egyéves lágyszárú növények esetében nem teszi kötelezővé a fajták állami elismerését. Az új növények magjaiból a tápiószelei génmegőrző központba kell küldeni mintát, ahol kap egy fajtajegyzék számot. Ez után szabadon lehet forgalmazni. Amennyiben valaki úgy dönt, hogy szeretné elismertetni a fajtát, van rá lehetőség, azonban a NÉBIH nem biztosít fajtavédelmet így sem.

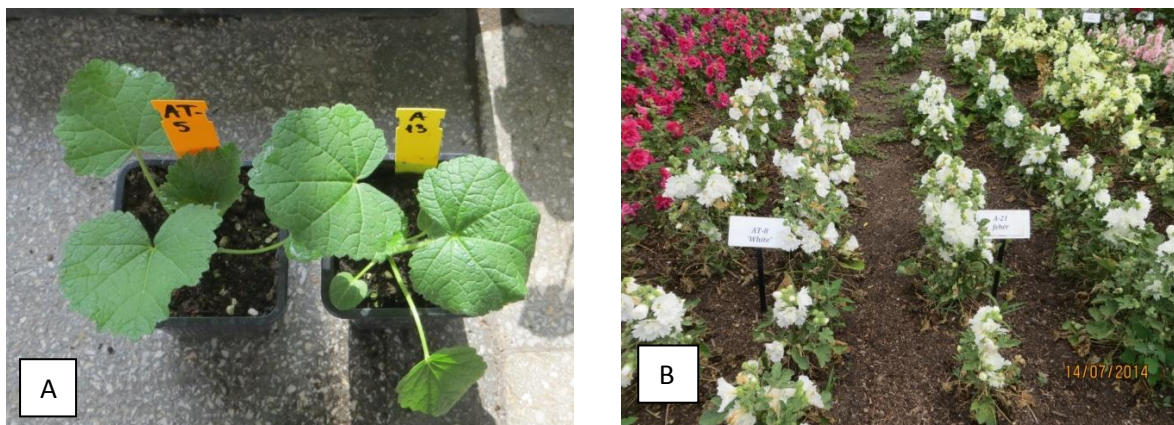
A Takii cég ‘Spring Celebrities’ nevű fajtasorozata szintén *Alcea rosea* nemesítésből származik. ‘Crimson’ nevű tagja 2012-ben elnyerte a Fleuroselect aranyérmét (4. ábra). Ez a

sorozat a faj legújabb fajtáit foglalja magában. Bokros, törpenövekedésű növények, melyek erős szarát és gyönyörű, hatalmas virágzatokat képeznek. Alkalmasak kertbe, ládába és virágágyba való ültetésre. A fajtasorozatba tartozó növények 14-16 héten keresztül virágznak, kis víz igényűek. A hideg körülmények elősegítik az elágazóbb növények kialakulását. Nagy díszítőértéke és különböző árnyalatú virágai miatt díszkertek, közterületek dekorálására használható (Anonymus, 2014d).



4.ábra. A Takii cég 'Spring Celebrities' fajtasorozatának ismertetője.

A NAIK Gyümölcstermesztési Kutatóintézetében elvégeztek egy összehasonlító kísérletet, a magyar 'Balaton' fajtasorozat és a japán 'Spring celebrities' fajtasorozat fajtáival. A két fajtasorozat összes tagjának magjait azonos időpontban és megegyező körülmények között elvetették, és a növényeket felnevelték. A kísérlet teljes időtartama alatt a két fajtasorozat fenntartása ugyanolyan körülmények között történt. Különbőség a mag alakjától eltekintve sem a csíranövényen, sem a palántán, valamint a kifejlett növényen sem volt észlelhető, amint az az 5. ábrán is megfigyelhető (Szabó Mária, szóbeli közlés).



5. ábra. Az *Alcea rosea* 'Balaton' és 'Spring Celebrities' fajtakör összehasonlítása termesztés során. A: palánták (AT-Takii fajta, A-'Balaton'). B: teljes virágzásban (fotó: Szabó Mária).

3.8. A genetikai variabilitás vizsgálata

A molekuláris markerek olyan biokémiai markerek, DNS szakaszok, amelyek fehérje vagy DNS szinten teszik lehetővé a vizsgált fajok, fajták, genotípusok elkülönítését (Tanksley, 1983). Előfordulhat, hogy ezek a DNS szakaszok nem jelennek meg fenotípusosan, aminek oka, hogy gyakran a nem-kódoló régióban találhatók. A molekuláris markerek alkalmasak egyedek, fajták, fajok, családok, rendek, osztályok, törzsek, populációk jellemzésére és elkülönítésére. A különböző markerezési eljárásokat két csoportba oszthatjuk: a hasításon és a PCR-en alapuló technikákra (György, 2013). A következőkben röviden ismertetem a főbb random illetve szekvencia specifikus markerezési technikákat.

3.8.1. RAPD

A Random Amplified Polymorphic DNA technikát Williams és munkatársai írták le 1990-ben. Ez a módszer véletlen primereken és PCR-en alapuló technika. Segítségével a genom ismeretlen DNS szekvenciáit lehet felszaporítani a választott primerekkel. Polimorfizmus jelentkezik amennyiben a primerek több DNS szakasz amplifikációját eredményezik. A polimorfizmust a primer kötőhelyi DNS-szekvencia-különbsége illetve az amplifikált régióban vagy a primer kapcsolódási helyén megjelenő mutáció okozza (Hajósne Novák, 1999). Ezt a gélen való elválasztáskor láthatjuk, amennyiben az elválasztott fragmentumok mérete és száma eltérő. A RAPD-ok domináns öröklődésűek, így a heterozigotáság kimutatására alkalmatlanok (György, 2013). Alkalmazásához nem szükséges

előzetes szekvenciaismeret. Kiválóan alkalmazható mind egyed szinten mind populáció elemzésre, valamint géntérképek készítésére (Hadrys *et al.*, 1992.).

3.8.2. AFLP

Az amplifikált fragmenthossz polimorfizmus módszerét Zabeau és Vos (Key Gene, Hollandia) 1993-ban szabadalmaztatta és 1995-ben publikálta (Hajósne Novák, 1999). Lényege hogy a DNS-t két restrikciós enzimmel feldaraboljuk, a fragmentekhez adaptereket ligálunk és PCR segítségével szelektív primerekkel amplifikáljuk a restrikciós fragmentumok egy csoportját. Ezek után poliakrilamid gélen elválasztjuk a DNS darabokat. A technika nagy előnye, hogy bármely fajra alkalmazható előzetes szekvencia ismeret nélkül is (György, 2011). Hátránya, hogy domináns öröklődésű, de részletes pedigre elemzés során már sikerült azonosítani kodomináns öröklődésű AFLP markereket is (Mueller és Wolfenbarger, 1999). A módszernek három lépése van: a DNS restrikciója és ligálása, a restrikciós fragmentek amplifikációja és a fragmentek elemzése (Vos *et al.*, 1995).

3.8.3. SSR

A Simple Sequence Repeat, más néven mikroszatellit szekvenciák, rövid tandem ismétlődő régiók. 10-60 bázispár hosszú a genomban egyenletesen eloszló, könnyen amplifikálható, nagy polimorfizmust mutató DNS-szakaszok. A mikroszatellitek hosszpolimorfizmusa alkalmas populációs tanulmányokra, kapcsoltsági, valamint fizikai térképek készítésére illetve fajtaazonosításra (Hajósne Novák, 1999). A genetikai markerként használt mikroszatellitek a legtöbb esetben az intronokban, illetve nem kódoló DNS szakaszokban találhatóak és nagyjából az egész genom 3%-át alkotják (Ellergén, 2004).

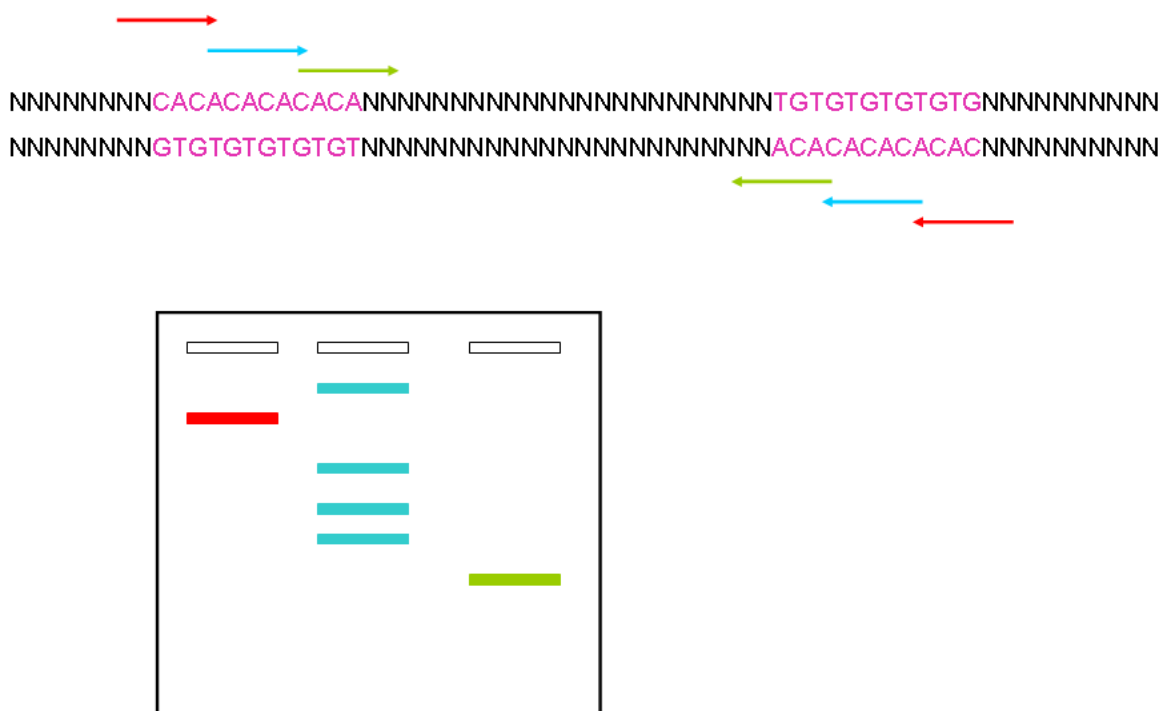
3.8.4. Transzpozonok

A transzpozonok ugráló genetikai elemek, jellemzőjük hogy a genomon belüli helyüket képesek változtatni. Mozgásuk mutációt idézhet elő. Megakadályozhatják, vagy megváltoztathatják a génkifejeződést amennyiben egy gén kódoló szekvenciájába épülnek be. Abban az esetben, ha a transzpozon később kivágódik a génkifejeződés helyre áll. Áthelyeződésüknek két féle változata ismert, a konzervatív és a replikatív áthelyeződés. A konzervatív áthelyeződés alkalmával a genomban az elemek száma nem változik. A replikatív áthelyeződés esetében a mozgékony elemnek új példánya keletkezik, így az eredeti helyén és

az inszerció helyén is lesz belőle egy-egy példány, így az elemek száma nő. Az eukarióta transzpozonoknak két típusa van, amelyik DNS-ként helyeződik át, és amelyik RNS közvetítésével változtatja a helyét (Maróy és Török, 2009).

3.8.5. ISSR

Az Inter Simple Sequence Repeats módszer egy mikroszatellit régiókra épülő technika, amelyben a primerek magukhoz a mikroszatellit régiókhoz kötődnek (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Egy primerre épülő technika, a RAPD-hoz hasonlóan. A tervezett primerek túlnyúlnak az ismétlődést tartalmazó szakaszon, így közvetlenül a mikroszatellitet tartalmazó régió elejéhez vagy végéhez kapcsolódnak (6. ábra), így biztosítható, hogy egy régióról csak egy féle másolat képződjön (György, 2013). Ez egy olyan technika, ami kombinálja a mikroszatellitek és az AFLP előnyeit a RAPD-dal. Az ISSR markerek polimorfok és kiválóan alkalmazhatóak a genetikai változatosság és evolúció-biológiai kutatásokban, valamint gén térképezésre is (Pradeep Reddy, 2002). Alkalmasságát fajtaazonosításra és megkülönböztetésre több kutatás is igazolja.



6. ábra. ISSR módszer elve, miszerint az alkalmazott primerek magára a mikroszatellit régióra vannak tervezve. Amennyiben a primerek (zöld, piros) az ismétlődő régió egyik széléhez (5'

vagy 3') kapcsolódnak úgy, hogy túl is nyúlnak a régió megakadályozható, hogy akár több másolat is készüljön ugyanarról a régióról (kék) (György, 2011).

3.8.5.1. ISSR módszer alkalmazása fajta azonossági vizsgálatokban

A következőkben a fajon belüli polimorfizmus kimutatására az ISSR módszer alkalmasságát igazoló kutatásokat mutatok be.

Joshi és munkatársai (2000) ISSR markereket használtak *Oryza* fajok genetikai változatosságának és filogenetikai kapcsolatának vizsgálására. Az általuk használt harminc primer közül tizenegy szolgált a genetikai diverzitás kimutatására, miután ezek mutattak polimorfizmust. Illetve az alkalmazott markerek alkalmasak voltak genetikai ujjlenyomat készítésre.

Az ISSR módszert Gunnarsson és munkatársai is használták 2005-ben *Sphagnum angermanicum* fajok genetikai struktúrájának és variabilitásának tanulmányozására.

Keller-Przybylkowicz és munkatársai (2005) kutatásának célja a feketeribiszke növény korai fejlődési stádiumában, fekete és zöldbogyós fajták elkülönítése volt a genotípus alapján. Huszonhárom ISSR és hat RAPD primerrel sikerült elkülöníteni a zöld bogyót adó fajtát. Ez a kutatás is bizonyítja, hogy az ISSR technika kiválóan alkalmazható a molekuláris növénynemesítésben is.

Argentínában Escandón és munkatársai 2007-ben ISSR és AFLP markereket használtak új *Nierembergia linariaefolia* fajták molekuláris azonosítására. A genetikai ujjlenyomat vizsgálathoz tizenhárom ISSR és hat AFLP primert alkalmaztak. Az ISSR markerek polimorfizmusának aránya 91-100% között volt. Ez az arány is mutatja, hogy a módszer kiválóan alkalmas a genetikai diverzitás vizsgálatára. A vizsgálat kimutatta, hogy a hat új fajta két külön csoportba sorolható.

2007-ben Li-Wang és munkatársai az ISSR módszert választották harmincöt retek fajta genetikai ujjlenyomatának megalkotására, illetve a genetikai változatosságának vizsgálatára. Ehhez huszonkét ISSR primert alkalmaztak, melyek 85,2 %-ban mutattak polimorfizmust. A fajták megkülönböztetéséhez kilenc primer kombinációjára volt szükség.

A nemesítés megkönnyítése céljából kínai kutatók huszonnégy szegfű fajtának vizsgálták a genetikai variabilitását ISSR módszerrel, valamint összehasonlították a morfológiai és genetikai markerekkel történő megkülönböztetés eredményességét. Ehhez tíz primert

használtak melyek 81-100%-os arányban mutattak polimorfizmust. A molekuláris markerekkel történő összevetés ugyan pontosabb, de a morfológiai vizsgálatoknak megvan az az előnye, hogy közvetlenül a termőhelyen lehet vizsgálni a növény megjelenését. Az eredmény megerősítette a választott fajták nagy genetikai variabilitását és alkalmasságát további nemesítési munkálatokra (Fu *et al.*, 2008).

Ye és munkatársai 2008-ban más módszerek mellett kilenc ISSR primert is alkalmazott húsz rézvirág (*Zinnia elegans*) fajta genetikai variabilitásának felmérésére. A használt módszerek közül az ISSR bizonyult a legalkalmasabbnak a családfaelemzésre és a variabilitás elemzésére.

A lengyel flóra veszélyeztetett faja a *Chamaedaphne calyculata*, melynek tíz populációból származó egyedeinek genetikai variabilitásának vizsgálatát végezték el Szczecinska és munkatársai (2009) szintén ISSR markerekkel. Meglepő módon a vizsgálat nagy diverzitást mutatott faj szinten. Az általuk használt nyolc primer a populációkban 8,75- 48,75%-ban mutatott polimorf lókuszokat.

Indiai kutatók egy új krizantém fajta azonosítására használtak ISSR markereket. Az új fajtára jellemző genetikai ujjlenyomatot összehasonlítva a régebbi fajták ujjlenyomatával, az eltérő mintázat alapján igazolták, hogy valóban új fajtát hoztak létre (Palai és Rout, 2011).

Az édes granadilla és a maracuja lila és sárga gyümölcsű fajtájának genetikai variabilitását Santos munkatársaival tizennyolc ISSR markerrel vizsgálta (2011). A primerek által amplifikált fragmentek 98%-a mutatott polimorfizmust. A kutatás eredményeként sikerült a negyvenöt féle genotípus különbségeinek tanulmányozása. Ez is bizonyítja a módszer alkalmasságát a genetikai variabilitás vizsgálatára és a nemesítés elősegítésére.

3.8.5.2. Molekuláris markerek alkalmazása a *Malvaceae* családban

Escobar García és munkatársai (2009) a *Malvaceae* családba tartozó alcsaládokkal kapcsolatban végzett kutatást, melynek célja többek között az *Althea*, *Alcea* *Lavatera* és *Malva* fajok közötti kapcsolat vizsgálata volt. Ehhez ITS, psbA-trnH, trnL- trnF, matK plusz trnK és ndhF markereket használtak. Ezek a makerek nem mutattak különbséget, a morfológiai vizsgálatok alapján levont következtetések megerősítéséhez más markerek alkalmazására lesz szükség.

Nyolc *Malva* taxon genetikai kapcsolatának megvizsgálására Celka és munkatársai (2010) ISSR molekuláris markereket használtak, melyek megerősítették a kutatást megelőző

molekuláris analízis eredményét. Nyolc ISSR markert használtak, melyeknél a polimorfizmus mértéke 84-100% között volt. Az alkalmazott primerek tizenhat fajspecifikus fragmentet mutattak, amelyek nem mutattak polimorfizmust intraspecifikus szinten.

A kerti mályvarózsa genetikai variabilitásának vizsgálatára iráni kutatók használtak RAPD markereket. Cikkükben hivatkoznak arra, hogy nincs olyan publikáció, melyben említették volna, hogy már használtak molekuláris markereket *Alcea rosea* fajok variabilitásának vizsgálatára. Az eredmény kimutatta a mályvarózsa fajok magas genetikai változatosságát, a hatvan vizsgált populációt hét csoportba osztották (Kazemi *et al.*, 2011).

4. Anyag és módszer

4.1. Növényanyag

Az *Alcea rosea* ‘Balaton’ fajtasorozatot hasonlítottuk össze a Takii cég ‘Spring Celebrities’ fajtasorozatával. A vizsgált növényanyagot a NAIK-Gyümölcsstermesztési Kutató Intézet Érd-Elvirai Állomásáról kaptuk. A növényanyag előállítása a következőképpen zajlott: mind a két fajtasorozat magjait március elején ugyanolyan tőzeges keverékkel teli 4x4-es szaporító ládákba szemenként helyrevertették üvegházban (7. ábra). Március végén három-négy leveles állapotban edzés céljából, először fóliasátorba, majd Rusel háló alá helyezték (8. ábra). A kiültetésre május elején került sor. A munkálatok során a két fajtasorozat növényei azonos helyen nevelkedtek és azonos kezeléseket részesültek. Így az esetleges különbségek okai közül a környezeti hatások szempontját kizárhatjuk.



7. ábra. Két szikleveles állapotban lévő palánták (fotó: Szabó Mária).



8. ábra. A növényanyag begyűjtése a palánták 3-4 leveles állapotában történt (fotó: Szabó Mária).

4.2. DNS kivonás

A DNS kivonásához 3-4 lombleveles állapotban gyűjtöttünk leveleket (8. ábra), minden fajta esetében (2. és 3. táblázat) 10-10 növényegyről, majd további felhasználásig lefagyasztottuk őket.

A genomi DNS-t először -20 °C-on fagyasztott levelekből vontuk ki, a magyar fajtákból, azonban a levélben található magas poliszacharid tartalom miatt a kivonás során problémáink adódtak. Végül új csíranövények szikleveléből sikerült kivonni a molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez szükséges DNS-t. A japán fajtasorozat esetében az első körben gyűjtött lomblevelekből történt a DNS kivonás. A DNS-t az E. Z. N. A. SP Plant Mini Kit (Omega, VWR International Kft) segítségével izoláltuk és a hozzá rendelt protokollt követtük. A kivont DNS mennyiségét NanoDrop (Bioscience, Budapest) készülékkel, minőségét 1%-os TBE agaróz gélen ellenőriztük.

2. táblázat. A 'Balaton' fajtasorozat növényanyaga kódszámokkal.

Szám	Név	Szín
1	A-28	Bíborfelhő
2	Háros	
3	A-23	Lazac
4	A-22	Sárga
5	A-26	Piros
6	A-25	Mályvalila
7	A-21	Fehér
8	A-27	Sötét rózsza
9	<i>Alcea biennis</i>	

3. táblázat. 'Spring celebrities' fajtasorozat növényanyaga kódszámokkal:

Szám	Név	Szín
1	AT-1	Apricot
2	AT-2	Carmine-Rose (Sötét rózsza)
3	AT-3	Crimson (Bíborfelhő)
4	AT-4	Lemon(Sárga)
5	AT-5	Pink (Lazac)
6	AT-6	Purple (Mályvalila)
7	AT-7	Rose (Piros)
8	AT-8	White (Fehér)

4.3. PCR vizsgálat

A vizsgálat elvégzéséhez a British Columbia Egyetemen leírt, ISSR vizsgálatokhoz kifejlesztett primerek közül választottunk 15 db-ot (The Michael Smith Laboratories, University Of British Columbia, primer set 9, Vancouver, BC, Kanada). A primerek szekvenciája a 4. táblázatban látható.

A PCR reakcióelegy térfogata 15 µl volt, amely 20-50 ng DNS-t, 10X PCR reakció puffert, 1,5 mM MgCl₂, 0,02 mM dNTP mix, 2,5 mM primert, valamint 0,5 egység DreamTaq DNS polimerázt (Fermentas, Szeged, Magyarország) és steril desztillált vizet tartalmazott. A PCR-hez SwiftTM MaxPro (Esco Micro Pte. Csertex, Budapest) típusú PCR készüléket alkalmaztuk a következő hőmérsékleti profillal: elődenaturáció 94°C 4 percig,

majd 40 cikluson át 94°C-on 60 másodpercig, 49°C 90 másodpercig, ezután 72°C-on 90 másodpercig, és egy végső szintézis 72°C-on 7 percig. A PCR termékek jelenlétét 1%-os (w/v) etídium bromiddal festett agaróz gélben, 1xTBE pufferben xilencianol festékkel ellenőriztük. A minták elemzéshez a PCR termékeket 2 órán át 120 V-on választottuk szét, majd értékeltük a gélek mintázatát.

4. táblázat. A PCR vizsgálat során használt primerek szekvenciái.

Primer	Szekvencia
807	AG AG AG AG AG AG AG AG T
808	AG AG AG AG AG AG AG AG C
811	GA GA GA GA GA GA GA GA C
812	GA GA GA GA GA GA GA GA A
817	CA CA CA CA CA CA CA CA A
825	AC AC AC AC AC AC AC AC T
826	AC AC AC AC AC AC AC AC C
840	GA GA GA GA GA GA GA GA Y T
841	GA GA GA GA GA GA GA GA Y C
842	GA GA GA GA GA GA GA GA G
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
873	GACA GACA GACA GACA
887	DVD TC TC TC TC TC TC TC
888	BDB CA CA CA CA CA CA CA
889	DBD AC AC AC AC AC AC AC

4.4. Az adatok kiértékelése

A PCR-el amplifikált fragmentumok gélen való elválasztása után értékeltük a gélek mintázatát. Prezencia/abszencia típusú táblázatot készítettünk az értékelés alapján. Az adott méretnél jelenlévő fragmentumokat 1-essel, a hiányzókat 0-ással jelöltük. Az adatokat Ms Excel táblázatban összesítettük. Az Excelben páronként összehasonlítottuk a 2 fajtakör azonos színárnyalatait képviselő mintákat.

Ezek után a PAST (Hammer *et al.*, 2001) program segítségével főkoordináta elemzést is készítettünk illetve dendrogramot rajzoltunk.

5. Eredmények és következtetések

5.1. DNS kivonás

A magyar fajták esetében a DNS kivonás során a levelek magas poliszacharid tartalma miatt problémáink adódtak, ezért a fajtasorozat magjait újracsíráztattuk, és a növény 2-3 lombleveles állapotában szikleveleket gyűjtöttünk róluk. Fajtánként tíz növényről gyűjtöttünk egy-egy levelet és ebből az anyagból már sikeresen sikerült elkülöníteni a nukleinsavat. A japán fajtákkal nem volt ilyen probléma, már a lomblevelekből is sikeres volt a DNS kivonás. A kivont DNS mennyiségét és minőségét Nanodrop készülékkel ellenőriztük, melynek eredményét az 5. táblázat tartalmazza. Három magyar fajta: a 'Bíborfelhő', 'Lazac' és 'Háros' esetében nem sikerült használható DNS-t izolálnunk, így ezeket kihagytuk a vizsgálatból.

5. táblázat: A minták spektrofotométerrel történt ellenőrzésének eredményei.

Minta	Koncentráció ng/μL	260/280	260/230
A-22	18,91	2,15	1,64
A-26	60,31	1,82	1,72
A-25	22,71	1,86	2,11
A-21	57,77	1,88	2,61
A-27	4,86	1,92	0,12
<i>Alcea biennis</i>	22,14	1,80	7,30
AT-1	9,99	1,81	1,03
AT-2	4,38	9,61	68,30
AT-3	3,55	3,76	-12,28
AT-4	3,37	-0,44	1,03
AT-5	10,21	2,38	13,19
AT-6	79,11	1,85	1,75
AT-7	3,98	1,41	0,53
AT-8	62,88	1,81	1,39

5.2. ISSR-PCR

A kivont DNS minták ellenőrzése után a rendelkezésünkre álló primereket is teszteltük. Huszonegy darab primerből tizenöt működött, így ezekkel folytattuk tovább a munkálatokat. A másik hatot (809, 810, 827, 857, 885, 823) miután a próba után nem mutatták jelét amplifikációnak, nem használtuk a későbbiekben. Mivel az általunk használt tizenöt primer alkalmas volt a polimorfizmus kimutatására, kétséget kizáró eredményt kaptunk, nem találtuk szükségesnek újabb markerek és egyéb módszerek tesztelését. Természetesen abban az esetben, ha az ISSR markerekkel végzett reakciók után az eredmény azonosságot mutatott volna, mindenképpen alkalmazni kellett volna másik technikát is. Az alkalmazott primerek által amplifikált fragmentumok számát és a polimorfizmus arányát a 6. táblázat mutatja. A legnagyobb polimorfizmust a 887 (100%), a 817 (86%) és a 873 (83%) számú primerek adták.

5.3. Az adatok értékelése

A gélen látott eredményeket Excel táblázatba vezettük át, amelyet a 9. ábra mutat be. A sorok színei az adott fajta színét jelölik a 'Balaton' és a 'Spring Celebrities' fajtasorozatból egyaránt. Ez által láthatóvá váltak az egymásnak megfelelő fajták. Ez a színkód könnyebbé tette az összehasonlítást is. A táblázatban látható, hogy melyik primerrel hány szakasz amplifikálódott, illetve, hogy ezek a szakaszok melyik fajtákban voltak jelen. A mintákat elemezve az általunk használt tizenöt primerből három esetben kaptunk teljesen azonos mintázatot minden fajta esetében. Tizenkét primerrel találtunk különbséget a gélen látható szakaszok között. Egymás alá helyezve a párokat, primerenként végig néztük a regisztrált adatokat. Az eredmények alapján az egyes fajták csak 15-35 %-os eltérést mutattak. A következőkben ezeket a táblázatokat használtuk fel a főkoordináta elemzéshez is.

	887-1	887-2	887-3	887-4	887-5	887-6	887-8	887-9	887-10	840-1	840-2	840-3	840-4	840-5	840-6	840-7	840-8	840-9	840-10
DKI Sárga	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
DKI Piros	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
DKI Mályva	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
DKI Fehér	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DKI S.rózsá	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
A. biennis	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc apricot	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Carmine-Rose	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Crimson	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Lemon	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Sc. Pink	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Sc. Purpule	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Rose	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Sc. White	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	888-1	888-2	888-3	888-4	888-5	888-6	888-7	888-8	888-9	888-10	888-11	807-1	807-2	807-3	807-4	807-5	807-6	807-7	807-8
DKI Sárga	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
DKI Piros	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
DKI Mályva	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
DKI Fehér	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
DKI S.rózsá	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
A. biennis	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Sc apricot	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Carmine-Rose	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Crimson	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Lemon	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Pink	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Purpule	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Sc. Rose	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Sc. White	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1

9. ábra: Eredmények kiértékelése prezencia-abszencia típusú táblázatban. A színek a két fajtasorozatban megegyező színű fajtaikat jelölik (folytatása következik).

	826-1	826-2	826-3	826-4	826-5	826-6	826-7	817-1	817-2	817-3	817-4	817-5	817-6	817-7	889-1	889-2	889-3	825-1	825-2	825-3
DKI Sárga	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
DKI Piros	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
DKI Mályva	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
DKI Fehér	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
DKI S.rózsza	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
A. biennis	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sc apricot	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Carmine-Rose	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Crimson	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Lemon	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Pink	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Purpure	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sc. Rose	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Sc. White	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

	811-1	811-2	811-3	811-4	811-5	811-6	811-8	811-9	811-10	811-11	812-1	812-2	812-3	812-4	812-5	812-6	812-7	812-8
DKI Sárga	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DKI Piros	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
DKI Mályva	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
DKI Fehér	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
DKI S.rózsza	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A. biennis	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Sc apricot	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Sc. Carmine-Rose	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Sc. Crimson	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Sc. Lemon	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	999	999	999	999	999	999	999	999
Sc. Pink	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Sc. Purpure	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Sc. Rose	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	999	999	999	999	999	999	999	999
Sc. White	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	999	999	999	999	999	999	999	999

9. ábra: Eredmények kiértékelése prezencia-abszencia típusú táblázatban. A színek a két fajtasorozatban megegyező színű fajtákat jelölik (folytatása következik).

	808-1	808-2	808-3	808-4	808-5	808-6	808-7	808-8	808-9	808-10	873-1	873-2	873-3	873-4	873-5	873-6	861-1	861-2	861-3	861-4
DKI Sárga	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DKI Piros	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
DKI Mályva	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
DKI Fehér	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DKI S.rózsza	999	999	999	999	999	999	999	999	999	999	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
A. biennis	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sc apricot	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Sc. Carmine-Rose	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Sc. Crimson	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
Sc. Lemon	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
Sc. Pink	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
Sc. Purpure	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Sc. Rose	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
Sc. White	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0

	816-1	816-2	816-3	816-4	816-5	816-6	816-7	816-8	816-9	816-10	842-1	842-2	842-3	842-4	842-5	842-6	842-7	842-8
DKI Sárga	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DKI Piros	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DKI Mályva	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
DKI Fehér	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
DKI S.rózsza	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
A. biennis	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
Sc apricot	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. Carmine-Rose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. Crimson	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. Lemon	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. Pink	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. Purpure	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. Rose	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Sc. White	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1

9. ábra: Eredmények kiértékelése prezencia-abszencia típusú táblázatban. A színek a két fajtasorozatban megegyező színű fajtákat jelölik.

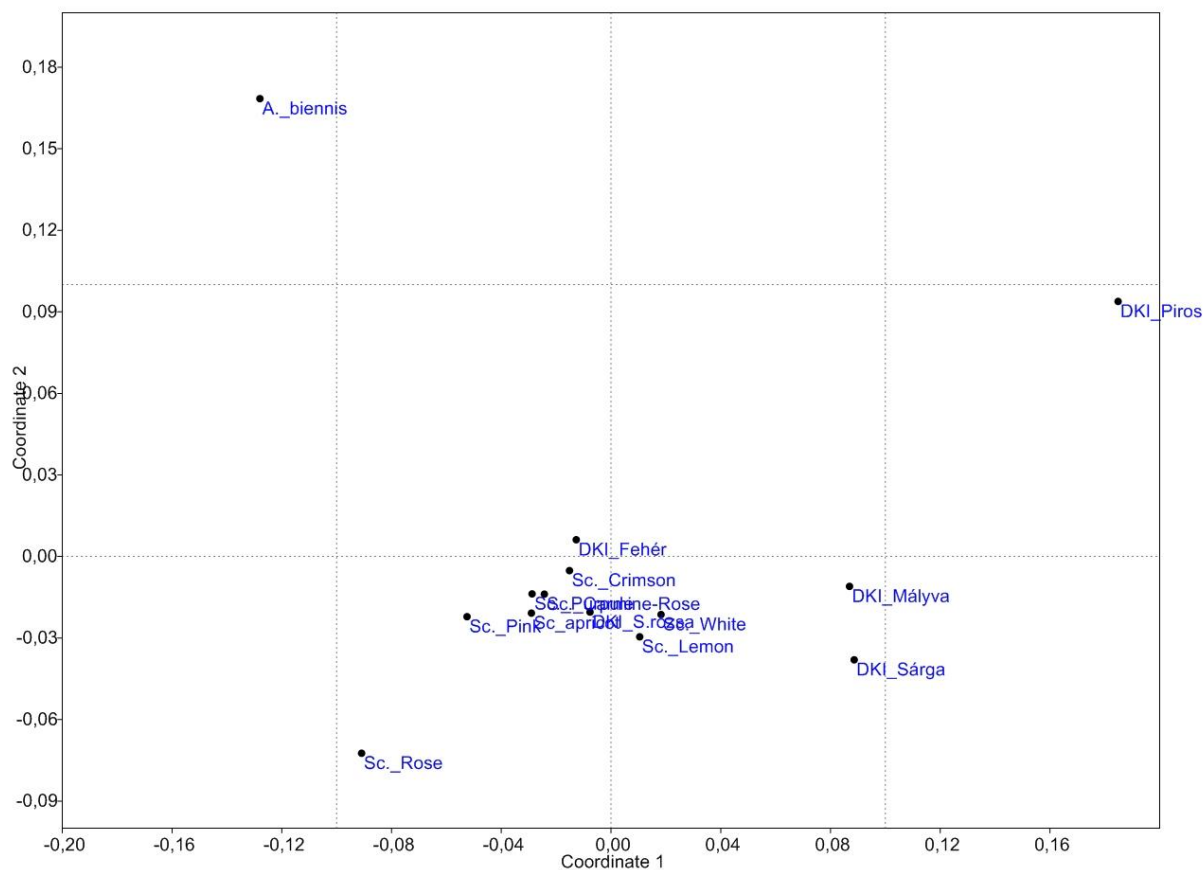
A táblázat elkészítése után elemeztük a primerek polimorfizmusát. Három esetben nem volt polimorf a primer, azonban a másik tizenkét esetben szemmel látható volt a különbség a fajták között.

6. táblázat: A primerek az általuk amplifikált fragmentek számával, a polimorf fragmentek számával és ezek százalékos arányával. A legnagyobb polimorfizmust a 887 (100%) 817 (86%) és a 873 (83%) számú primerek adták.

Alkalmazott primer	Összes amplifikálódott fragment száma	Polimorf fragmentek száma	Polimorf lókuszok %-a
807	8	6	75%
808	10	5	50%
811	11	3	27%
812	8	2	25%
817	7	6	86%
825	3	0	0%
826	7	4	57%
840	9	3	33%
841	1	0	0%
842	8	5	62,5%
861	4	1	25%
873	6	5	83%
887	10	10	100%
888	11	7	64%
889	3	0	0%

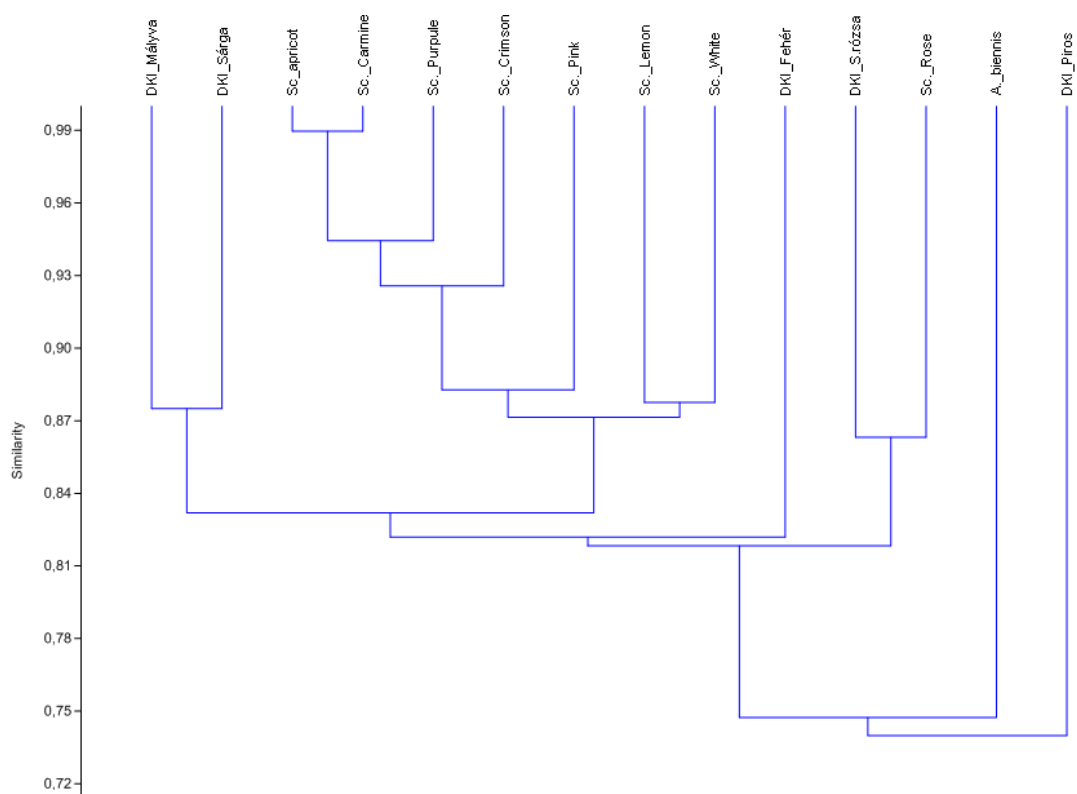
Miután a táblázatban értékeltük az eredményeket és levontuk a következtetéseket a PAST program segítségével főkoordináta elemzést végeztünk, melynek eredménye a 10. ábrán látható. Az ábra jól mutatja, hogy az egyes *Alcea* fajták nagyon közeli kapcsolatban állnak egymással. Tisztán látszik, hogy az *Alcea biennis*, amit kontroll növényként használtunk mindkét fajtacsoporttól távol helyezkedik el. Érdekes, hogy a kutató intézettől kapott 'Balaton' fajta sorozat 'Piros' tagja is távol esik a többi fajtától. Azonban a többi fajta egy csoportban, közel helyezkedik el egymáshoz a koordináta-rendszerben, amely arra enged következtetni, hogy a genetikai anyaguk ha nem is egyezik meg, de szoros kapcsolatban áll

egymással. Elképzelhető, hogy vagy ugyanazt a kiindulási anyagot használták a keresztezések során, vagy a későbbi ‘Spring Celebrities’ sorozatnak a ‘Balaton’ sorozat kiindulási alapanyaga lehetett.



10 .ábra. Az ISSR adatok alapján végzett főkoordináta elemzés eredménye. A DKI jelölésű fajták a ‘Balaton’ sorozat tagjai, míg az Sc jelölésűek a ‘Spring celebrities’ sorozat tagjai.

Szintén a PAST program segítségével egy dendrogramot rajzoltunk (11. ábra), melyen látható a különböző fajták hasonlóságának mértéke, illetve egymáshoz való viszonya. Jól látszik, hogy a ‘Spring celebrities’ sorozat tagjai közeli viszonyban állnak egymással, és a két fajtasorozat azonos színű növényei nem mutatnak közvetlen rokoni kapcsolatot.



11. ábra. Az általunk vizsgált fajták ISSR vizsgálata alapján készített dendrogram. A DK1 jelölésű fajták a ‘Balaton’ sorozat tagjai, míg az Sc jelölésűek a ‘Spring celebrities’ sorozat tagjai.

6. Következtetések

A *Malvaceae* családdal és az *Alcea rosea*-val végzett kutatások leírásában nem jeleztek, hogy a DNS kivonás során felmerültek problémák, illetve, hogy módosított protokollt használtak volna. A RAPD markerekkel végzett vizsgálat (Kazemi, 2011.) esetében frissen csírázott fiatal növények leveleiből, a *Malvaceae* családon végzett kísérlet (García *et al.*, 2009) esetében pedig szabadföldről illetve botanikus kertből, kifejlett növényekről állt növényanyag rendelkezésre. Az ISSR módszerrel végzett kutatások (Santos, 2011.) (Wang *et al.*, 2007.) (Escandón *et al.*, 2007.), (Fu *et al.*, 2008.) esetében a primerek 80-100%-os arányban mutattak polimorfizmust, míg a mi esetünkben ez az arány átlagosan 79% volt. Az eredményünk megbízhatóságát és a választott módszer alkalmasságát mutatja, hogy más esetekben (Ye *et al.*, 2008.), (Szczecinska *et al.*, 2009.), (Fu, 2008.) (Joshi, *et al.*, 2000.) akár kevesebb alkalmazott primerrel is sikerült a faj vagy fajta elkülönítés illetve a genetikai változatosság kimutatása.

A Dísnövénykutató Intézetben végzett összehasonlító kísérlet során a csíranövényeken, palántákon illetve a kifejlett növényeken morfológiai különbséget nem lehetett észlelni a két fajtakör tagjai között. A molekuláris markerekkel végzett összevetés során azonban egyértelművé vált, hogy a két fajtasorozat genetikai állománya eltérő, genetikai ujjlenyomatuk különbözik. A fenotípus azonosságának oka lehet az, hogy a ‘Spring Celebrities’ fajtasorozat nemesítése során ugyanabból az alapanyagból dolgoztak, mint a ‘Balaton’ fajtasorozat létrehozásakor, vagy esetleg maga a fajtasorozat volt a keresztezések kiinduló anyaga.

7. Összefoglaló

A kerti mályvarózsa Magyarországon nagy hagyományokkal rendelkező, népszerű dísznövény. Az alap faj 150-200 cm magas halvány lila színű virágokat hozó növény. Nemesítésével Európában először dr. Kováts Zoltán foglalkozott, akinek célja a díszkertekben és közterületeken való alkalmazhatóság, tehát a növény méretének törpe alkatúvá alakítása, illetve a virágzatok tömöttebbé formálása volt. 1957 és 1975 között nemesítette a 'Balaton' fajtasorozatot, melynek megjelenése megfelel a támasztott követelményeknek. Az akkori politikai helyzet miatt a sorozat szaporítóanyagának Európa-szerte való forgalmazását csak külföldről lehetett megoldani, így került idegen kézbe a magok terjesztése. 2012-ben került a piacra a japán Takii cég által forgalmazott 'Spring Celebrities' nevű *Alcea rosea* fajtasorozat. Érdekesség, hogy a japán cég terjeszkedés céljából egyesült azzal a társasággal, amelyik Kováts Zoltán fajtáinak a forgalmazását intézte, valamint az is, hogy az általuk új fajtasorozatként megjelenített fajták morfológiai jegyei, fenotípusos megjelenésük mind palánta, mind kifejlett növény formájában megegyeznek a 'Balaton' fajtasorozat tagjainak a tulajdonságaival.

Munkánk során az *Alcea rosea* 'Balaton' és 'Spring Celebrities' nevű két fajtacsoportjának kapcsolatára szerettünk volna választ kapni. Az előzetes összehasonlító kísérlet során a morfológiai bélyegeket, életformát, fenotípust tanulmányozva, a szaporító anyag megjelenésén kívül, nem volt észlelhető olyan differencia, mely alapján meg lehetett volna különböztetni a két fajtacsoport azonos színű egyedeit. A molekuláris markerekkel végzett vizsgálat során ISSR technikát alkalmaztunk. Az alkalmazott módszerrel olyan fajtákra jellemző fragmentumok megjelenését tapasztaltuk melyek lehetővé tették a két fajtasorozat azonosságának kizárását. A géleképeken látott eredmények táblázatban való összefoglalása után lehetővé vált a fajtaösszehasonlítás páronként. Eredményeinket a Past program segítségével elvégzett főkoordináta elemzéssel és dendrogram készítésével is szemléltettjük. Mindkettőn jól látható, hogy szoros kapcsolat van (80 % feletti hasonlóság) a két csoport tagjai között. Végeredményben arra a megállapításra jutottunk, hogy a két sorozat nem egyezik egymással DNS szinten. A fenotípusos egyezés és a polimorf lókuszok alacsony száma arra enged következtetni, hogy szoros rokoni kapcsolatban állnak. Elképzelhető, hogy azonos alapanyagból indultak ki a nemesítők, vagy a korábbi, 'Balaton' nevű fajtasorozat alapanyagként szolgált a későbbi 'Spring celebrities' sorozat nemesítési munkái során.

8. Summary

Alcea rosea is a traditional ornamental plant of the Hungarian gardens. The species is also popular in Germany and in the Far-East. During our research we studied two series of cultivars of *Alcea rosea*, the ‘Balaton’ and the ‘Spring Celebrities’ with molecular markers. The members of the series ‘Balaton’ were bred by Dr. Zoltán Kovács in the middle of the 20th century, while the series ‘Spring Celebrities’ was released in 2012 by TAKII Seed.

In a preliminary comparison the growth form, the phenotype and the morphological characteristics were examined of the two cultivar series. No difference was found that would have allowed the differentiation between the cultivars of the same colour, except the appearance of the seeds. For the DNA fingerprinting of the studied cultivars the ISSR method was chosen. With 12 ISSR markers we were able to preclude the identity of the two series of *Alcea rosea* cultivars. The ISSR fragments were separated on 1% agarose gel. The results were summarized in a binary MS Excel table. The cultivars of the same colour were compared in pairs. The PAST program was used to illustrate the results in a dendrogram and also for principal coordinate analysis. The dendrogram revealed high similarity (more than 80%) among the studied cultivars. Also in the PCO figure the cultivars grouped tightly together.

As a result we can conclude that the two *Alcea rosea* cultivar series are not the same at the level of DNA. The identity of the phenotype and the low number of the polymorphic loci let us deduce that the studied cultivars are closely related. These results raise the possibility that the ‘Balaton’ series was used as breeding material during the breeding of the series ‘Spring Celebrities’ or the breeding of the two cultivar series begun from the same germplasm.

9. Irodalomjegyzék

1. 2003. évi LII. törvény a növényfajták állami elismeréséről, valamint a szaporítóanyagok előállításáról és forgalomba hozataláról.
2. Ahmadi, M., Khajavi Rad, A., Rajaei, Z., Hadjzadeh, A.R.M., Mohammadian, N., Tabasi, N.S. 2012. *Alcea rosea* root extract as a preventive and curative agent in ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 44(3): 304-307.
3. Al-Snafi, A.E. 2013. The pharmaceutical importance of *Alcea rosea*. *International journal of pharmtech research* 5(3): 1378-1385.
4. Anonymus, 2014a. <http://www.matsuritimes.com/kyoto-aoi-matsuri/>, 2014.10.17.
5. Anonymus, 2014b. <http://kertlap.hu/malyvarozsa/>, 2014.10.02
6. Anonymus, 2014c. <http://www.kert.co/cserjek/rozella>, 2014/10/07
7. Anonymus, 2014d. <http://www.fleuroselect.com>, 2014.10.24
8. Celka, Z., Szczeinska, M., Sawcki. J. 2010. Genetic relationships between some of *Malva* species as determined with ISSR and ISJ markers. *Biodiversity: Research and Conservation* 19: 23-32.
9. Ellergen, H. 2004. Microsatellites: Simple Sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
10. Escandón, A.S., Zelener, N., Pérez de la Torre, M., Soto, S. 2007. Molecular identification of new varieties of *nierembergia linariaefolia* (Graham), a native Argentinean ornamental plant. *Journal of Applied Genetics* 48(2): 115-123.
11. Escobar García, P., Schönswetter, P., Fuertes Aguilar, J., Nieto Feliner, G., Schneeweiss, G.M. 2009. Five molecular markers reveal extensive morphological homoplasy and reticulate evolution in the *Malva* alliance (Malvaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 226-239.
12. Fu, X., Ning, G.G.L., Bao, M. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 117: 263-270.
13. Gunnarson, U., Hassel, K., Södersröm, L. 2005. Genetic structure of the endangered peat moss *Sphangum angermanicum* in Sweden: A result of historic or contemporary processes? *The Bryologist* 108(2): 194-203.

14. György, Z. 2011. DNS-alapú vizsgálatok, molekuláris markerezés. In: Pedryc, A. (szerk.) A genetika és növénynemesítés alapjai egyetemi jegyzet. Budapest, Inkart Kft. pp. 94-105.
15. György, Z. 2013. DNS-alapú vizsgálatok, Molekuláris markerezés. In: Lukács, N. (szerk.) Növényi biotechnológia egyetemi jegyzet. Budapest, Inkart Kft. pp. 50-61.
16. Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1.(1): 55-63.
17. Hajósné Novák, M. 1999. Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Budapest. Mezőgazda Kiadó Kft. pp. 26-40.
18. Hammaer O., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. 2001. PAST Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4. (1): pp.9.
19. Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K., Brar, D.S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.
20. Kazemi, M., Aran, M., Zamani, S. 2011. Evaluation of genetic diversity of Iranian wild *Alcea rosea* population using RAPD. *World Applied Sciences Journal* 13: 1234-1239.
21. Keller- Przybylkowicz, S., Korbin, M., Gwozdecki, J. 2006. RAPD and ISSR markers of black and green colour of blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14: 45-52.
22. Maróy, P., Török, T. 2009. Genetika BS. JATE Press Szegedi Egyetemi Kiadó, Szeged. pp.247.
23. Németh É. 1993. *Althea rosea* var. *nigra* – Fekete mályvarózsa. In: Bernáth J. (szerk.) Vadontermő és termesztett gyógynövények. Budapest. Mezőgazda Kiadó Kft. pp. 134-136.
24. Palai, S.K., Rout, G.R. 2011. Characterization of new variety of *Chrysanthemum* by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira* 29: 613-617.
25. Pradeep Reddy, M., Sarla, N., Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
26. Rácz, G., Rácz- Kotilla, E., Laza, A. 1984. Gyógynövényismeret. Ceres Könyvkiadó, Bukarest pp.99-100.

27. Santos, L.F., Oliviera, E.J., Santos Silva, A., Carvalho, F.M., Leles Costa, J., Gomes Pádua, J. 2011. ISSR Marker sas a Tool for the Assesment of Gentic Diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetetics* 49(7-8): 40-54.
28. Schmidt, G. 2002. Növényházi dísznövények termesztése. Budapest. Mezőgazda Kiadó Kft. pp. 575-576.
29. Simon, T. 2000. A Magyarországi Edényes Flóra Határozója, Harasztok-virágos növények. Budapest, Nemzeti Tankönyvkiadó p. 313.
30. Szczecinska, M., Sawiciki, J., Wasowicz, K., Holdynsky, C. 2009. Genetik variation of the relict and endangered population of *Chamaedaphne calyculata* (Ericaceae). *Poland-Dendrobiology* 62: 23-33.
31. Tang, Y, Gilbert, M.G., Dorr, L.J. 2007. Malvaceae. *Flora of China* 12: 264-298.
32. Tanksley, S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1(1): 3-8.
33. Udvardy, L. 2008. A kertészeti növénytan növényismereti kompendiuma. Budapest. Mezőgazda kiadó Kft. p. 82.
34. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Science & Mathematics* 23(21): 4407-4414.
35. Wang, L.L. Li-Ping, Z., Yi-Qin, G., Ming-Xia, W., Li-Ming, C., Jin-Lan, Y., Yan, W., Fan-Min, Y., Long-Zhi, W. 2007. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late- bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae* 116: 240-247.
36. Ye, Y.M., Zhang, J.W., Ning, G.G., Bao, M.Z. 2008. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinina elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 118: 1-7.
37. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction. *Genomics* 20: 176-183.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. György Zsuzsanna tanárnőnek, amiért magas szintű szakmai tudásával vezette és irányította munkámat, és hasznos jótanácsaival ellátott a dolgozat témájának kidolgozása és elkészítése során.

Továbbá Szabó Máriának (NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet - Érdi Kutató Állomás) a növényanyag biztosításáért, a nemesítő jegyzeteinek rendelkezésünkre bocsátásáért, és a háttérinformációk megosztásáért.

A feltételek biztosításáért köszönettel tartozom Pedryc Andrzej Tanszékvezető úrnak.

Chikhi Melisának, aki labormunkálataim során sok segítséget nyújtott, Hermán Ritának az adminisztrációs munkák elvégzésében nyújtott segítségéért.

Az egész Genetika és Növénynemesítés Tanszéknek a jó hangulat megteremtéséért, mely elengedhetetlen az eredményes munkavégzéshez.