

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

AZ ÚJPESTEN ŐSHONOS HOMOKTÖVIS-ÁLLOMÁNY MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

Szelényi Magdolna

kertészmérnök BSc III. évfolyam

Konzulens: Dr. Halász Júlia, PhD, egyetemi docens

2014

Tartalom

1.	BEVEZETÉS.....	3
2.	CÉLKITŰZÉS.....	4
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
3.1.	A homoktövis botanikai jellemzése.....	5
3.2.	A homoktövis jelentősége és felhasználása.....	7
3.3.	A homoktövis termesztése.....	10
3.4.	A homoktövis nemesítése és fajtái	10
3.5.	Az újpesti homoktövis-állomány bemutatása.....	11
3.6.	A homoktövis jellemzése molekuláris markerekkel.....	13
3.6.1.	A RAPD-markerek használata.....	13
3.6.2.	Az SSR-markerek használata	14
3.6.3.	Az ivarspecifikus markerek jelentősége.....	17
3.6.4.	A kalkon-szintáz gén intronhossz-polimorfizmusa (ILP)	18
4.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	20
4.1.	Növényanyag.....	20
4.2.	DNS-kivonás	21
4.3.	PCR-analízis.....	22
4.4.	Fragmentumhossz-analízis	22
4.5.	Klónozás, szekvenálás.....	23
5.	EREDMÉNYEK	24
5.1.	Homoktövis fajták DNS-ujjlenyomata	24
5.2.	Az újpesti homoktövis-állomány vizsgálata SSR-markerekkel	25
5.3.	Ivarspecifikus markerek használata.....	0
5.4.	A kalkon-szintáz gén intronhossz-variabilitásának vizsgálata.....	0
6.	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	31
6.1.	Homoktövisfajták azonosítása SSR-markerekkel	31
6.2.	Az őshonos homoktövis-állomány jellemzése SSR-markerek alapján	32
6.3.	Az ivarspecifikus markerek alkalmazhatósága.....	33
6.4.	A kalkon-szintáz gén filogenetikai jellemzése	35
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	37
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	38
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	39
10.	MELLÉKLET	40
11.	IRODALOMJEGYZÉK.....	42

1. BEVEZETÉS

Az ókori Görögországban a homoktövis levelét jól ismerték a lovak takarmányozásában súlynövelő és szőrfényesítő hatásáról. Innen jön a növény latin neve: a *Hippophaë* ragyogó lovat jelent. Szintén Görögországból származó legenda szerint Pegazus a homoktövis révén tett szert a repülés képességére. Ugyanakkor más források szerint semmi köze a görög *hipposz*, azaz ló szóhoz. A *rhamnoides* bengeszerűt jelent, amit 1703-ban Joseph Pitton de Tournefort, egy francia botanikus használt először. Hazánkban a legismertebb neve a homoktövis, ami a német Sanddorn tükörfordítása (Gadó és Kerényi-Nagy, 2012). A faj ismert népi nevei még: az ezüstitövis, homokfa, hipófa, lóvakaró és fűzötövis (Földesi, 2000). Legutóbb a pekingi olimpiai játékok itala volt, az orosz űrhajósok pedig a megfelelő táplálékbevitel és a sugárvédelem biztosítása érdekében homoktövist fogyasztottak az űrben.

A homoktövis kertészeti felhasználhatósága rendkívül sokrétű, hiszen gyümölcstermőnövényként, gyógynövényként, dísnövényként és talajjavító növényként egyaránt ismert. A megnövekedett igényeknek megfelelően nemesített fajtáit egyre nagyobb területen termesztik Európában és már Magyarországon is.

Hazai természetes előfordulása rendkívüli botanikai értéket képvisel, melynek megóvása kiemelt célt jelent. Az őshonos újpesti homoktövis-állományt a 32/1999. sz. rendeletben a Fővárosi Önkormányzat védelem alá helyezte, az alábbi indokkal: „*A főváros és környékének egyedülálló botanikai ritkasága, a homokpusztagyep társulások és a belső-ázsiai eredetű, félsivatagi homoktövis egyetlen hazai, bizonyítottan természetes élőhelye rendkívüli jelentőséggel bír. A védetté nyilvánítás célja a természeti terület növénytársulásainak védelme, tudományos és oktatási célból történő tanulmányozhatóságának biztosítása.*”.

2. CÉLKITŰZÉS

A homoktövis széleskörű felhasználhatósága miatt az elmúlt években egyre nagyobb népszerűsége tett szert, így a növény genomjáról is egyre több ismeret vált elérhetővé. Számos közlemény foglalkozik a homoktövis növények genetikai diverzitásával, elsősorban a természetes populációk genetikai állományának jellemzésével. A homoktövis nemesítésével Európában és Ázsiában is intenzíven foglalkoznak, de az elismert fajták molekuláris markerezéséről és DNS-alapú megkülönböztethetőségéről kevés adat érhető el.

Ezek tükrében munkánk az alábbi vizsgálatokra irányult:

- ✓ néhány ismert fajta és a Magyarországon sikerrel termesztett, ismeretlen eredetű genotípus mikroszatellit markerekkel történő azonosítása.

Magyarországon, Budapest egyik legjelentősebb természeti értékeként, Újpesten található az egyedüli őshonos homoktövis-állomány. Az élőhelyét 1974-ben nyilvánították védetté 5,7 hektáron. Igor V. Bartish 1999-ben a homoktövis európai elterjedésének vizsgálata nyomán azt feltételezte, hogy a honos állományba a közelben telepített orosz fajták is bekerülhettek. Mivel az élőhely a pesti puszták utolsó természetes maradványaként kiemelt jelentőségű, munkánk további célja volt e hipotézis átfogó vizsgálata, tehát:

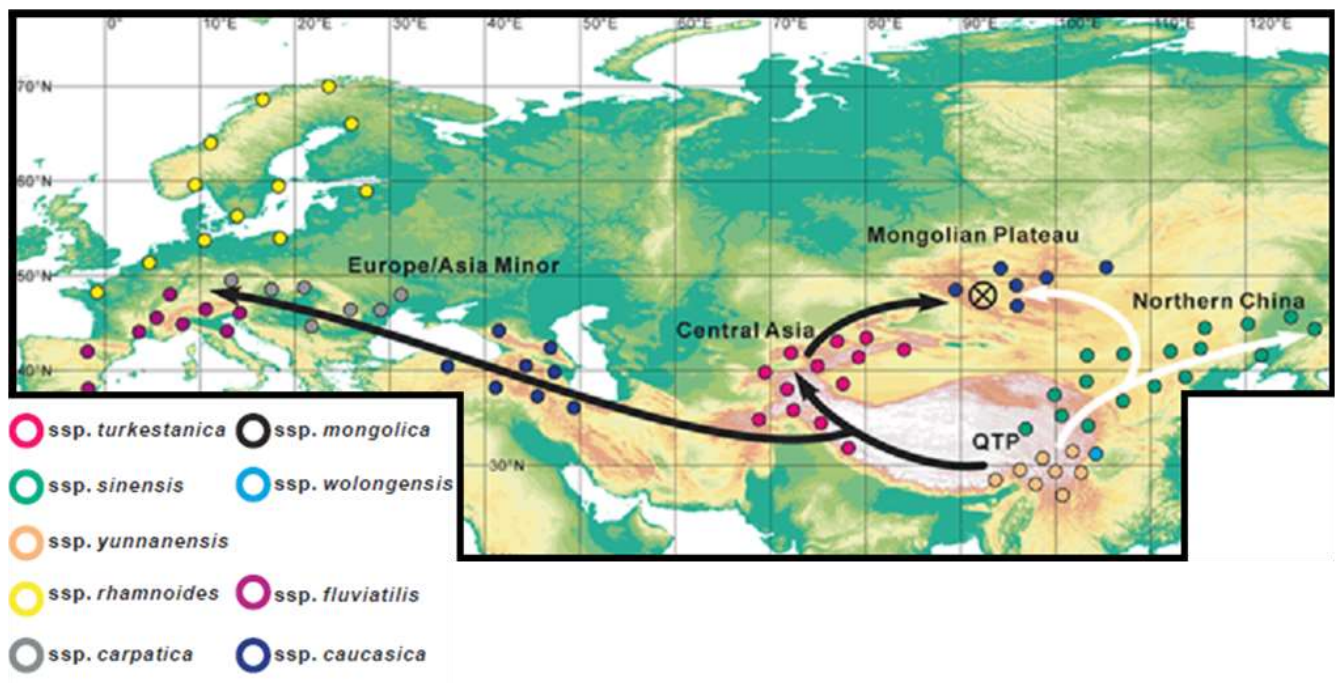
- ✓ a homoktövis-populáció genetikai jellemzése a tesztelt és jól működő SSR-markerek, valamint a kalkon-szintáz enzimet kódoló gén variabilitása alapján,
- ✓ a populáció egyedeinek ivararány-meghatározása specifikus markerek segítségével.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A homoktövis botanikai jellemzése

A *Hippophaë* nemzetség az *Eleagnaceae* családba tartozik. Az összes ide tartozó faj diploid, $2n=24$ (Rousi, 1965). A legutóbbi molekuláris taxonómiai adatok szerint 7 fajból áll a nemzetség: *H. rhamnoides*, *H. goniocarpa*, *H. neurocarpa*, *H. litangensis*, *H. gyantsensis*, *H. salicifolia* és *H. tibetana* (Sun és mts., 2002).

A fajok elterjedési területe főként a Qinghai-Tibet fennsíkra korlátozódik, kivéve *H. rhamnoides* L., ami vadon megtalálható egész Ázsiában és Európában (Bartish és mts., 2000, 2002). Az elterjedés hipotézisét Jia és munkatársai (2012) ITS és cpDNS szekvenciavizsgálatok alapján bizonyították (1. ábra).



1. ábra A *Hippophaë rhamnoides* elterjedési útvonala cpDNS-analízis alapján. Az egyes alfajokat különböző színek jelölik (Jia és mts., 2012)

A *H. rhamnoides* faj további 9 alfajra osztható (Swenson és Bartish, 2003). Kelet-Ázsiában található a *yunnanensis*, *wolongensis*, *sinensis* és a *mongolica*, Közép-Ázsiában a *turkestanica*, Kis-Ázsiában a *caucasica* és Európában a *carpatica*, *fluvialis* és *rhamnoides* (Jia és mts., 2012). Az Európában élő alfajok közül az inkább Északnyugat-Európában és Skandináviában elterjedt

subsp. *ramnoides* és a Közép-, és Délkelet-Európában elterjedt subsp. *carpatica* mutattak szoros kapcsolatot (Batrish és mts., 2000, 2002). Rousi (1965) munkássága alapján a romániai és a magyarországi homoktövis is a *H. ramnoides* subsp. *carpatica* alfajhoz tartozik. Ezt követi a Király G. szerkesztésében, 2009-ben megjelent magyarországi flóráról szóló határozókönyv is. Ugyanakkor Soó (1966) a magyarországi állományt a subsp. *fluviatilis* alfajba sorolja, a subsp. *carpatica*-t pedig körbezárják az erdélyi Alpok és a Kárpátok (Swenson és Bartish, 2003). A hazai példányok 1982 óta oltalom alatt állnak, természetvédelmi értékük 10 000 Ft (<http://www.termeszetvedelem.hu>).

A homoktövis lombhullató, váltivarú cserje vagy kis fa. Míg főgyökere mélyre hatol a talajban, oldalgyökerei a felszín alatt hosszan, vízszintesen nyúlnak el. Jó hidegtűrése miatt még a -43°C-t is kibírja. Gyökérsarjakkal gyorsan birtokba veszi a rendelkezésre álló területet (Li és Schroeder, 1996). A homoktövis a gyökerével szimbiózisban élő baktériumok (*Frankia elaeagni*) segítségével képes megkötni a levegő nitrogéntartalmát.

Barna vagy fekete, kemény kérge pikkelyszőrökkel fedett, ágai tövisben végződnek. A hajtások oldalán rövidhajtásokat fejleszt. Sűrű, szürkészöld, gömbölyded koronája van. Egyszerű, zöld, lándzsás levelei szórta állnak, ép szélük rövid nyéllel. Ezüstös színezetét a fonáki oldalon található csillagszőrök adják, amelyek kezdetben a színi oldalon is megtalálhatók, de a fejlődés során lekopnak (Li és Shroeder, 1996; Vétek, 2005).

A növény nemét a termőkorba lépéskor lehet megállapítani – körülbelül 3. év, mivel morfológiailag a fiataikorú, eltérő ivarú példányok nem különböztethetők meg (Li és Schroeder, 1996). Sárgászöld virágai márciusban nyílnak a másodéves vesszőkön. A porzós virágok egész a vesszők végén, 4-20 tagú füzekben csoportosulnak, a termős virágok 5-12 tagú füzerszerű virágzatban a vesszők felső harmadán helyezkednek el (Földesi 2000; Gadó és Kerényi-Nagy, 2012). A virágtakaróból hiányzik a párta, négytagú, csöves összenőtt csésze határolja a porzós virágokban a kétkörű porzótájat, a termős virágokban az egy termőlevélből álló magházat (Porpáczy, 2002). Sem a női-, sem a hímvirágzat nem tartalmaz nektárt, nem vonzzák a rovarokat, anemogám megporzással termékenyülnek meg (Li és Shroeder, 1996). Termései maximum hármas csoportokba rendeződve találhatók, színük a világosnarancssárgától a pirosig terjedő színskálán mozoghat, kerekded vagy hosszúkás alakú, egymagvú álbogyó (Földesi, 2000). A bogyók éretten sem mindig hullanak le, akár egész télen fennmaradnak a bokron, táplálékot szolgáltatva a madaraknak, amik cserébe elterjesztik a magokat. A magról kikelt egyedek között a hímvivarúak

vannak többségben. Egy növény átlagos életkora 30-40 év, 80 évesnél öregebb példányai nem ismertek (Gadó és Kerényi-Nagy, 2012).

A növény ökológiai igényei viszonylag csekélyek. Populációi élnek mészkövön, gipszes talajon, márgán és márgás-agyagos kőmálladékon, legideálisabban azonban tápanyagban gazdagabb, középkötött szelídebb humuszos homokon fejlődik. A magas talajvízszintet nem tolerálja. (Földesi, 2000). Hidegtűrése kiváló, hazánkban szinte soha nem éri fagykár. Fényigényes növény.

3.2. A homoktövis jelentősége és felhasználása

Az ősi indiai gyógyászatban már Kr. e. 5000-ben ismerték a homoktövis egészségvédő hatását. Szerepel a VIII. századi, Tibetben írt orvosi klasszikusban is, a '*rGyud bzhi*'-ban. Ennek ellenére a modern kor csak a XX. században fedezte fel magának ismét ezt a fajt. A 60-as, 70-es évek Szovjetúniójában az asztronauták felkészülését segítette (Kalia és mts., 2011a). Világméretű figyelmet 1986-ban kapott, amikor a csernobili katasztrófa után a gyümölcshúsból kinyert olajjal próbálták megvédeni az embereket a radioaktív szivárgástól (Singh, 2008).

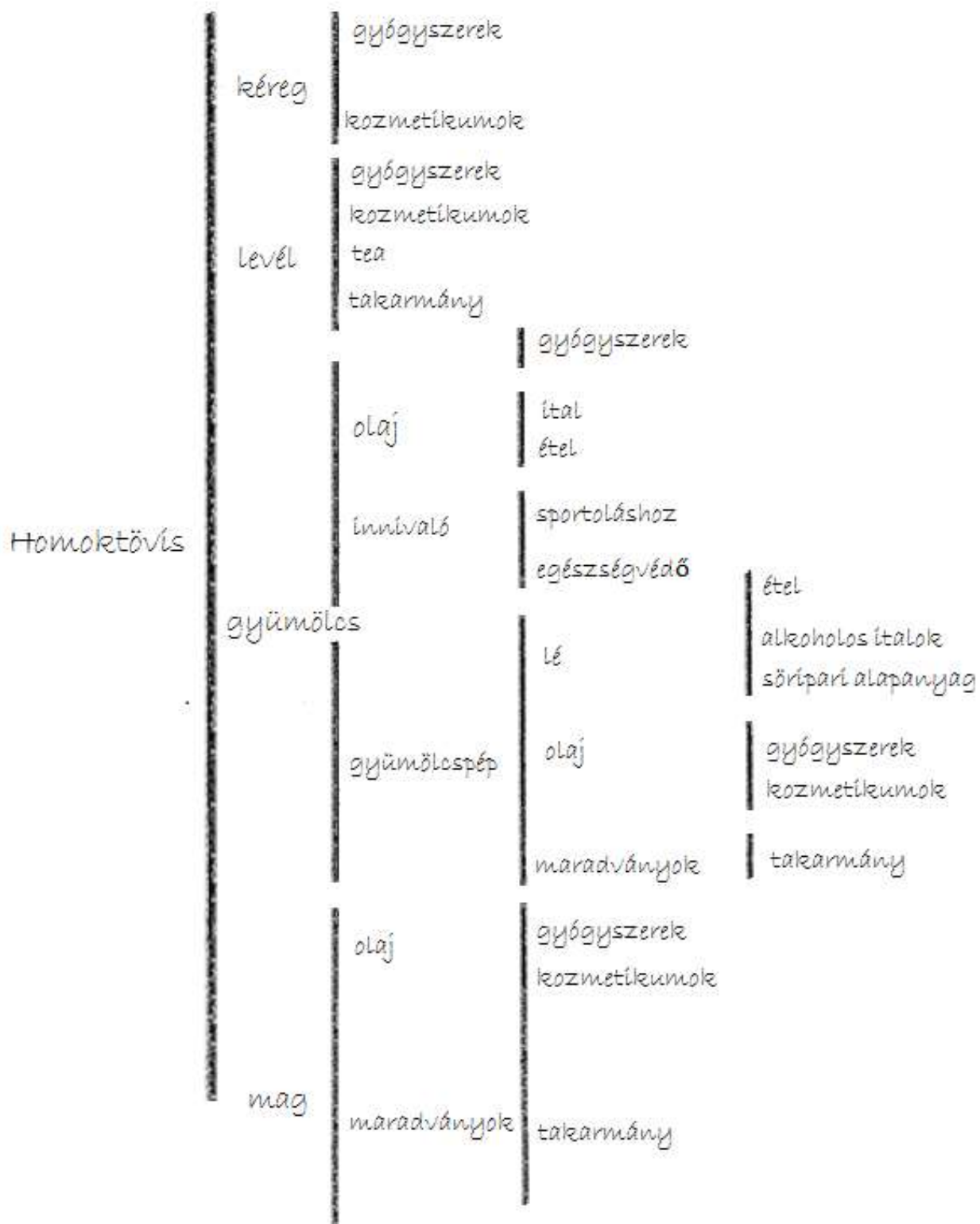
1. táblázat *Hippophaë rhamnoides* gyümölcslé antioxidáns összetevői (Eccleston és mts., 2002 nyomán)

	mg/L
α -tokoferol	10,5
β -tokoferol	0,4
γ -tokorefol	1,5
α -tokotrienol	0,5
β -tokotrienol	0,3
γ -tokotrienol	0,3
C-vitamin	1540
Karotinoidok	7,3
β-karotin	3,3
Flavonoidok	1182
Izorhamnetin-rutinozid	355
Izorhamnetin-glükózid	142
Kvercetin-glükózid	35
Kvercetin-rutinozid	35

A növény szinte minden részéből készítenek termékeket; kérgéből, leveléből, gyümölcshúsából, magjából különböző eljárásokkal vonnak ki olajat, külön hasznosítják a gyümölcs levét és a húsát, de még a maradványokat sem hagyják veszendőbe menni (2. ábra). A reformélelmiszerek és -készítmények egyik legnépszerűbb alapanyaga lett. Kaphatunk homoktövisből készült ivólevet, szörpöt, kompótot, teát, lekvárt, fagyit, alkoholos italokat, cukorkát, étrend-kiegészítőket (kapszulákat), sampont (korpásodás ellenit is), pattanás-elleni és ráncatlanító kozmetikumot, testápolót, fogkrémet és napozáshoz szükséges krémeket (Li és Schroeder, 1996).

A legfontosabb farmakológiai hatásai az olaj – *Oleum hippophaë* – antimikrobiális, gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító, és a szöveti regenerálódást elősegítő képességének tulajdonítható, mivel a magolaj K-vitamin-tartalma szerepet játszik a protrombin kialakulásában, ami továbbalakulva trombinná a fibrin kialakulását katalizálja, így elősegítve a véralvadást. Termése – *Hippophaë fructus* – a gyümölcsök között az egyik legvitamindúsabb forrás (Kalia és mts., 2011a): A-, B-, C-, D-, E-, F-, K- és P-vitaminokban, ásványi anyagokban (nátrium, kálium, kalcium) gazdag. Egyéb biológiailag aktív összetevői (1. táblázat) szerves savak, cukor, pektin- és tanninanyagok, kumarin, triterpenoidok, foszfolipidek, katechin. (Kalia és mts., 2011a). A levelek gazdag forrásai olyan fontos antioxidáns vegyületeknek, mint a béta-karotin, E-vitamin, flavonoidok. A gyümölcsből kinyert olaj átlagosan 35%-ban tartalmazza a ritka és értékes palmitinsavat (Singh és mts., 2008). Ez a ritka zsírsav és a K-vitamin segíti a sejt-, szövet- és sebregerálódást.

Ugyanakkor nem csak egészségvédő szerepéről ismert a homoktövis. Hasznosítják a tájfenntartásban is, mivel agresszíven terjedő gyökérsarjrendszere összetartja a talajt, ezzel megelőzve az eróziót, és előkészítve a talajt a többi növény számára. Gyors növekedésével és az erős nitrogénfixáló képességével talajjavítóként is alkalmazható (Kalia és mts., 2011a). Sótűrő képessége miatt út menti sorfaként is hasznosítható az ugyanebből a családból származó *Eleagnus angustifolia* fajhoz hasonlóan. Mindemellett dísnövényként is egyre népszerűbb dekoratív termése miatt. Jelentőségét mutatja az is, hogy 1995-ben megalakult a növénnel foglalkozó nemzetközi társaság, az „International Seabuckthorn Association”.



2. ábra A homoktövis felhasználása (Li és Schroeder, 1996 nyomán)

3.3. A homoktövis termesztése

A homoktövis termesztésbe vonása 1934-ben Altai-ban – Szibériában – kezdődött a helyi génbankot felhasználva a *H. rhamnoides* subsp. *mongolica*-val (Bartish és mts., 2000). Termeszteni csak 3900 m tengerszint feletti magasságig lehet, mert afelett a bogyók begyűjtése sikertelen. A termesztés elterjedését nagyban elősegítette az Altai-i Gyümölcstermesztési Kutatóintézet 1920-as években nemesített 15 nagy termésbiztonságú, tövis nélküli fajtája. Míg Oroszországban 1987-ben már 5000 hektáron termesztettek homoktövist, az ott nemesített fajták honosítási kísérletei a 70-es évek elején kezdődtek egyetemünkön. Hazánkban az első ültetvények telepítését az 1990-es években kezdték meg az Alföldön (Porpáczy, 1997). Magyarországon 2012-ben összesen 72 ha volt a termesztési terület, Németországban 600 ha, Oroszországban 55 000 ha, míg Kínában 1,5 millió ha. Kínában évente 10 000 hektárnyi területen telepítenek homoktövist, ami naponta 28 hektárt jelent (International Seabuckthorn Association).

Szaporítása történhet magvetéssel, zöld-, és fásdugványozással, bujtással. A magvetés a legnehezebb eljárás, ugyanis a magot különböző kezeléseknek kell alávetni, mire alkalmas lesz az elvetésre. Dugványozáskor a gyökeresedést növekedésszabályozó anyagok használatával valamint tápoldatozással segítik. Váltivarú növény révén az ültetvényekbe mind porzós, mind termős növényeket ültetni kell. Az arány általában 1:9 a termős genotípusok javára, a porzós egyedet sakktáblaszerűen helyezik el az ültetvényben, soronként 3 fával eltolva a hímivarú egyedet (Porpáczy, 1997).

Ápolási munkák közül a tápanyag-utánpótlás, az öntözés és a gyomirtás a legfontosabb, amely sekélyen végzendő, nehogy kárt tegyünk a talaj felszínéhez közel futó oldalgyökerekben. Metszeni nem szabad a gyümölcsök képződési helye miatt. Betakarítása történhet kézzel, de sem a munkaerő, sem a gyümölcs nem szereti a töviset, illetve a kocsány kiszakadásával keletkező jelentős veszteség miatt. A munkaerő védelme érdekében vagy tövismentes fajtákat ültetnek, vagy homoktövis-betakarítógépet használnak (Vétek, 2005).

3.4. A homoktövis nemesítése és fajtái

A morfológiai változékonyság rendkívül nagymértékű az egyes homoktövis fajok és alfajok között, amely kiváló alapanyagot biztosít a fajtanemesítési programok számára. Oroszországban, Ukrajnában, Kínában és Finnországban kezdték meg eleinte a fajták előállítását szelekciós nemesítéssel, melyet még mindig alkalmaznak. Később megkezdődött a keresztezéses nemesítés

is, valamint Oroszországban kolchicin-kezeléssel autotetraploid genotípusokat hoztak létre. Az orosz magoncokat svéd magoncokkal keresztezték az adaptációs képesség javítása érdekében. A kínai fajták gyorsnövekedésűek, tövisesek és kis gyümölcsűek, az orosz és mongol fajták nagyobb gyümölcsűek, gyengén tövisesek, bioaktív komponensben gazdagabbak, de lassú növekedési erélyűek. Jelenleg Kanadában és Németországban is nemesítenek új fajtákat. A főbb célok a gyümölcsméret és beltartalmi paraméterek javítása, tövis nélküli változat, korai érés, hosszú gyümölcskocsány a gépi betakarítás miatt (Li és Schroeder, 1996). A legismertebb altaji fajták: Oranzsevaja, Csuszkaja, Jantarnaja, Obilnaja; német fajták: Hergo, Leikora, Frugana, Pollmix 1; román fajták: Serpeni és delta Dunai (Porpáczy, 2002).

A keresztezendő szülőpartnerek tervszerű kiválasztásához a gazdaságilag jelentős gyümölcstermő- és zöldségnövényeknél egyre elterjedtebb a molekuláris markerek használata, de homoktövis esetében egyelőre kapcsolt markerek csak az ivarmeghatározáshoz érhetőek el. Még nem hoztak létre térképezési populációt, amely nagyban megkönnyítené a további markerfejlesztést. Mikroszaporításával viszont már számos kutatócsoport foglalkozik (Kalia és mts., 2011a).

3.5. Az újpesti homoktövis-állomány bemutatása

A Káposztásmegyer mellett található terület a „Rákosok” homokpuszták utolsó maradványa. A XIX. század elején a környezet még sokkal változatosabb flóra és fauna képét mutatta, mint ma. A 70-es évek tereprendezései, és a modern kor nem tett jót a terület természetes képének. A Váci úttól nyugatra található *Salix* és *Populus* állományok mára szinte teljesen kipusztultak. Jelenleg az élőhely értékét a természetközeli gyepek adják, amelyeknek a szegélyénél maguk a *Hippophaë* populációk élnek (Vétek, 2005).

Magyarországon az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területen (3. ábra) található az egyetlen természetesnek elfogadott állomány. Az országban máshol előforduló populációk őshonosságát vitatják (Gadó és Kerényi-Nagy, 2012), bár az örkenyi lőtérén található élőhelyet is korábbi irodalmak őshonosként tüntették fe. Az állományról az Újpesti Városvédő Egyesület nevében Vétek Gábor (2005) széleskörű, átfogó tanulmányt készített „Újpest különleges természeti értéke a homoktövis és élőhelye” címmel. Az újpesti területen található *Hippophaë rhamnoides* subsp. *fluviatilis*-ről (Soó, 1966) már 1879-ben is hírt adott Borbás Vince, azonban ő behurcolt fajnak tekintette a növényt. A termőhely védettségének indítványozását 1961-ben kezdeményezte

Zólyomi Bálint. Végül az állomány védelmére létrehozták 1994-ben az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területet 5,7 hektáron, amelyet 1999-ben kibővítettek 23966 m²-re. Ez a közel 24 ha három részből áll, összesen 22 védett növényfajjal. A legnagyobb alapterületű, északi terület a legértékesebb homoki gyep, a lakótelepről délre található kisebbik részen dominál a homoktövis, azonban ez az élőhely eléggé leromlott. A Megyeri úttól délre eső harmadik területen már nincs homoktövis. Sajnos az élőhely továbbra is romlik több okból: az illegális szemétkerakás kedvelt színtere, építési hulladékok és betondarabok találhatóak, az utépítések miatt a Duna ártere hátrébb szorult, a területen található magasfeszültségű vezetékek karbantartásakor a homoktöviseket sokszor megtapossák. A területet az odaköltözött hajláktalanok kutyái is védik, így a látogatása veszélyes is lehet (Gadó és Kerényi-Nagy, 2012).



3. ábra Az újpesti állomány elhelyezkedése légi felvételen (www.mme.hu nyomán)

Az 1990-ig itt végzett katonai tevékenységek miatt rendkívül nagymértékű volt a terület zavartsága, ugyanakkor az ebből adódó zártság egyben lehetővé is tette az élőhely hosszútávú fennmaradását. A terület rehabilitására 2006-ban a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Budapesti Helyi Csoportja elindított egy hosszútávú élőhelyvédelmi projektet, amelynek keretében már több, mint 11 alkalommal tartottak önkéntesekkel élőhelykezelési napot.

Ugyanennek a projektnek a keretében 2011-ben átadtak egy tanösvényt, amely öt információs tábla mentén mutatja be a terület növény- és állatvilágát (www.mme.hu). A hely védelmét állami szervek is támogatják; 2011 decemberében kiadott Újpest Környezetvédelmi Programja keretében „kiemelt figyelmet kell fordítani a homoktövis által borított területek védelmére”. A program 2016-ig tart. A Homoktövis Környezetvédelmi Oktatóközpont azzal a céllal alakult, hogy a korszerű környezetvédelmi és természetvédelmi ismereteket népszerűsítse a társadalomban.

3.6. A homoktövis jellemzése molekuláris markerekkel

3.6.1. A RAPD-markerek használata

Az egyik legnevesebb *Hippophaë* kutató, Igor V. Bartish és munkatársai már 1999-ben elkezdték különböző populációk RAPD-markerral történő variabilitását vizsgálni. A 10 populációból álló *H. rhamnoides* és egy subsp. *mongolica* esetében - összesen 124 növényen – végzett kísérlet eredménye 156 polimorf RAPD-markeren alapult. A populáción belüli variabilitás idegenporzós fajhoz képest a *rhamnoides* alfajon belül igen alacsony volt. Az eredmények további elemzése arra mutatott rá, hogy a populációk közötti diverzitás szintén alacsony, de szél-porozta idegentermékenyülő növényeknél inkább a populáción belüli kombinálódás várható. A genetikai és földrajzi távolság a *rhamnoides* populációk között nem volt összekapcsolható, jelezve, hogy a nagy földrajzi és ökotípusbeli különbségeket az egyedek RAPD-profilja nem tükrözte (Bartish és mts., 1999). Egy évvel később újabb 9 primerrel vizsgálták 6 faj 11 alfajának 223 növényét. A primerek 219 polimorf fragmentumot mutattak. Ezek közül néhány taxon-specifikus markernek bizonyult. A genetikai variabilitás eloszlása és mértéke meglehetősen változatos volt a fajok között. A kapott eredmények alátámasztották a korábbiakat, miszerint a legnagyobb mértékű variabilitás az alfajok között található meg (Bartish és mts., 2000).

Később, 2006-ban ismét inter-, és intraspecifikus kapcsolatokat vizsgáltak RAPD-markerek segítségével a *Hippophaë* nemzetségen belül. A 6 fajt és 5 alfajt magába foglaló vizsgálatban 12 primer 141 lókuszt szaporított fel, amiből 108 bizonyult polimorfnak. A fragmentumok hossza 200 és 2000 bázispár közé esett (Sheng és mts., 2006).

Biokémiai és genetikai vizsgálatokat végeztek török kutatók 10 Kelet-Anatóliából kiválasztott *H. rhamnoides* egyeden. A bogyók savtartalmának mennyisége és jelenléte alapján három csoportot tudtak elkülöníteni, amelyeknek egyáltalán nem volt közös metszete. Ezeket a

csoportokat a növények RAPD-profilja is megerősítette, amit 10 primer használatával állítottak össze. A primerek 116 fragmentumot szaporítottak fel, aminek a 92,24%-a volt polimorf. A fragmentumok hossza 500 és 4000 bázispár között mozgott (Ercisli és mts., 2008).

Chen és munkatársai 2010-ben a *H. rhamnoides* subsp. *yuannensis* populációk közötti változékonyság vizsgálatánál 113 egyedet használtak fel. A 12 primer által felszaporított 112 lókuszból 104 volt polimorf. A fragmentumok hossza 240-tól 1800 bázispárig terjedt. Az eredmények elemzésével megállapították, hogy a Qionghai-Tibet fennsíkon begyűjtött populációk jelentős eltérések fő okai valószínűleg a természetes földrajzi izoláció. A tengerszint feletti magasságnak nem volt tisztán kimutatható hatása a genetikai változékonyságra.

A homoktövis nemesítése során felhasználható génbanki tételek variabilitásának vizsgálatát Rana és Shirkot (2012) szintén RAPD-technikával végezték el. Az Indiában található Himachal Pradesh területéről gyűjtöttek be 24 genotípust, az államot nyolc részre felosztva mindegyik területéről hármat. A genetikai variabilitás megbecsüléséhez 11 primer által felszaporított RAPD-profilt tanulmányozták. A megtalált 607 fragmentumból 487 bizonyult polimorfnak. Azonosítottak értékes genotípusokra specifikusan megjelenő fragmentumokat, amik hasznosak lehetnek a nemesítési munka során a magoncok előszelektálására. Eredményeik bizonyították az egyes populációk közötti nagymértékű variabilitást.

3.6.2. Az SSR-markerek használata

A DNS nem kódoló régióban rengeteg olyan rész található, amik ismétlődő nukleotid-sorozatokból állnak. Ezeket a tandem ismétlődő DNS-szekvenciákat általában méretük szerint csoportosítjuk, a legkisebbek a mikroszatellitek.

Egyszerre két külön kutatócsoport írta le a maximum pentadukleotidokból álló repetitív DNS-szakaszokat; Weber és May, valamint velük egy évben, 1989-ben Litt és Luty, ők nevezték el a jelenséget mikrosatelliteknek, röviden SSR-nek (*single sequence repeat*). Ezeknek a szekvenciáknak a jelenléte nem szabályos a genomon belül. Taub és Renz (1984) szerint a régiók másolása során a *slippage* (DNS-polimeráz megcsúszása a replikáció folyamán) miatt sokkal könnyebben bekövetkezik *crossing over*. Az utóbbi évtizedben több bizonyíték is felmerült arra vonatkozóan, hogy ezeknek a szekvenciáknak fontos szerepük van bizonyos esetekben a génszabályozásban (Ellegren, 2004), illetve a mikrosatellitvariációk kulcsszerepet játszhatnak az evolúciós és adaptációs folyamatokban (Grover és Sharma, 2011).

A mikroszatellit régiók – a *slippage* gyakori bekövetkezése miatti – hipervariabilitásuknak, kodomináns kifejeződésüknek, könnyű ismételhetőségüknek, genombeli egyenletes és nagy számú előfordulásuknak köszönhetően népszerűvé váltak a markerezési eljárások során. Genetikai változékonyság felmérésére, filogenetiai vizsgálatokhoz, biogeográfiai elemzésekhez, populációgenetiai kérdésekhez, DNS-ujjlenyomat készítéséhez, valamint fajtaazonosítási kérdések és pedigrek tisztázásához ideális markerek (Kalia és mts., 2011b).

A *Hippophaë* nemzetség mikroszatellit vizsgálatával mindezidáig két kutatócsoport foglalkozott. Wang és munkatársai 2008-ban tették közzé az első homoktövis SSR-markerekkel foglalkozó publikációt. A *sinensis* alfajjal foglalkozó tanulmányhoz Kínából 12 egyedről gyűjtöttek mintákat. Biotin-jelölt próbákkal összesen 26 mikrosatellitet izoláltak, melyek közül kilencet találtak polimorfnak, 17 monomorf mintázatot adott. A lókuszonkénti allélszám 3-tól 12-ig terjedt. A vizsgálat célja az alfajok molekuláris alapú elkülönítése volt. A primerpárokat még három másik fajon is tesztelték, és a többségük sikeres amplifikációt eredményezett.

Jain és munkatársai (2010) EST alapú mikrosatelliteket fejlesztettek a *H. rhamnoides* faj leveléből készült cDNS-könyvtár alapján. A genomi mikrosatellitekkel szemben az EST-SSR markerek nagyobb hatékonysággal használhatók adott tulajdonságokat kódoló génekkel kapcsolt markerként. Összesen 30 mikrosatellit lókuszra fejlesztettek primereket. A *H. rhamnoides* genotípusaiban 9 primerpár 2-5 különböző allélt szaporított fel, míg a *H. salicifolia* genotípusokban 11 primerpár detektált polimorf allélokat. A 4 begyűjtött *H. tibetiana* egyedben egyetlen lókuszt sem mutatott diverzitást. Az izolált lókusztok több, mint 50 %-a dinukleotid ismétlődésből álló mikrosatellit. A leggyakrabban motívumok az AT és AG voltak. A trinukleotidokból álló SSR-ek között legtöbbször az AAG ismétlődés fordult elő. Több tanulmány szerint (Grover és mts., 2007) ezek a motívumok ismétlődnek az EST-kben a leggyakrabban, mivel a gének határán, illetve a kódoló részekbe ékelődve fordulnak elő. A *H. tibetiana* monomorfizmusát a tanulmány azzal magyarázza, hogy valószínűleg ugyanazon egyednek a vegetatíván szaporított sarjait gyűjtötték be a területről. Jain és munkatársai a két évvel korábban kifejlesztett Wang-féle markerekből kipróbálták a Hr06 primert, azonban az a várt nagymértékű polimorfizmussal ellentétben csupán két allélt mutatott ki az Indiában begyűjtött mintákon. Valószínűleg ebben az esetben is a túl közeli területről gyűjtött egyedek klonális szaporodása miatt fordult ez elő (Jain és mts., 2010).

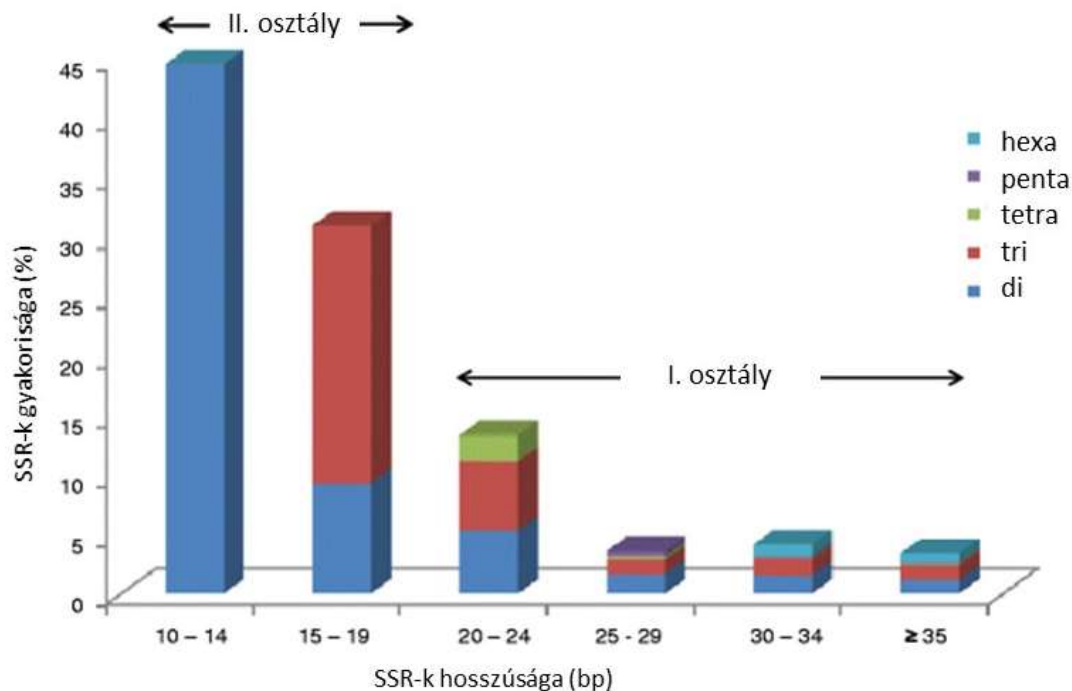
Jain és munkatársai (2014) később sikerrel folytatták a további EST-SSR markerek fejlesztését. Ismét Indiából összegyűjtött növényanyaggal dolgoztak: 18 véletlenszerűen

kiválasztott *H. rhamnoides* és 5 *H. salicifolia* egyeden tesztelték a markerek alkalmazhatóságát. Az Illumina HiSeq2000 szekvenáló platform segítségével 88297, átlagosan 610 bp hosszú szakaszokat szekvenáltak meg, melyek 7.69 %-a tartalmazott mikroszatelliteket. Ezen régiók 14,58 %-a több, mint egy mikroszatellitet tartalmazott. A mikroszatellitek között a dinukleotidos ismétlődések voltak a leggyakoribbak 63 %-kal, míg 31 %-ban trinukleotidok, és csak 5 %-ban fordult elő tertra-, penta- és hexanukleotid-ismétlődés. A dinukleotidok túlnyomó többségi előfordulásának valószínű oka, hogy a kisebb egységek másolása során többször adódik a DNS-polimeráz megcsúszása.

A mikroszatellitek hosszúságukat tekintve két osztályba sorolhatók. Az azonosított mikroszatellitek 24 %-a az I. osztályba, 76 %-a a II. osztályba tartozik hosszúság szerint (4. ábra.). Más tanulmányok is hasonló túlsúlyról számoltak be a II. osztály javára (Roorkiwal és Sharma, 2011). A mikroszatellitek gyakorisága és hosszúsága közötti fordított arányosság annak köszönhető, hogy a *slippage* folyamán a hosszabb fragmentumok rövidülnek (Katti és mts., 2001).

Az előző vizsgálathoz hasonlóan most is az AG, AT dinukleotidok voltak a leggyakoribb ismétlődések. Az AG nukleotidok hasonló mértékű elterjedését megfigyelték más növényekben is (Roorkiwal és Sharma, 2011), amit magyaráz ennek a motívumnak a génszabályozásban játszott aktív szerepe mind az állatok, mind a növények esetében (Triverdi, 2004). Trinukleotidok közül az AAG motívum volt a leggyakoribb, amit szintén megfigyeltek más növényeknél. A motívum szerepet játszhat a másodlagos DNS-struktúra kialakulásában (Grover és Sharma, 2004).

A mikroszatelliteket tartalmazó feltételezett gének nagy része lebontó folyamatokban, valamint különböző bioszintézisben játszik szerepet, legkevesebben pedig a különböző stresszekre adott válaszreakciókban vesznek részt. Az I. osztályba tartozó mikroszatellitek polimorfabbaknak bizonyultak összehasonlítva a II. osztályba tartozókkal. A 21 lókusból 11 bizonyult polimorfnak, összesen 43 alléllal. Az allélok magas száma nemcsak a mikroszatellitek struktúrájának és a homoktövis idegentermékenyülésének köszönhető, hanem az egyes gének típusából és jellegéből is adódhat (Jain és mts., 2014).



4. ábra A *Hippophaë rhamnoides* mikroszatellitjeinek osztályozása hosszúságuk alapján (Jain és mts., 2014)

3.6.3. Az ivarspecifikus markerek jelentősége

A növényvilágban a váltivarúság nem megszokott dolog, az összes növényfaj mindössze 6 %-a egyivarú (Renner és Ricklefs, 1995). Az ivari kétalakúság rendszerint az XY kromoszómarendszer befolyása alatt áll, amelyben a porzós egyedeket heterozigótának – XY, a termős növényeket pedig homozigótának – XX – tekintjük. Annak ellenére, hogy az emberi genomban – mint legismertebb példa – az ivari kromoszómák morfológiailag elkülöníthetők, nincs rá bizonyíték, hogy az összes váltivarú, élő szervezetben megkülönböztethetők morfológiai szempontok alapján az ivari kromoszómák. A növényekvilágban öt nemzetség fajainak – *Cannabis*, *Humulus*, *Rumex*, *Silene*, *Coccinia* – vannak morfológiailag eltérő ivari kromoszómái (Ming és mts., 2007).

A termős és porzós egyedek korai megkülönböztetésének fontossága gazdasági kérdés. Sok idő és pénz megspórolható lenne a két nem biztos megkülönböztetésével a kereskedelmi ültetvények létesítésénél, a nemesítés során az utódok szelektálásánál, valamint a kísérletek korai fázisánál (Jain és mts., 2012). Az eddigi kutatásokat három irányban folytatták: morfológiai, fiziológiai és biokémiai markerek segítségével próbáltak különbségeket találni.

Több csoport is végzett RAPD-alapú kísérleteket. Az első ilyen tanulmányban fajtákat és a keresztezésekből született F₁ nemzedékeket vizsgálták. Eredményeik azonban nem voltak sikeresnek mondhatók, ugyanis a porzós-specifikus marker csak a 'Leikora' × 'Pollmix 1' hibridekben mutatott eredményt (Persson és Nybom, 1998). Sharma és munkatársai (2010) szintén porzó-specifikus markert azonosítottak, azonban az általuk vizsgált állomány csupán öt termős és öt porzós egyedet tartalmazott összesen.

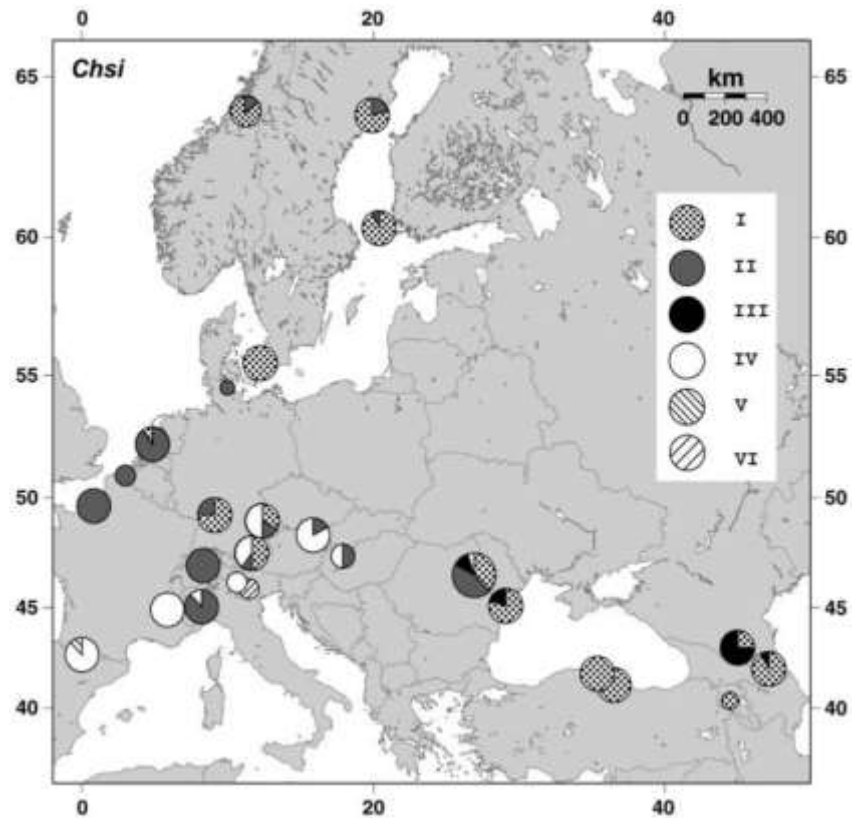
A RAPD-markerek nehéz reprodukálhatósága, és a PCR során mutatott érzékenyséjük miatt Korekar és munkatársai (2012) SCAR-markert fejlesztettek egy 100 porzós és 120 termős *H. r. subsp. turkestanica* genotípusokat tartalmazó populáción. Összesen 60 RAPD-ból két primernél figyeltek meg csak a termős egyedekre jellemző fragmentumot. A gélből izolált fragmentumok szekvenciája alapján két SCAR-markert fejlesztettek, és teszteltek minden egyeden. Az eredményeik szerint mind a két marker csak a termős egyedeken szaporított fel a *HrX1* esetében 470 bp, a *HrX2* esetében 386 bp hosszú szakaszokat. A két fragmentum szekvenciája sem egymással nem mutatott semmilyen hasonlóságot, sem az eddigi ismert növényi szekvenciákkal. A *HrX1* SCAR-marker a *H. salicifolia* és *H. tibetana* fajok esetében is kiválóan működött (Chawla és mts., 2014).

3.6.4. A kalkon-szintáz gén intronhossz-polimorfizmusa (ILP)

A növényekben a *kalkon-szintáz* (Chs; EC 2.3.1.74) enzimet kódoló gén intronja nagymértékű hosszpolimorfizmust mutat, ezért markerként jól alkalmazható filogenetikai vizsgálatokban (Strand és mts., 1997). Bartish és munkatársai (2006) a *Hippophaë rhamnoides* biogeográfiai elemzéséhez cpDNS-vizsgálatot és a *Chs* gén intronhossz-variabilitását használták fel.

Az Európa és Kis-Ázsia 26 különböző területéről összegyűjtött 131 egyedből 81 haplotípust sikerült azonosítani. A szekvenciák hossza 628 és 778 bp között volt. A 81 haplotípus szekvenciája alapján 6 csoportot különítettek el. Megállapították, hogy a I. klád köti össze leginkább a keleti, közép-európai, és északi területeken élő populációkat. A II. klád legnagyobb elterjedésben Nyugat-, és Közép-Európában található meg, kis gyakorisággal megtalálható Románia és Skandinávia területén is. Az analízis alapján összeállított III. klád elterjedése Kelet-Európára, és a Kaukázusra korlátozódik. Az Alpokban, és a Pireneusokban a IV. klád tagjai találhatóak meg. A dendrogram V.

ága csak a Prireneusokban található meg. A VI. klád ágazik el a leghamarabb a törzshöz képest, az egyetlen hely, ahol ezt a haplotípust megtalálhatjuk, a Dél-Alpokban van (5. ábra).



5. ábra A kalkon-szintáz gén haplotípusainak földrajzi elterjedése (Bartish és mts., 2006)

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

A vizsgálatokhoz felhasznált fajtákat (2., 3. táblázat) a Budapest Corvinus Egyetem Kísérleti Üzem és Tangazdaság, Karádi Péter és Pető Katalin termesztők biztosították.

Az őshonos populáció jellemzésére az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területről 68 (6. ábra), illetve az 2A autótút mellől 8 egyedet gyűjtöttünk be. A begyűjtésükhöz szükséges engedélyt az 1. sz. melléklet tartalmazza.

A *kalkon-szintáz* gén vizsgálatához a 3 Törökországban vadon élő genotípust Prof. Sezai Ercisli gyűjtötte.

2. táblázat A vizsgálatban szereplő homoktövisfajták jellemzői és származása (Varga és Kovács, 2001), valamint az újpesti területről gyűjtött egyedcsoportok GPS koordinátái

minta	származás, leírás
Frugana	• német nemesítésű • erős növekedésű, jól megújuló, kevésbé tövises bokor • 3. évtől terem, fénylő narancsvörös terméseket hoz, bőtermő, jó minőségű levet ad • gépi betakarításra alkalmas
Leikora	• német nemesítésű • erős, kompakt növekedésű, jól megújuló, kevésbé tövises bokor • sötét narancssárga terméseket hoz • gépi betakarításra nem alkalmas • dísznövényként is használható
Hergo	• német nemesítésű • középérs növekedésű, elágazó hajtásrendszerű, jól megújuló, kevésbé tövises bokor • világos narancssárga terméseket hoz, nagyon bőtermő
Pető 2.	ismeretlen eredetű orosz szelekció
Római 2	ismeretlen eredetű orosz szelekció
Orosz porzós fajta	• orosz nemesítésű • erős növekedésű, felfelé törő hajtásrendszerű, kevésbé tövises bokor
S 20	ismeretlen eredetű román fajtajelölt
Oranzsevaja	• orosz nemesítésű • közepesen sűrű hajtásrendszerű, kevésbé tövises bokor • világos narancssárga, kisméretű terméseket hoz, jó termőképességű
Jantarnaja	• orosz nemesítésű • középérs növekedésű, ritka hajtásrendszerű, kevésbé tövises bokor • sötét narancssárga, nagyméretű terméseket hoz, igen jó termőképességű

3. táblázat A vizsgálatban szereplő homoktövisfajták jellemzői és származása (Varga és Kovács, 2001), valamint az újpesti területről gyűjtött egyedcsoportok GPS koordinátái

minták	származás, leírás
Avr	ismeretlen eredetű román fajtajelölt
Obilnaja	• orosz nemesítésű • középerős növekedésű, kevésbé tövises bokor • világos narancssárga, nagy tömegű terméseket hoz, igen jó termőképességű
Aromata	ismeretlen eredetű orosz szelekció
Csujszkaja	• első orosz nemesítések között • középerős növekedésű, szétterülő hajtásrendszer, kevésbé tövises bokor • sötét narancssárga, nagyméretű, édeskés terméseket hoz, igen jó termőképességű
1-34	Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területéről: 47.602574, 19.098004
35-40	Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területéről: 47.602737, 19.096287
41-45	Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területéről: 47.602755, 19.097006
46-64	Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területéről: 47.602448, 19.096292
65-70	Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területéről: 47.601807, 19.097988
71-78	2A autótút mellől: 47.647731, 19.161147



6. ábra Az egyedcsoportok elhelyezkedése az Újpesti homoktövis természetvédelmi területen

4.2. DNS-kivonás

A genomi DNS-t a növények begyűjtött, és -20 °C-on tárolt leveleiből vontuk ki DNeasy Plant Mini Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország).

4.3. PCR-analízis

Az amplifikáláshoz Wang és munkatársai (2008), valamint Jain és munkatársai (2010) tanulmányaiból 7 primerpárt használtunk (4. táblázat).

4. táblázat A vizsgálatban felhasznált hét mikroszatellit lókusz jellemzői

Primer neve	Ismétlődő motívum	Lókusz	Forrás
HrMS003	(TCA)6	EST-SSR	Jain és mts. 2010
HrMS012	(CTT)11	EST-SSR	Jain és mts. 2010
HrMS025	(AG)8	EST-SSR	Jain és mts. 2010
Hr01	(GA)11	SSR	Wang és mts. 2008
Hr02	(AG)9	SSR	Wang és mts. 2008
Hr03	(AG)10	SSR	Wang és mts. 2008
Hr06	(CA)9	SSR	Wang és mts. 2008

A mikroszatellit PCR-hez kb. 25 ng DNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban: 10 × PCR puffer (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada), 2,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 0,4 µM az adott primerekből és 0,625 U *Taq* DNS-polimeráz.

Az ivarmarker vizsgálathoz a HrX1 SCAR-marker primerjeit, OPA04(FS)F (TATGAGCTCTCGACTGACAGCCA) és OPA04(FS)R (CTGTTGTCCGAGATGACGCGT), valamint a HrX2 SCAR-marker primerjeit, OPT06(FS)F (AAGTGTGGCCACCGTCGTAAGA) és OPT06(FS)R (ACCGTGTCTGATGCACTGTGTATAG) használtuk Korekar és mts. (2012) nyomán. A *Chs* intronhossz-variabilitás vizsgálathoz a CHSx1F (AGGAAAAATTCAAGCGCATG) és CHSx2RN (TTCAGTCAAGTGCATGTAACG) primerpárt használtuk (Strand és mts., 1997).

Ez utóbbi PCR-vizsgálatokhoz 0,625 U *DreamTaq*-polimerázt (Fermentas-Thermo Scientific), és hozzá 10 × DreamTaq puffert, 2,5 mM MgCl₂-t, 2 mM dNTP-t, 10⁻² mg/ml BSA-t, 0,4 µM-t az adott primerekből mértünk össze 25 µl végtérfogatban. A PCR-t PTC 200 (MJ Research, Quebec, Kanada) típusú készülékben végeztük a primerekhez közölt, eltérő protokollok alapján.

4.4. Fragmentumhossz-analízis

A PCR termékeket 2 %-os etidium-bromidos TBE agaróz gélen, Gene-Ruler 100 bp (Fermentas-Thermo Scientific) méretmarkerrel, futtattuk 80V-on. Az amplifikáció sikerességét UV-fény alatt ellenőriztük. Az SSR-allélok 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. Klónozás, szekvenálás

A *kalkon-szintáz* gén intronrégiójának klónozása az InsTA Clone PCR Cloning Kittel történt a gyártó utasításai szerint (Fermentas-Thermo Scientific). A ligálás egy éjszakán át 4 °C-on 10 µl végtérfogatban történt: 20-50 ng tisztított PCR-fragmentum, 1,65 U T₄ DNS-ligáz, 55 ng pTz57R/T plazmid vektor, 5x ligációs puffer desztillált vízzel kiegészítve.

A klónozott fragmentumokkal JM109 kompetens sejteket transzformáltunk. A teljes ligációs elegyet 80 µl –70 °C-on tárolt kompetens baktériumszuszpenzióval finoman összeráztuk, majd 20 percen át jégen tartottuk, azután 45 másodpercig 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük 2 percig. Végül 950 µl 37 °C-os folyékony, antibiotikummentes LB táptalajt adtunk hozzá, és másfél óráig ráztattuk 37 °C-on, 150 rpm fordulatszámmal. Ezután 100–400 µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk LB /ampicillin/IPTG/X-gal szilárd táptalajon: 10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 7 g/l agar, 100 µg/ml ampicillin pH=7; a plate felszínén 100 mM IPTG-t és 50 mg/ml X-galt oszlattunk szét. A kész plate-eket fordított helyzetben 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A kolónia-PCR során pozitívnak mutatózó baktériumkolóniákból folyadékkultúrát indítottunk. A plazmidokat EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Kanada) izoláltuk. Szekvenciájuk meghatározása szintén ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) automata DNS-szekvenátorral történt. Minden minta esetében három klón szekvenálását végeztük el. A DNS és aminosav-szekvenciák homológiavizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (Altschul és mts., 1990) használtuk, a szekvenciák illesztését a CLUSTAL W (Thompson és mts., 1994) programmal hoztuk létre. A filogenetikai analízishez a MEGA6 (Tamura és mts., 2011) programot használtuk. A maximális parszimónia módszerrel készített kladogram statisztikai ellenőrzéséhez *bootstrap*-analízist használtunk 1000 ismétléssel.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Homoktövis fajták DNS-ujjlenyomata

A vizsgálatban összesen 12 termős és egy porzós fajta szerepelt. Németországban nemesített fajták a Frugana, Leikora és a Hergo, míg orosz eredetűek az Oranzsevaja, Jantarnaja, Avr, Obilnaja, Aromata, Csujszkaja, Pető 2., Római 2., S20 valamint egy porzós fajta.

A *Hippophaë* nemzetségre fejlesztett SSR-primerek közül hetet választottunk ki (5. táblázat) a lókuszokra jellemző allélszámok alapján (Wang és mts., 2008; Jain és mts., 2010). A PCR-amplifikáció mindegyik lókusz esetében sikeres és megismételhető volt, valamint mind a hét polimorfnek bizonyult. A felszaporított DNS-szakaszok között agaróz gélelektroforézissel nem tudtunk egyértelmű különbséget tenni, csak a PCR-termék minőségét ellenőriztük, és meghatároztattuk a fluoreszcensen jelölt fragmentumok pontos méretét. Az eredmények kiértékeléséhez ez elengedhetetlen volt, mert több lókusz esetében is csupán néhány bázispárnyi különbség mutatkozott az egyes allélok méretében. Az allélokat a kapilláris elektroforézissel működő automata szekvenáló készülék használatával, a kromatogramok alapján egyértelműen meg lehetett különböztetni.

Minden fajtában valamennyi primerpár használatával kettő vagy egy allélt detektáltunk, az egy allélt hordozó genotípusokat homozigótának tekintettük. A 7 lókuszban összesen 53 allélt azonosítottunk, ez átlagban 7,5 allél lókuszonként (6. táblázat). A lókuszonkénti allélszám 4 és 12 között mozgott. Az allélok mérete 73 és 370 bp között változott. A legnagyobb allélszám a HrMS025 lókuszt jellemezte (12), és az allélok közötti méretkülönbség is ebben az esetben volt a legnagyobb (314-370 bp). A legkevesebb, 4 allél a Hr06 lókuszban fordult elő.

5. táblázat A vizsgálatba bevont lókuszok allélszáma 13 homoktövisfajta esetében

Primer neve	Allélhossz (bp)	Allélok száma a forrásmunka alapján	A vizsgálatban szereplő allélszám
HrMS003	337-361	5	9
HrMS012	143-167	5	8
HrMS025	314-370	4	12
Hr01	163-175	12	7
Hr02	157-169	6	7
Hr03	84-94	11	6
Hr06	73-93	12	4

A 7 lókuszt eredményei alapján a kapott fragmentumméretekkel a 13 fajta mindegyike egyedi DNS-ujjlenyomattal azonosítható volt, melyeket a 6. táblázatban foglaltunk össze.

6. táblázat Homoktövisfajták 7 SSR-lókuszt jellemző fragmentumhossz adatai (bp)

	HR01		Hr03		Hr06		HrMS003		HrMS012		HrMS025		Hr02	
Frugana	163	163	84	86	73	73	340	340	146	167	330	338	157	169
Leikora	171	173	92	94	75	75	340	340	143	155	332	338	159	167
Hergo	163	163	84	86	73	73	340	340	146	164	x	x	157	169
Pető 2.	173	175	94	94	73	73	340	349	149	155	334	346	159	167
Római 2	165	165	86	86	75	75	x	x	143	149	360	362	159	163
Orosz porzós	167	167	88	90	73	83	337	355	155	161	314	336	163	165
S 20	165	165	86	86	75	93	340	340	143	155	368	370	159	161
Oranzsevaja	169	169	88	90	75	75	346	352	146	161	314	314	163	169
Jantarnaja	169	169	90	90	73	73	346	352	146	149	314	314	163	163
Avr	167	173	88	94	73	73	340	343	143	161	336	338	159	161
Obilnaja	169	169	90	90	73	73	346	352	146	149	314	314	163	163
Aromata	169	171	92	94	75	75	358	361	143	146	314	314	163	163
Csujszkaja	169	169	90	92	75	75	346	355	152	155	314	336	163	169

5.2. Az újpesti homoktövis-állomány vizsgálata SSR-markerekkel

A terület látogatása során megállapítottuk, hogy kb. 200 egyedből áll a populáció, amelyek térbeli izoláció nélkül öt csoportba rendeződnek, néhány méternyi távolságra egymástól (6. ábra az Anyag és módszerben). Mindegyik egyedcsoportból nem szomszédos növényről, a csoport méretével arányos mennyiségű levelet szedtük, átlagosan 4-5 darabot. A vegetatív szaporulat miatt nem lehetett biztonságosan megállapítani az egyedhatárokat, valószínűnek tűnt, hogy az egymás melletti növények valójában genetikailag azonosak, egy genetről származnak. Az egyes egyedcsoportok morfológiailag nagyjából egyöntetűek voltak. Az újulat között találtunk valószínűsíthető magoncokat és klónokat is.

A 13 fajta esetében tesztelt és jól működő hét markerből hat mutatott megbízhatóan kiértékelhető eredményeket (7. táblázat). A legnagyobb allélszámú Hr025 lókuszt kiértékelése nehézkessé vált az elektroforetikus csúcsok rendszertelen megjelenése miatt, ezért az eredmények összesítéséből kihagytuk. A populáció egészében rendkívül alacsony volt a lókuszonkénti allélszám. A Hr01 lókuszt esetében 3 (165 bp, 171 bp, 175 bp); a Hr02 lókusztban 3 (159 bp, 165 bp, 169 bp); a Hr03 lókusztban 5 (82 bp, 86 bp, 88 bp, 92 bp, 96 bp); Hr06 lókusztban 2 (75 bp, 87 bp); HrMS003 lókuszt esetében 2 (214 bp, 250 bp) és a HrMS12 lókusztban 2 (143 bp, 155 bp). Homozigóta genotípus egyáltalán nem fordult elő. A genotípusok száma az egyes lókusztokban: a Hr01 lókuszt esetében 2 (165/171 és 165/175); a Hr02 lókusztban 2 (159/165 és 159/169); a Hr03

lókuszban 4 (86/92, 88/92, 86/96, 82/96); Hr06 lókuszban 1 (75/87); HrMS003 lókusz esetében 1 (214/ 250) és a HrMS12 lókuszban 1 (143/155). Az egyes egyedcsoportokban a Hr03 lókusz kivételével minden növény genotípusa azonos volt.

Ugyanakkor a 2A autóút mentén a sövényként telepített sorból gyűjtött 8 egyed (71/6-78/6) eltérő mintázatot, jóval nagyobb variabilitást mutatott: a Hr01 lókusz esetében 5 (157 bp, 163 bp, 165 bp, 171 bp, 175 bp); a Hr02 lókuszban 5 (151 bp, 157 bp, 159 bp, 165 bp, 169 bp); a Hr03 lókuszban 5 (78 bp, 84 bp, 86 bp, 92 bp, 96 bp); Hr06 lókuszban 7 (71 bp, 73 bp, 75 bp, 85 bp, 87 bp, 91 bp, 93 bp); HrMS003 lókusz esetében 5 (250 bp, 324 bp, 338 bp, 340 bp, 354 bp) és a HrMS12 lókuszban 4 (143 bp, 145 bp, 149 bp, 155 bp) allélt azonosítottunk.

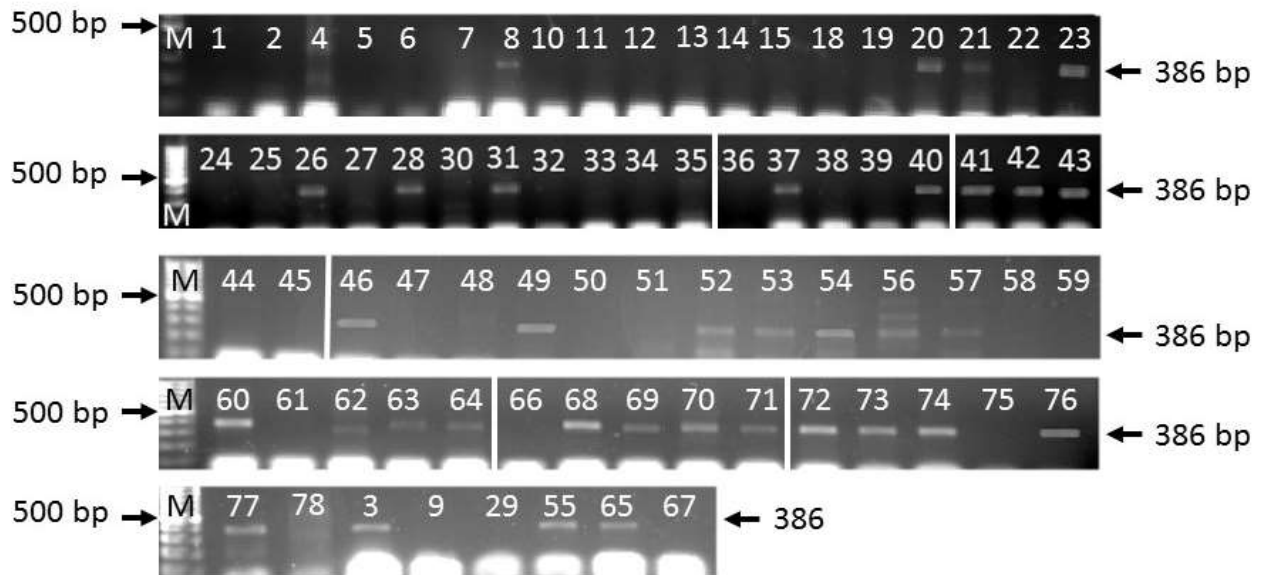
7. táblázat Az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területről gyűjtött növények 6 SSR-lókuszra jellemző fragmentumhossz adatai (bp), a populáció öt egyedcsoportját (egyed sorszáma/csoport 1-5), valamint a 2A autótút mentén gyűjtött egyedeket (71/6-78/6) külön jelöltük

	HR01		Hr03		Hr06		HrMS003		HrMS012		Hr02	
1/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
2/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
3/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
4/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
5/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
6/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
7/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
8/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
9/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
10/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
11/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
12/1	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
13/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
14/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
15/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
18/1	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
19/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
20/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
21/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
22/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
23/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
24/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
25/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
26/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
27/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
28/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
29/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
30/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
31/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
32/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
33/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
34/1	165	171	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
35/2	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
36/2	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
37/2	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
38/2	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
39/2	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
40/2	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169

	HR01		Hr03		Hr06		HrMS003		HrMS012		Hr02	
41/3	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
42/3	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
43/3	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
44/3	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
45/3	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	169
46/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
47/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
48/4	165	175	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
49/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
50/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
51/4	165	175	82	96	75	87	214	250	143	155	159	169
52/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
53/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
54/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
55/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
56/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
57/3	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
58/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
59/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
60/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
61/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
62/4	165	175	86	96	75	87	214	250	143	155	159	169
63/4	165	175	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
64/4	165	175	86	92	75	87	214	250	143	155	159	169
65/5	165	171	88	96	75	87	214	250	143	155	159	165
66/5	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	165
67/5	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	165
68/5	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	165
69/5	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	165
70/5	165	171	88	92	75	87	214	250	143	155	159	165
71/6	165	171	86	92	75	87	250	340	143	155	159	159
72/6	157	163	78	86	71	85	250	340	143	145	151	157
73/6	157	165	84	92	73	85	250	340	143	149	151	157
74/6	165	171	86	92	75	93	250	324	143	145	157	165
75/6	165	171	86	92	75	91	338	354	143	149	159	165
76/6	157	163	86	92	73	85	250	340	145	149	151	157
77/6	157	163	84	90	75	85	340	340	143	155	151	157
78/6	157	163	84	92	73	85	324	340	143	145	151	157

5.3. Ivarspecifikus markerek használata

Korekar és munkatársai 2012-ben fejlesztett két markeréből csak a *HrX2* markert találtuk megbízhatónak az ismert fajtákon kontrollként elvégzett kísérlet során. A PCR optimalizálása érdekében kétféle polimerázt próbáltunk ki (Anyag és módszer), illetve a PCR-inhibitorok gátló hatása ellen BSA-t adtunk a PCR-mixhez. BSA használatával a DreamTaq-polimeráz bizonyult eredményesebbnek. A vizsgált 76 mintából 34-nél szaporította fel a kívánt 386 bp hosszú DNS-szakaszt (7. ábra). Az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területről begyűjtött minták közül 28-at jelzett női ivarúnak a marker, ez azt jelenti, hogy termős egyedek aránya a porzósokhoz képest 1:1,42. Az termős egyedek aránya a porzósokhoz egyedcsoportonként: 1. csoport: 1:3,51 ; 2. csoport: 1:2 ; 3 csoport: 1:0,67 ; 4. csoport: 1:0,64 ; 5. csoport: 1:0.5.

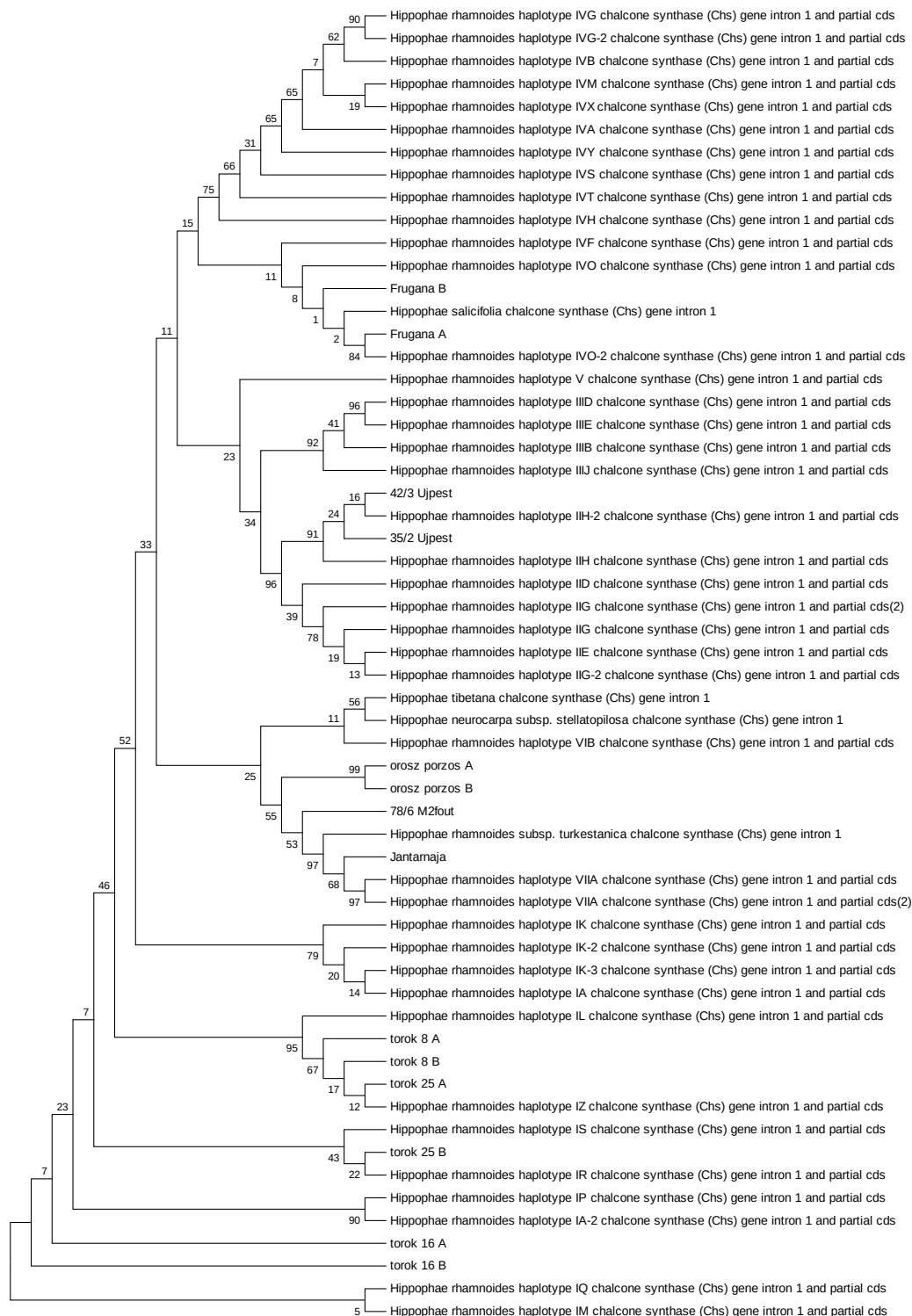


7. ábra Az ivarspecifikus *HrX2* markeranalízis (Korekar és mts., 2012) eredménye 76 homoktövisegyeden. A termős példányokat egy 386 bp hosszú fragmentum detektálja. Az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területről és a 2A autótól gyűjtött egyedcsoportokat fehér vonalak határolják

5.4. A *kalkon-szintáz* gén intronhossz-variabilitásának vizsgálata

A *kalkon-szintáz* gén intronrégióját (*Chsi*) Strand és mts. (1997) által fejlesztett primerpárral amplifikáltuk a természetvédelmi terület két egyedéből (35/2, 42/3), a 2A autótól menti egyik egyedéből (78/6), a 'Frugana', a 'Jantarnaja', az orosz porzós fajtákból, valamint

három, Törökországban vadon élő egyedből (török 8, 16 és 25). Az egyes mintákból egy vagy két különböző allélt detektáltunk (homo- vagy heterozigóta). Az amplifikált fragmentumok méretei a következők voltak: a 35/2 egyed esetében 691 bp, a 42/3 egyednél 696 bp, a 78/6 egyednél 728 bp, a 'Frugana' fajtánál 593 bp és 718 bp, a 'Jantarnaja' fajtánál 712 bp, az orosz porzós fatánál 650 bp és 660 bp, a török 8 egyednél 684 bp, a török 16 egyednél 655 bp és 653 bp, a török 25 genotípusnál 688 bp és 665 bp. A szekvenciákat BLASTN homológiavizsgálattal ellenőriztük, majd az adatbázisból letöltött 44 *Hippophaë Chsi* szekvenciával maximális parszimónia módszerrel hasonlítottuk össze (8. ábra). A *Chsi* haplotípusokat Bartish és munkatársai (2006) 7 (I-VII) csoportba sorolták. Az újpesti állományban előforduló két allél a II. haplotípusokhoz csoportosult, a 2A út melletti egyed az orosz porzós és a 'Jantarnaja' fajtához rendeződött, a 'Frugana' a IV. haplotípusokhoz, míg a török egyedek az I. csoportba kerültek.



8. ábra *Hippophaë rhamnoides* genotípusok *kalkon-szintáz* génjének maximális parszimónia módszerrel készített filogenetikai vizsgálata a kládok szignifikanciáját jellemző bootstrap-értékekkel

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. Homoktövisfajták azonosítása SSR-markerekkel

A gazdaságilag jelentős fajok esetében (alma, szőlő, paradicsom, stb.) a molekuláris markerezési technikák fejlődésével megkezdődtek az egyes fajták DNS-ujjlenyomatainak meghatározási munkái a fajtaazonosítás, fajtakeveredés kimutatása és a nemesítési alapanyagok, génbanki tételek jellemzése miatt. A technikák közül a mikroszatellit markerezés bizonyult legjobbnak, ezért általános irányelvvé vált minden egyes faj esetében azon SSR-lókuszok meghatározása, amelyekkel az adott fajták genotipizálása, megkülönböztethetősége egyértelmű. Természetesen a kiválasztott lókuszok száma fajonként eltérő, hiszen a ploidiszint, a genom mérete és komplexitása ezt alapvetően befolyásolja (Silfverberg-Dilworth és mts., 2006; Cipriani és mts., 2010). Homoktövis esetében számos közlemény született a DNS-alapú markerek használatáról, de valamennyi a természetes populációk felmérésére irányult, fajták genotipizálásával eddig még senki nem foglalkozott.

Wang és munkatársai (2008) a kínai *Hippophaë rhamnoides* subsp. *sinensis* alfaj genomjából izoláltak SSR-lókuszokat, melyek polimorfizmusát vadon élő, egymástól távol eső populációk 12 egyedén tesztelték. Az általuk leírt négy lókusból háromban kevesebb allélszámot találtunk, például a HR01 lókusz esetében 12-vel szemben csak négyet. Szinte pontosan azonos mintaszámon végeztük a vizsgálatokat, tehát nem az egyedek számából adódik a különbség, hanem valószínűleg a vadon élő genotípusok nagyfokú polimorfizmusából. Az allélok méretében kismértékű eltérések tapasztalhatók, ami nem meglepő, hiszen egy másik alfajon készült az elemzés. Ráadásul a különböző fluoreszcens festékek és az eltérő típusú automata szekvenátorok használata néhány nukleotidnyi eltérést okozhatnak az egyes méréseknél (Cachi és Wunsch, 2014).

Ugyanakkor Jain és munkatársai (2010) a *Hippophaë* nemzetség három fajának (*H. rhamnoides*, *H. salicifolia* és *H. tibetana*) genomjából EST-SSR primereket terveztek, összesen 14 genotípuson tesztelve azokat. Ezekből három lókuszt vizsgáltunk mi is, amelyek minden esetben nagyobb allélszámot adtak, a legnagyobb különbséget a HrMS025 lókusznál leírt 4 alléllal szemben a vizsgált fajtákban előfordult 12 allél jelentette. Az amplifikált allélok méretét a szerzők nem közölték, így nem tudtuk összevetni, milyen mértékű különbségek adódtak.

Az eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy a kiválasztott primerek megbízhatóan használhatók, ha a fajtanemesítés támogatása érdekében értékes genotípusok

molekuláris markerezésére van szükség, valamint egy esetleges fajtakeveredésnél a megállapított SSR-genotípusok alapján a fajták egyértelműen, egyedileg azonosíthatók.

6.2. Az őshonos homoktövis-állomány jellemzése SSR-markerek alapján

A 6 SSR-lókusz által felmért genetikai variabilitás rendkívül alacsonynak bizonyult az újpesti állományban. Az egyes egyedcsoportokban szinte ugyanazok a genotípusok fordultak elő, az allélmintázat monomorf volt. Az összes egyed heterozigóta volt valamennyi lókuszban, ami nem meglepő egy kétlaki növény esetében. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az élőhely degradációjával és a környezeti stressz növekedésével – autópálya-építés, villanyoszlopok létesítése, személtlerakás, nem társulásazonos fajok megjelenése, megnövekedett légszennyezés – az alacsonyabb vegetatív és reprodukciós fitnessszel rendelkező egyedek elpusztultak, és néhány toleránsabb növény szaporodott el a területen. Erdeifenyőn, tölgyeken, lucfenyőn is kimutatták, hogy légszennyezés hatására a pollenszemek sterilitása növekszik (Borzan és Schlarbaum, 1997). Az ivaros szaporodáshoz képest a populáció valószínűleg sokkal több energiát fordított a vegetatív úton történő szaporodásra, a polikormon képzésre, ami a homoki társulásokban élő fajok esetében gyakori, és az évelő pionír fajokra különösen jellemző.

A kis genetikai variabilitás és a rossz környezeti viszonyok miatt az egyedek pollenadó- és termékenyülő-képessége romlik, ami a beltenyészet kialakulásához vezet (Mátyás, 2002). Az alacsony genetikai diverzitás egy elszigetelt populáció esetében különösen veszélyes lehet, hiszen a közel azonos génállományú egyedek genetikailag instabil populációt alkotnak. A kórokozókkal és kártevőkkel szembeni védelem például jelentősen gyengébb egy ennyire egységes populáció esetében. Bár a homoktövisnek viszonylag kevés kórokozója és kártevője ismert, a növény népszerűségének növekedésével egyre több ültetvényt telepítenek országszerte, amelyekben már komoly kártételek is előfordulnak. Az ültetvényekben jelentős veszélyforrás lehet a verticilliumos hervadás (*Verticillium dahliae*), a Németországban újonnan felbukkanó és komoly kártételt okozó szibériai homoktövislégy (*Rhagoletis batava*), a kis és nagy farontólepke (*Zeuzera pyrina*, *Cossus cossus*), amelyek egy teljes állomány kipusztulását is okozhatják (Porpáczy, 1997; Karádi Péter, szóbeli közlés).

A vegetatív sarjtelemek (polikormonok) mentén pontos egyedhatárokat nem tudtuk megállapítani, ezért attól függetlenül, hogy térben nagyobbnak tűnik egy populáció még lehet, hogy csupán néhány klonálisan kiterjedt példány alkotja, mint ahogy az eredmények tükrében ez

valószínű. Ennek nagy természetvédelmi jelentősége lehet hiszen egyes populációkat nagyobbban ítélnék, mint amekkorák valójában (Lendvay és mts., 2013a, b).

Bartish és munkatársai az 1990-es évek végén kezdték meg átfogó vizsgálataikat a homoktövis európai elterjedésével kapcsolatban. Ebben a vizsgálatban szerepelt az újpesti területet reprezentáló növényanyag is. Az elsődleges analíziseket RAPD-markerekkel végezték (Bartish és mts., 1999; 2000), később a cpDNA elemzésén és a *kalkon-szintáz* gén intronhossz-polimorfizmusán alapuló vizsgálatokat folytattak (Bartish és mts., 2006). A kezdeti adatok szerint az újpesti állomány nem tűnt homogénnek, és a kiértékelés során sem kaptak egyértelmű eredményt. Ez alapján azt feltételezték, hogy a természetvédelmi területen nemcsak az őshonos növényállomány található meg, hanem a közelben, például a 2A autót mentén sövényként telepített homoktövisfajtákról származó, a madarak által behurcolt maganyag is belekeveredhetett az eredeti populációba (Igor V. Bartish, szóbeli közlés). Ezen hipotézis miatt az újpesti állomány növényei végül ki is maradtak az elemzésekből, a megjelent publikációkban nem szerepeltek. A feltételezés ellenőrzése érdekében a természetvédelmi területen 68 növényről gyűjtöttünk mintát, valamint a 2A autót mellé telepített növényorsóból 8 egymástól távolabb elhelyezkedő egyedről. Az SSR-analízis egyértelműen bizonyította, hogy a természetvédelmi állomány teljesen homogén, sőt kifejezetten monomorf mintázatot adott. Bár találtunk az ivaros szaporodásra utaló magoncokat, alapvetően gyökérsarjakkal szaporodnak a növények. A 2A autót menti egyedek viszont teljesen más SSR-mintázatot adtak, hasonlóan nagymértékű variabilitással, mint a korábban tesztelt 13 termesztett fajta esetében. Ez utóbbi genotípusokat nem detektáltuk az újpesti állományban, tehát a reprezentatív mintavétel alapján kijelenthető, hogy a természetvédelmi területen jelenleg nem találhatók telepített (idegen eredetű) fajtáktól származó magoncok. Ha a több mint 15 évvel korábbi mintavétel az ellenkezőjét mutatta, akkor egyrészt elképzelhető, hogy a RAPD-technika megbízhatatlansága miatt voltak félreérthetőek az adatok, amivel szemben az SSR-markerek jóval megbízhatóbb eredményeket produkálnak (Agarwal és mts., 2008). Másrészt, ha elő is fordult, hogy néhány „idegen” magonc került a populációba, valószínűleg mára kiszorultak az állományból, a homoki gyepterületre jellemző speciális ökológiai körülmények hatására.

6.3. Az ivarspecifikus markerek alkalmazhatósága

A váltivarú kétlaki növényeknél az ivarok aránya fontos tényező a populáció fennmaradása szempontjából. A természetvédelmi területen a termés nélküli egyedeket nem tekintettük

egyértelműen porzós példányoknak, mert a termőkorú növényekről a bogyókat a madarak elhordhatták. Morfológiailag a két ivar elkülönítése nem mindig egyértelmű (Kalia és mts., 2011a). A tesztelt *HrX2* marker (Korekar és mts., 2012) a termős és porzós kontroll fajtákon többszörös ismételtsben az optimalizált PCR-körülmények mellett megbízhatóan működött. Kerti és munkatársai (2014) szintén az újpesti populáció egyedein tesztelték mind a Korekar-féle RAPD-markereket, mind a belőlük fejlesztett SCAR markereket. Eredményeik szerint sem a RAPD-profilok, sem a *HrX1* illetve a *HrX2* által mutatott gékép nem volt megfelelő a porzós és termős egyedek közötti különbségtételre. Véleményük szerint a markerfejlesztéshez kevés és egy termőhelyről begyűjtött növényt használtak, így nem ivarhoz kötött egyedi genotípusos különbségeket ítélték ivarspecifikusnak. Ugyanakkor szintén ugyanezeket a SCAR-markereket ellenőrizték *H. tibetana* és *H. salicifolia* fajokon Chawla és munkatársai (2014). Az ő növényanyagukon a *HrX1* marker sikeresen működött a megfelelő lokuszokon mind a két fajnál, a *HrX2* azonban csak a kontrollként használt *H. rhamnoides* faj esetében adott pozitív eredményt.

Vizsgálataink alapján a *HrX2* marker megbízhatóan használható az ivarok meghatározására, ugyanakkor a tesztrendszer ideálisabbá tételéhez belső kontroll fejlesztése szükséges, mint ahogy ez más allélspecifikus primereknel már bevált módszer (Sonneveld és mts., 2003; Halász és mts., 2008). Ennek hiányában ugyanis a negatív eredményt adó mintáknál nem lehet kizárni, hogy esetleg a PCR nem működött megfelelően.

Az újpesti populáció öt kisebb csoportja közül kettőben találtunk jelentősebb mennyiségű termős példányt, a harmadikban 2 termős egyedet találtunk, kettőben pedig egyáltalán nem lehetett látni természetes növényeket a minták begyűjtésekor. Az eredmények szerint a terület látogatásakor vélt ivarösszetétel - miszerint a 2. és a 3. csoport csak termős, a 1. és 4. csoport csak porzós egyedekből áll - nem a valós állapot. Az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területen található növényanyag ivari összetétele eltér Huxley (1992) eredményétől, amelyben a vizsgált populáció aránya 2:3 volt a termős egyedek javára. Li és mts. (2007) szerint az arány megfelelő környezeti paraméterek között nagyjából kiegyenlített. Az, hogy a területen kicsivel több porzós egyed található magyarázható egyrészt azzal az általánosan elfogadott ténnyel, miszerint a kétlaki növények esetében a porzós egyedek a növekedésre fordítják erőforrásaik nagy részét, míg a termős egyedekben a reprodukcióra való készítés a nagyobb (Massei és mts., 2006), másrészt azzal, hogy a homoktövis esetében is – mint a szélporozta fajok többségében – a kikelt magoncok között a hímivarúak száma nagyobb (Jong és Meijden, 2004). A homoktövis rendkívül

fényigényes növény lévén még saját árnyékolását sem tudja elviselni, ezért a fotoszintetizáló hajtások felül helyezkednek el, és az egyedek a versenyképessége gyenge. A termős magoncok esetében ez is hátrányt jelenthet.

Gadó (1999) ugyanúgy írja le a területen a populáció egyedcsoportokra oszlását, mint ahogy mi is megfigyeltük. Megjegyzi, hogy régebbi felmérések a populáció ivararányát rosszabbnak találták. Mivel tudjuk, hogy a környezeti tényezők romlásával az ivari összetétel eltolódik a porzós egyedek irányába (Li és mts., 2007), az ivararány (szexitás) javulása valószínűleg a terület megkezdett rehabilitálásának, az árnyékoló növényállomány visszaszorításának köszönhető.

6.4. A kalkon-szintáz gén filogenetikai jellemzése

A filogenetikai vizsgálatokban elsősorban a cpDNS-alapú módszerek terjedtek el, bár egyre gyakrabban használják a nukleáris, egy kópiában előforduló gének elemzését is. Ha az egyes allélokban az intron mérete egyedi és allélonként eltérő, az intronokat határoló konzervatív régiókra tervezett primerekkel amplifikált fragmentumok különböző mérete ideális markert jelent. Közel két évtized óta ezt a technikát használják sikerrel a Rosaceae növény családba tartozó gyümölcsfák önmeddőségét meghatározó genotípus PCR-alapú meghatározására (Sonneveld és mts., 2003).

A *Hippophaë* nemzetségében a *kalkon-szintáz* gén intronmérete ehhez hasonlóan rendkívül nagy variabilitást mutat (Strand és mts., 1997). Bartish és munkatársai (2006) 131 egyedből 81 *Chsi* haplotípust azonosítottak, melyek fragmentumhossza 628 bp és 778 bp között változott. Az általunk szekvenált 13 haplotípus mérete 593 bp és 728 bp közé esett. A 81 európai és kisázsiai haplotípust a filogenetikai analízis 7 csoportba rendezte, földrajzi elhelyezkedésüket térképen ábrázolták (Bartish és mts., 2006). Az újpesti állományban előforduló két allél a II. haplotípus-csoportba került, amelynek tagjai leggyakrabban Nyugat- és Közép-Európában, illetve Romániában fordulnak elő. A 2A út melletti egyed az orosz porzós és a 'Jantarnaja' nevű orosz fajtaival közös, statisztikailag szignifikáns (*bootstrap* érték > 50%) támogatottsággal rendelkező kládot alkotott, mely kládban helyet kaptak a VII. csoportba tartozó *mongolica*, illetve *turkestanica* alfajok haplotípusai is. Ez a filogenetikai mintázat alátámasztja, hogy a 2A út mellé telepített homoktövis feltehetően a hazánkban széles körben termesztett orosz fajták/genotípusok

magvetéssel előállított csemetéje, mely jelentősen különbözik az újpesti állomány genetikai profiljától. Ennek alapján az újpesti állomány homogenitása nem kérdőjelezhető meg.

A 'Frugana' német fajta haplotípusa a jellemzően Németország területén előforduló haplotípuscsoportba került. A török egyedek haplotípusai a keleti és közép-európai területeket összekötő populációkat, több esetben a *caucasica* alfajt reprezentáló I. csoportba tagolódtak. Mindezek újabb bizonyítékát adják filogenetikai analízisünk hitelességének.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A homoktövis (*Hippophae rhamnoides* L.) a jégkorszak után (posztglaciális) egész Európában elterjedt (Bartish és mts., 2006). A jégtakaró visszahúzódásával új, pionír felszíneken tudott megtelepedni. Hazánkban vélhetőleg egykoron jóval elterjedtebb volt, a klíma melegedésével párhuzamosan azonban új fajok érkeztek, így a homoktövis visszaszorulhatott az extrém élőhelyű homoki társulásokba. Magyarországon a homoktövisnek megfelelő környezetet biztosító homoki területek a nagy folyók mentén és a Duna-Tisza közén, az egykori folyómedrek homokos felszínén találhatók. Az antropogén hatások – folyószabályozások, építkezések – miatt azonban egyre kevesebb élőhely maradt fenn, míg a feltételezések szerinti egyetlen őshonos területe a Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Terület maradt (Gadó, 1999). Kun (1998) definíciója szerint *„reliktumnak egy adott földrajzi régióban az a növényfaj-, vagy egy növényfajnak azon populációja tekinthető, amely egy korábbi klimatikus-erdőtörténeti fázis zonális, illetve az annak megfelelő intrazonális vegetációjának faja volt. A reliktum populációk általában a faj zárt áreahatárán kívül exklavékban, az ún refúgiumokban találhatók meg.”* E szerint a definíció szerint az újpesti populációt a diszjunkt area maradványpopulációjának tekinthetjük.

A területen található populáció eszmei értékét és lehetséges veszélyforrásokat figyelembe véve érdemes lenne megfontolni a növényanyag *ex situ* megőrzést genetikailag reprezentatív állomány fenntartásával, tanulmányozásával és szaporításával. A természetvédelemben a biológiai sokféleség megőrzése érdekében a jogi szabályozás jellemzően kétirányú: a veszélyeztetett fajok fennmaradását egyrészt a fajok egyedeinek védelmével, másrészt a faj élőhelyeinek védelmével, vagyis területi alapon igyekszik elősegíteni. Utóbbi adott fajok védelmén túl életközösségek megőrzésére is alkalmas, ami azért is fontos, mert a veszélyeztetettség nyilvánvalóan nem csak faji, hanem jellemzően életközösségi szinten is jelentkezik (Isépy és mts., 2013).

Eredményeink alapján egyértelmű, hogy a terület rehabilitációjának folytatása és értékmegőrzése mindenképpen aktuális feladat. A jövőben feltétlenül érdemes lenne a termések beltartalmi értékeinek vizsgálatát is elvégezni.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A homoktövis (*Hippophaë rhamnoides* L.) kertészeti felhasználhatósága sokrétű: gyümölcstermőnővényként, gyógynővényként, dísnővényként és talajjavító növényként egyaránt ismert. A megnövekedett igényeknek megfelelően nemesített fajtáit egyre nagyobb területen termesztik, természetes állományai egyre nagyobb figyelmet kapnak.

Homoktövisfajták esetében eddig még nem közöltek molekuláris markerezésen alapuló adatokat. Az eddigi homoktövisfajokra kifejlesztett mikroszatellit markereket felhasználva 13 sikerrel termesztett fajtát vizsgáltunk. A 7 lókuszban összesen 53 allélt azonosítottunk, ez átlagban 7,5 allél lókuszonként. A lókuszok eredményei alapján a kapott fragmentumméretekkkel a 13 fajta mindegyike egyedi DNS-ujjlenyomattal azonosítható volt.

Magyarországon, Budapest egyik legjelentősebb természeti értékeként, Újpesten található az egyedüli őshonos homoktövis-állomány. Célunk a populáció genetikai jellemzése volt a jól működő SSR-markerek, valamint a *kalkon-szintáz* enzimet kódoló gén variabilitása alapján, illetve a populáció egyedeinek ivararány-meghatározása specifikus markerek segítségével. A Hr01 és a Hr02 lókuszokban 3, a Hr03 lókusz esetében 5, Hr06, HrMS12, HrMS003 lókuszokban 2 allélt detektáltunk. A SCAR-marker alapján a termős egyedek aránya a porzósokhoz viszonyítva 1:1,42.

Az SSR-analízis, valamint a szekvenciaadatok egyértelműen bizonyítják, hogy a természetvédelmi állomány teljesen homogén, alacsony genetikai variabilitású. Ez annak köszönhető, hogy az élőhely degradációja és a környezeti stressz növekedése miatt csak néhány toleránsabb növény alapvetően gyökérsarjakkal szaporodott el a területen. Eredményeinket, és a terület erdőtörténeti korszakait figyelembe véve az állomány feltehetően reliktumpopulációnak tekinthető.

Ennek tükrében a terület rehabilitációjának folytatása és értékmegőrzése mindenképpen aktuális feladat, mivel a homoktövis hazai természetes előfordulása rendkívüli botanikai értéket képvisel, melynek megóvása kiemelt cél kell, hogy legyen.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek **Dr. Halász Júliának** a dolgozat megírásához, és a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségét és hasznos tanácsait, valamint az irántam tanúsított végtelen türelmét.

Szeretném megköszönni **Dr. Höhn Mária** (Növényteni Tanszék) rendkívül értékes ötleteit és tanácsait.

Külön köszönöm **Benyóné Dr. György Zsuzsanna**, **Chikhi Melisa**, és **Hermán Rita** segítségét a labormunka során, **Dr. Hegedűs Attila** segítségét az eredmények kiértékelésében.

Hálával tartozom **Dr. Pedryc Andrzejnek**, a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszék vezetőjének, hogy megadta a lehetőséget a munkánkhoz.

A növényanyag rendelkezésünkre bocsátásáért szeretném köszönetemet kifejezni **Pető Katalin** és **Karádi Péter** termesztőknek, valamint **Sezai Ercisli** és **Rácz-Szabó Róbert** segítségét.

10.MELLÉKLET

1. melléklet A Budapest Főváros Önkormányzata Főpolgármesteri Hivatal Városüzemeltetési Osztálya által kiállított okirat, amely engedélyezi az Újpesti Homoktövis Természetvédelmi Területről való levélgyűjtést



Budapest Főváros Önkormányzata
Főpolgármesteri Hivatal

Városüzemeltetési Főosztály



7700063300353

Dr. Halász Júlia
egyetemi docens
részére

Budapest Corvinus Egyetem
Kertészettudományi Kar
Genetika és Növénytermesztés Tanszék
1118 Budapest
Villányi út 29-43.

ikt. szám: FPH061/4239 - 4 /2013

hiv. szám: -

üggyintéző: Tóth Eszter

telefon: +36 1 999-9238

e-mail: totheszter@budapest.hu

tárgy: Engedély homoktövis növényi
minták gyűjtésére

HATÁROZAT

Budapest Főváros Önkormányzat Főpolgármesteri Hivatalának főjegyzője, mint elsőfokú természetvédelmi hatóság a Budapest Corvinus Egyetem (székhely: 1118 Budapest, Villányi út 29-43., képviseli: Dr. Halász Júlia egyetemi docens), mint Engedélyes által benyújtott kérelmének természetvédelmi szempontból

helyt adok, és engedélyezem

a Budapest IV. kerület „Újpesti homoktövis természetvédelmi területen” a védett homoktövis (*Hippophaë rhamnoides*) leveleinek gyűjtését, valamint Dr. Halász Júlia egyetemi docens kutatási munkájához kísérletek elvégzését az alábbi **feltételekkel**:

- a védett növény leveleinek a gyűjtése az engedélykérelemben leírt kutatási területen belül történhet;
- növényegyenként 3-4 levél gyűjtése megengedett;
- a területen élő állatok, fészkelő madarak zavarása, illetve a természetvédelmi területen található növényzet, élettelen környezet károsítása tilos;
- a védett természeti területen a zajkeltés az élővilág nyugalmanak és viszonylagos háborítatlanságának érdekében tilos;
- jelen határozat nem pótolja más hatóság, szakhatóság engedélyét vagy tulajdonosi hozzájárulását.

Jelen engedély visszavonásig, de legfeljebb 2013. szeptember 30-ig érvényes.

Az Engedélyes teljes személyes illetékmentességben részesül.

Jelen határozatom ellen a kézhezvételtől számított 15 napon belül a Főpolgármesteri Hivatal Városüzemeltetési Főosztályához benyújtott, a Budapest Főváros Kormányhivatalának (1056 Budapest, Váci u. 62-64.) címzett illetékmentes fellebbezéssel lehet élni.

Indokolás

A Budapest Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kara kérelmezte Budapest IV. kerületében található „Újpesti homoktövis természetvédelmi területen” a védett homoktövis (*Hippophaë rhamnoides*) levelének gyűjtésének engedélyezését kutatás és kísérletek elvégzésének céljából.

Az Újpesti homoktövis természetvédelmi terület, a Budapest helyi jelentőségű védett természeti területeiről szóló 25/2013. (IV. 18.) Főv. Kgy. rendelet 7. § 8. pontja értelmében természetvédelmi terület, a kérelmezett tevékenység engedélyköteles. Hatóságom megállapította, hogy a levélgyűjtés a meghatározott mennyiségben és az előírt feltételek teljesítése mellett természetvédelmi érdeket nem sért.

Hatáskörömet és illetékességemet a természet védelméről szóló 1996. évi LIII. törvény 38. § (1) bekezdésének a) pontja és a környezetvédelmi, természetvédelmi, vízügyi hatósági és igazgatási feladatokat ellátó szervek kijelöléséről szóló 347/2006. (XII. 23.) Kormányrendelet 15. § (1) bekezdése alapozza meg. Határozatomat a közigazgatási hatósági eljárás és szolgáltatás általános szabályairól szóló 2004. évi CXL. törvény (a továbbiakban: Ket.) 71. § (1) bekezdése és a 72. § (1) bekezdése alapján hoztam meg.

A fellebbezési lehetőséget a Ket. 98. § (1) bekezdése, valamint a 99. § (1) bekezdés alapján biztosítottam. A fellebbezést elektronikus úton nem lehet benyújtani.

A teljes személyes illetékmentességet az illetékekről szóló 1990. évi XCIII. törvény 5. § (1) bekezdés c) pontja alapján állapítottam meg.

A Tvt. 76. § (1) bekezdés értelmében az ügyintézési határidő természetvédelmi hatósági engedélyezési eljárásokban három hónap, melynek utolsó napja: 2013. november 2.

Budapest, 2013. augusztus 14.

Sáradi Kálmán dr.
főjegyző nevében és megbízásából

Dr. Horváth Béla Ph.D.
főosztályvezető

TÉRTIVEVÉNYES!

11. 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. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403-410.
3. Bartish, I. V., Jeppsson, N., Nybom, H. (1999): Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 8, 791-802.
4. Bartish, I. V., Jeppsson, N., Bartish, G. I., Lu, R., Nybom, H. (2000): Inter- and intraspecific genetic variation in *Hippophae* (Elaeagnaceae) investigated by RAPD markers. *Plant. Syst. Evol.*, 225, 85-101.
5. Bartish, I. V., Jeppsson, N., Nybom, H., Swenson, U. (2002): Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology. *Syst. Bot.*, 27, 41-54.
6. Bartish, I. V., Kadereit, J. W., Comes, H. P. (2006): Late Quaternary history of *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) inferred from chalcone synthase intron (*Chsi*) sequences and chloroplast DNA variation. *Mol. Ecol.*, 15, 4065-4083.
7. Borzan, Z. S., Schlarbaum, E. (1997): Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Proc. 1st meeting, IUFRO Cytogenetics W.P., Brijuni, Fac, Forestry, Zagreb.
8. Cachi, A. M., Wünsch, A. (2014): S-genotyping of sweet cherry varieties from Spain and S-locus diversity in Europe. *Euphytica*, 197(2), 229-236.
9. Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., Frare, E., Vignani, R., Cresti, M., Morgante, M., Pezzotti, M., Pe, E., Policriti, A., Testolin, R. (2010): The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theor. Appl. Genet.*, 121(8), 1569-1585.
10. Chawla, A., Kant, A., Stobdan, T., Srivastava, R. B., Chauhan, R. S. (2014): Cross-species application of sex linked markers in *H. salicifolia* and *H. tibetana*. *Sci. Hortic. - Amsterdam*, 17, 281-283.
11. Chen, W., Su, X., Zhang, H., Sun, K., Ma, R., Chen, X. (2010): High genetic differentiation of *Hippophae rhamnoides* ssp. *yunnanensis* (Elaeagnaceae), a plant endemic to the Qinghai-Tibet Plateau. *Biochem. J. Genet.*, 48(7-8), 565-576.
12. de Jong, T. J., van der Meijden, E. (2004): Sex Ratio of Some Long-Lived Dioecious Plants in a Sand Dune Area. *Plant Biology*, 6, 616-620.
13. Eccleston, C., Baoru, Y., Tahvonen, R., Kallio, H., Rimbach, G. H., Minihane, A. M. (2002): Effects of an antioxidant-rich juice (sea buckthorn) on risk factors for coronary heart disease in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 346-354.
14. Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.*, 5, 435-445.
15. Ercisli, S., Orhan, E., Yildirim, N., Agar, G. (2008): Comparison of sea buckthorn genotypes (*Hippophae rhamnoides* L.) based on RAPD and FAME data. *Turk. J. Agri.*, 32, 363-368.
16. Földesi D. (2000): *Hippophaë rhamnoides* – homoktövis In: Gyógy- és aromanövények (szerk: Bernáth J.), Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 350-354.

17. Grover, A., Sharma, P. C. (2004): Occurrence of simple sequence repeats in potato ests is not random: an in silico study on distribution and length of simple sequence repeats. *Potato Journal*, 31,3-4.
18. Grover, A., Aishwarya, V., Sharma, P. C. (2007): Biased distribution of microsatellite motifs in the rice genome. *Mol. Genet. Genomics*, 277, 469-480.
19. Grover, A., Sharma, P. C. (2011): Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? *Curr. Sci.* 100, 859-869.
20. Halász, J., Fodor, A., Hegedűs, A., Pedryc, A. (2008): Identification of a new self-incompatibility allele (S₃₁) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Sci. Hortic. – Amsterdam*, 116, 448-451.
21. Huxley, A. (1992). The new RHS dictionary of gardening. Portland: MacMillan Press
22. Isépy, I., Mihalik, E., Orlóci, L., Papp, L., Radvánszky, A., Zsigmond, V. (2013): Ex situ növénymegőrzés – Gyűjteményes kertek a növényvilág megőrzésért. Magyar Arborétumok és Botanikus Kertek Szövetsége.
23. Jain, A., Ghangal, R., Grover, A., Raghuvanshi, S., Sharma, P. C. (2010): Development of EST-based new SSR markers in seabuckthorn. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 16, 375-378.
24. Jain, A., Chaudhary, S., Sharma, P. C. (2014): Mining of microsatellites using next generation sequencing of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 20(1), 115-123.
25. Jia, D. R., Abbott, R. J., Liu, T. L., Mao, K. S., Bartish I. V., Liu J. Q. (2012): Out of the Qinghai-Tibet Plateau: evidence for the origin and dispersal of Eurasian temperate plants from a phylogeographic study of *Hippophae rhamnoides* (Eleagnaceae). *New Phytol.*, 194, 1123-1133.
26. Kalia, R. K., Singh, R., Rai, M. K., Mishra, G. P., Singh, S. R., Dhawan, A. K. (2011a): Biotechnological interventions in sea buckthorn (*Hippophae* L.): current status and future prospects. *Trees*, 25(4), 559-575.
27. Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K. (2011b): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177, 309-33.
28. Katti, M. V., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S. (2001): Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1161-1167.
29. Gadó, Gy. P., (1999): Homoktövis (*Hippophae rhamnoides*). *Tilia*, VII, 269-277.
30. Gadó, Gy. P., Kerényi-Nagy, V. (2012): Közönséges homoktövis In: Magyarország ritka fa- és cserjefajainak atlasza (szerk.: Kadlecovits G.), Kossuth Kiadó Zrt., Budapest. pp. 236-240.
31. Kerti, B. G., Hidvégi, N., Gulyás, A. S., Kiss, E. (2014): A homoktövis (*Hippophae rhamnoides*.) porzós és termős egyedeinek genotípus azonosítása. In: Növénynemesítés a megújuló mezőgazdaságban (A XX. Növénynemesítési Tudományos Nap proceedings-kötete) (szerk: Veisz O.), MTA Agrártudományok Osztályának Növénynemesítési Tudományos Bizottsága, pp. 225-229.
32. Király, G. (2009): Új magyar fűvészkönyv I-II. - Magyarország hajtásos növényei. (szerk.: Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság)
33. Korekar, G., Sharma, R. K., Kumar, R., Meenu, Bisht, N. C., Srivastava, R. B., Ahuja, P. S., Stobdan, T. (2012): Identification and validation of sex-linked SCAR markers in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Eleagnaceae). *Biotechnol Lett*, 34, 973-978.

34. Kun, A. (1998): Gondolatok a reliktum kérdésről (Kontinentális reliktumjellegű vegetációmozaikok a Magyar Középhegységben). In: Sziklagyepek szünbotanikai kutatása (szerk: Csontos, P.), Scientia Kiadó, Budapest. pp. 197-212.
35. Lendvay, B., Kohut, E., Höhn, M. (2013a): A Jósika-orgona – *Syringa josikaea* Jacq. fil. ex Rchb. történeti és aktuális előfordulása, a populációk élőhelyi és természetvédelmi jellemzése. *Kanitzia* 19, 27–58.
36. Lendvay, B., Pedryc, A., Höhn, M. (2013b): Characterization of nuclear microsatellite markers for the narrow endemic *Syringa josikaea* Jacq. fil. ex Rchb. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41, 301–305.
37. Li, C., Xu, G., Zang, R., Korpelainen, H., Berninger, F. (2007): Sex-related differences in leaf morphological and physiological responses in *Hippophae rhamnoides* along an altitudinal gradient. *Tree Physiol.*, 27, 399–406.
38. Li, T. S. C., Schroeder, W. R. (1996): Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A Multipurpose Plant. *Hort. Tech.*, 6(4), 370-380.
39. Litt, M., Luty, J.A. (1989): A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle. *Actin Gene. Am. J. Hum. Genet.*, 44, 397-401.
40. Massei, G., Watkins, R., Hartley, S. E., (2006): Sex-related growth and secondary compounds in *Juniperus oxycedrus macrocarpa*. *Acta Oecol.*, 29, 135-140.
41. Mátyás, Cs. (2002): A környezetet terhelő antropogén hatások lehetséges genetikai következményei In: Erdészeti-természetvédelmi genetika (szerk: Mátyás, Cs), Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 255-260.
42. Ming, R., Wang, J., Moore, P. H., Patserson, A. H. (2007): Sex chromosomes in flowering plants. *Am. J. Bot.*, 94, 141-150.
43. Persson, H. A., Nybom, H. (1998): Genetic sex determination and RAPD marker segregation in the dioecious species sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Hereditas*, 129, 45-51.
44. Porpáczy, A. (1997): Homoktövis. In: Integrált gyümölcstermesztés (szerk: Soltész, M.), Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp 789-793.
45. Porpáczy, A. (2002): Homoktövis In: Fajtatársítás a gyümölcstüvelvényben (szerk: Nyéki, K., Soltész, M., Szabó, Z.), Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 354.
46. Rana, R., Shirkot, P. (2012): Relationship between morphological descriptors and RAPD markers for assessing variability in *Hippophae rhamnoides* L. *For. Stud. China* 14(2), 137-144.
47. Renner, S. S., Ricklefs, R. E. (1995): Dioecy and its correlations in the flowering plants. *Am. J. Bot.*, 82, 596-606.
48. Roorkiwal, M., Sharma, P. C. (2011): Mining functional microsatellite in legume unigenes. *Bioinformation*, 7, 264-270.
49. Rousi, A. (1965): Observation on the cytology and variation of European and Asiatic populations of *Hippophae rhamnoides*. *Ann. Bot. Fenn.*, 2, 1-18.
50. Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C. L., Van de Weg, W. E., Van Kaauwen, M. P. W., Walser, M., Kodde, L. P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C. E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C., Patocchi, A. (2006): Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet. Genomes*, 2(4), 202-224.
51. Sharma, A., Zinta, G., Rana, S., Shirkot, P. (2010): Molecular identification of sex in *Hippophae rhamnoides* L. using isoenzyme and RAPD markers. *For. Stud. China*, 12(2), 62-66.

52. Sheng, H. M., An, L. Z., Chen, T., Xu, S. J., Lu, G. X., Zheng, X. L., Pu, L. L., Lu, Y. J., Lian, Y. S. (2006): Analysis of genetic diversity and relationships among and within species of *Hippophae* (Elaeagnaceae) based on RAPD markers. *Plant Syst. Evol.*, 260, 25-37.
53. Singh, V. (2008): Sea buckthorn (*Hippophae* L.): a multipurpose wonder plant, vol 3, Advances in research and development. Daya publishing house, Delhi, pp 566.
54. Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor. Appl. Genet.*, 107(6), 1059-1070.
55. Soó Rezső (1966): A magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve II., Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 397.
56. Strand, A. E., Leebens-Mack, J., Milligan, B. G. (1997): Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Mol. Ecol.*, 6, 113–118
57. Sun, K., Chen, X., Ma, R., Li, C., Wang, Q., Ge, S. (2002): Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. *Plant. Syst. Evol.*, 235, 121-134.
58. Swenson, U., Bartish, I. V. (2003): Taxonomic synopsis of *Hippophae* (Elaeagnaceae). *Nord. J. Bot.*, 22, 369-374.
59. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2, 2731-2739.
60. Thompson, J. D., Higgins, D. G, Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22 (22), 4673-4680.
61. Triverdi, S. (2004): Microsatellites (SSRs): puzzles within puzzle. *Indian J. Biotechnol.*, 3, 331-347.
62. Varga, L., Kovács, Sz. (2001): Homoktövis In: Gyümölcsészet (szerk: G. Tóth, M.), Primom Sz-Sz-B. Megyei Vállalkozásélénkítő Alapítvány Vállalkozói Központ, Nyíregyháza. pp.
63. Vétek G. (2005): Újpest különleges természeti értéke a homoktövis és élőhelye. In: Az Újpesti Városvédő Egyesület Története (szerk.: Kadlecovits G.), Újpesti Városvédő Egyesület, Budapest. pp. 155–174.
64. Wang, A., Zhang, Q., Wan, D., Liu, J. (2008): Nine microsatellite DNA primers for *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae). *Conserv. Genet.*, 9, 969-971.
65. Weber, J. L., May, P. E. (1989): Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 388-396.
66. www.mme.hu
67. www.termeszetvedelem.hu