

Feketenyár (*Populus nigra*) gametoklónok mikroszatellita változatossága; (ttctgg)₈ deléció a WPMS-20 lokuszon

Bitsánszky András^{1,2,3} – Gyulai Gábor² –
Kiss József² – Gullner Gábor¹ – Heszky László² –
Kőmíves Tamás¹

¹MTA Növényvédelmi Kutató Intézete, Budapest

²Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

³University of South Carolina, Department of Biological Sciences,
Columbia, USA

bittsanzky.andras@mkk.szie.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A nyárfajok (*Populus ssp*) extrém kis méretű genomja ($2n=4\times=38$; 5.5×10^8 bp; $2C=1.1$ pg) nagyfokú genetikai stabilitással párosul. Munkánk célja a feketenyár (*Populus nigra*) genetikai variabilitásának növelése volt haploid (n) indukció alkalmazásával, portoktenyészetben, két portok-donor klón (N-SL és N-309) alkalmazásával. A felnevelt haploid utódok (1-35) genetikai polimorfizmus elemzését öt SSR lokusz allél diverzitásával jellemeztük. Összesen 20 SSR allél 280 szekvenciáját azonosítottuk, egy-egy lokuszon 1-6 allélgyakorisággal: WPMS-02 (5 allél), WPMS-04 (6 allél), WPMS-06 (2 allél), WPMS-20 (6 allél) és PTR-04 (1 allél). Az elemzést ALF (automatic laser fluorometer) módszerrel végeztük. A WPMS-20 allél szekvencia elemzésével egy 5-szörös (TTCTGG)₈ deléciót mutattunk ki a (TTCTGG)₈ lokuszon. Az SSR allélek léte, illetve nemléte alapján dendrogramot készítettünk, amely alapján elemeztük és meghatároztuk az új nemesítésű klónok genetikai diverzitását. Az új SSR-klóntípusok jelentős nemesítési alapanyagot szolgáltatnak a nyárfanemesítés számára.

Kulcsszavak: SSR, SNP, inszerció – deléció, nyárfa

SUMMARY

Genetic variation of somatic clones (1 to 35) of black poplar (*Populus nigra*) developed from two anther-donor trees N-SL and N-309 was determined by five SSR primer pairs. Twenty SSR alleles were detected, the number of alleles per marker ranged from 1 to 6, with an average of 3.3 including WPMS-2 (5 alleles), WPMS-4 (6 alleles), WPMS-6 (2 alleles), WPMS-20 (6 alleles) and PTR-4 (1 allele) detected by ALF (automatic laser fluorometer). A dendrogram produced by SPSS11 based on the presence versus absence of SSR alleles discriminated the groups of somatic clones of N-SL from somatic clones of N-309. The polymorphic markers of WPMS-2 (5 alleles), WPMS-4 (6 alleles) and WPMS-20 (6 alleles) revealed clonal variation in 1 clone (37) out of the 6 from the N-309 tree, and three subgroups out of the 29 somatic clones from the N-SL tree (17 and 24), (2 and 14) and (10 and 15). The remaining 23 of the 29 N-SL somatic clones with uniform genetic similarity suggests a good degree of genetic stability in black poplar. Nevertheless, the new SSR-clones may provide useful new genetic resources for poplar breeding.

Keywords: SSR, SNP, indels, *Populus*

BEVEZETÉS

A feketenyár (*Populus nigra*) hazánk őshonos fafaja. Elsősorban a Maros folyó mentén, ártereken, időszakos vízborítottságú réti-, illetve lápi talajok, valamint tápanyagban gazdagabb homok- és vályogtalajokon díszlik legjobban. Magassági növekedése meghaladja az 1 m/év értéket (Gencsi és Vancsura, 1992). Száraz homoktalajokon csak akkor növekszik kielégítően, ha gyökerei elérik a talajvizet. Rövid ideig a pangó vizet is eltűri, kötött talajra azonban nem való. A nemesnyárok egyik szülőfaja. Hazája Közép- és Dél-Európa, mára már a többi kontinensen is elterjedt. A szélsőségeket jól tűrő fafaj, a nagy meleget, nagy hideget elviseli. Rendkívül fényigényes. Kérge fiatalon világosszürke, korán és mély barázdákban repedezik. A törzs alsó részén gyakran a dúsan elágazó oldalrügyek halmozódásából csomorok képződnek (csomoros nyár), míg a fiatalabb ágak kérgén sok 1-2 cm-es nagyságú fekete paraszemölcs látható. Rügyei sárgásbarnák, fénylők, orsó alakúak, hosszan kihegyesedők, ragadósak, hajtáshoz simulók. Levelei a hosszú hajtásokon háromszög alakúak, hirtelen kihegyesedő csúcsúak, 5-10 cm hosszúak, a levelek széle ívesen fűrészelt, porcosan mirigyes. A rövid hajtások levelei kisebbek, rombusz alakúak, a levelek felszíne fénylő, sötétzöld, fonákjuk világosabb zöld, kiálló erekkel. A levélnyel oldalt összenyomott, a középérrel együtt vöröslik. Lombfakadás előtt, március közepén virágozik, a rügyek gyantája gyógyhatású (ez adta a kelta Artur Király sebeire a gyógyírt – a mai Sheraton-pipere). A termős füzérek 10-16 cm hosszúak, sárgák, a porzós barkák 12-30 cm hosszúak, 4-6 cm hosszúak, bíborpirosak. Toktermése apró tojásdadok, két kopáccsal kovadnak. Magjai 1-2 mm hosszúak, szürkés színűek. Évente jól terem. Növekedése nagyon gyors és 30-40 évig erőteljes. Elérheti a 35-40 m-es magasságot, és a 2-3 m-es vastagságot. Sarjadzóképesége tuskóról és gyökérről egyaránt jó. Fája egyenletes szövetű, sárgásfehér szíjácsa széles, gesztje világos szürkésbarna. Felhasználása széles körű, jól faragható, teknők és vályúk készítésére. Értékes hámozási anyagot ad, így felhasználható gyufagyártásra és cellulózyártásra.

A csomoros törzseket az asztalosipar kedvelik. A génmegőrzési programok kiemelt faja, mert Magyarországon a fekete nyárat nagy mértékű genetikai szennyezés (átporzásos klónok felszaporodása, ld pl. a későn fakadó nyárt *Populus × euramericana*, amely a feketenyár – termős – és az amerikai *Populus deltoides* – beporzó – természetes hibridje, amely a 18. század közepe táján jöhetett létre) tette szükségessé a tiszta vonalú feketenyár-egyedek felkutatását, összegyűjtését és szintetikus állományokban való elhelyezését (Mátyás, 2006; Kevey, 1999).

A feketenyár rendszertani vonatkozásai: A legelfogadottabb rendszertani besorolás szerint (Eckenwalder, 1996) a *Populus* nemzetség 29 faja 6 szekcióra oszlik: *Abaso*, *Aigeiros*, *Leucoides*, *Populus*, *Tacamahaca*, *Turanga*. Ezek a morfológiai szekciók azonban folyamatosan módosulnak az újabb molekuláris genetikai eredmények megjelenésével, pl. a feketenyár az *Aigeiros* szekció tagja, de hibridizációs hajlama közel áll a *Tacamahaca* fajaihoz. A *P. nigra* cpDNA RFLP elemzésben a *Populus* szekció fajaihoz mutatja a legközelebbi rokonságot, azonban a nukleáris RFLP mintázata szerint a *Populus* szekció fajaihoz áll közelebb, amely eredmény feltételezi, hogy *P. nigra* már egy ősi hibrid faj, amely egy hálózatos evolúción keresztül alakult ki (Smith és Sytsma, 1990).

Populus fajok legújabb kloroplaszt-genom alapú rendszerében három csoport különül el: (1) *P. simonii*, *P. maximowiczii*, *P. laurifolia*, *P. songarica*; (2) *P. grandidentata*, *P. alba*, *P. davidiana*, *P. tremula*, *P. tremuloides*, és *P. nigra*; és a (3) *P. angustifolia*, *P. cathayana*, *P. trichocarpa*, *P. balsamifera*, *P. szechuanica*, *P. tristis*, *P. fremontii*, *P. roegneriana*, *P. angulata*, *P. deltoides*, *P. sargentii* fajokkal (Hamzeh és Dayanandan, 2004).

Az alkalmazott mikroszatellita (SSR) allélpolimorfizmus érzékeny marker rendszer, amelynek segítségével megbízhatóan azonosítható a klónok genetikai azonossága, és klonális variabilitása (Rahman és Rajora, 2001; Cervera et al., 2001). A genom mikroszatellita szakaszaiban az ismétlődő belső szekvencia 1-5 nt hosszúságú mono- (A)_n, di- (AT)_n, tri- (ATC)_n, tetra (AGTC)_n és pentamer (AGTCT)_n felépítésű. Ezek az alapszekvenciák

10-80 egymás utáni kópiaszámmal (*tandemszám*), megközelítően 100 bp végső hosszúságban fordulnak elő a genomban egy fajspecifikus (Röder et al., 1998) 18-28 bp hosszúságú 5' és 3' irányból is lezáró határoló szekvenciával. Az SSR allél mintázat kodominánsan öröklődik (Gyulai et al., 2005). A mikroszatelliták szekvenciájuk alapján két csoportra különíthetők, az egyszerű (*perfect*) SSR-ok, pl. (ATG)₁₀; és az összetett (*imperfect*) SSR-ok, melynek két típusa, a megszakított, pl. (AT)₁₀CACA(AT)₆, és az összetett (*compound*) SSR, pl. (AT)₁₀(CA)₁₀. A mikroszatellita szakaszok gyakorisága eltér a növényekben és az állatokban. A növényi genomban ötször kevesebb SSR található, mint az állatokban; pl. egy közel 20 bp hosszú SSR, amely az emberi genomban 6 kbp-ként fordul elő, a *Brassica* fajokban csak 19 kbp-ként található (Lagercrantz et al., 1993). A növényi genom legelterjedtebb dinukleotid SSR szekvenciája az AA/TT motívum, ennél kevesebbszer fordul elő az AT/TA és CT/GA motívum. Ez a három dinukleotid-SSR (átlag 1-6-szoros ismétlődéssel) teheti ki az összes növényi SSR-ok közel 75%-át (Lagercrantz et al., 1993).

Munkánk célja a feketenyár (*Populus nigra*) genetikai variabilitásának növelése és a variabilitás molekuláris szintű kimutatása volt a 35 haploid eredetű feketenyár klónban, valamint a két portok-donor klónban.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag. A feketenyár (*Populus nigra*) mikroszatellita elemzéséhez portok eredetű, szabadföldön nevelt feketenyár (*P. nigra*) klónokat (Kiss et al., 2001) alkalmaztunk, összesen 35 klónt, melyek közül 29 (1-29 klónok) az N-SL klónról származott (30. anyató); 6 klón pedig (31-36) az N-309 (37.) klón utódai (Gyulai et al., 2005; Bittsánszky et al., 2005a, b, 2006; Gullner et al., 2005).

PCR. A PCR reakcióelegy összetétele 25 µl végtérfigatban: 1×puffer (West Team); 1 µM MgCl₂; 1,2 mM dNTP; 1 U Taq polimeráz (West Team), 1-1 µM forward-reverse primer (*I. táblázat*), 50-100 ng templát DNS.

1. táblázat

Az alkalmazott primerek szekvencia adatai az NCBI hivatkozási számokkal

SSR lokusz(1)	Primer-pár(2)	Ismétlődő szekvencia(3)	Irodalom(4)
1 WPMS-02 (AJ297270)	aga aat acc cct gct aat c aat gtt ttt gtt ccg tga at	(GA) ₂₃	Van der Schoot et al., 2000
2 WPMS-04 (AJ297273)	tac acg ggt ctt tta ttc tct tgc cga cat cct gcg ttc c	(GT) ₂₅	Van der Schoot et al., 2000
3 WPMS-06 (AJ297275)	gta taa cga tga ccc cac gaa gac tat aaa taa agg cat gac cag aca	(GT) ₂₄	Van der Schoot et al., 2000
4 WPMS-20 (AJ297293)	gtg cgc aca tct atg act atc g atc ttg taa ttc tcc ggg cat ct	(TTCTGG) ₈	Smulders et al., 2001
5 PTR-4	aat gtc gag gcc ttt cta aat gtc t gct tga gca aca aac aca cca gat g	(TC) ₁₇	Dayanandan et al., 1998

Table 1: Microsatellite primer pairs applied and the NCBI data
SSR loci(1), Primer pairs(2), Core sequences(3), References(4)

A mikroszatellita fragmentek felszaporítása *touchdown* PCR-rel történt (Don et al., 1991), a következő ciklusidőkkel: 1×95 °C/3 perc; 11×95 °C/30 mp – 65 °C/30 mp-től 55 °C/30 mp – 72 °C/1 perc; 25×95 °C/30 mp – 56 °C/30 mp – 72 °C/1 perc; 1×72 °C/5 perc.

ALF-SSR. Az ALF SSR primer párok egyik tagját Cy5 fluoreszcens molekulával jelöltük (Gyulai et al., 2005). A Cy5 abszorpciója 643 nm-en, emissziója 667 nm-en veszi föl a maximális értéket. Az SSR fragmentek szeparálását ALF express II DNA Analyser (automated laser fluorometer) készülékkel ReproGel High Resolution PAGE gél (24%) (Amersham Bioscience) alkalmazásával, rövid thermoplate-en végeztük. A futtatást 850 V-on, 50 mA-el, 50 W teljesítménnyel, 50 °C-on 120 percen keresztül alkalmaztuk. Az adatok feldolgozása ALFwin Fragment Analyser 1.03 szoftverrel történt. A futtatásokhoz Cy5-el jelölt külső és belső molekulatömeg markereket alkalmaztunk standardként (Gyulai et al., 2005).

Szekvencia elemzés. A WPMS-20 primerrel kapott DNS fragmenteket agaróz gélből spin column készlettel (Sigma) visszaizoláltuk, majd szekvenáltuk. A visszakapott szekvencia adatokat BioEdit Sequence Alignment Editor szoftverrel (Hall, 1999) dolgoztuk föl. Hasonlósági adatokat BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programmal (Altschul et al., 1997) kerestünk az NCBI (National Center for Biotechnology Information) honlapján.

Statisztikai feldolgozás. A fragmentek léte/hiánya alapján SPSS 11 programmal klaszter analízisben dendrogramot készítettünk Jaccard (1908) index használatával, csoporton belüli átlagos kapcsolttság (Average Linkage, within group) alkalmazásával. Az egyes lókuszek variabilitását a PIC (Polymorphism Index Content) értékkel jellemeztük a következő képlet szerint $PIC = 1 - \sum_i p_i^n - p_i^n$, ahol p_i az i -edik allél gyakoriságát jelenti (Anderson et al., 1993).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

Az N-SL és N-309 feketenyár klónok elemzését öt SSR primerrel elvégezve összesen 20 SSR allélt azonosítottunk, a következő allélmegoszlásban (2. táblázat): WPMS-02 (5 allél), WPMS-04 (6 allél), WPMS-06 (2 allél), WPMS-20 (6 allél) és PTR-04 (1 allél). Kettő primerpár monomorf mintázatot mutatott egy (194 bp; PTR-04), illetve két (168 és 174 bp, WPMS-06) alléllal.

Az androgenetikus gametoklónok előállítását portok tenyésztésben végeztük, melynek során több nyárfaj különböző fajtáját teszteltük (Kiss et al., 2001). A *P. nigra* három klónja (N-SL, N-309 és Győr-203) mellett, a két *P. deltoides* (D-30, D-40 és D47) és három *P. × euramericana* (I-154, Kopeczky és Koltay) klónjait. A kipreparált porzós virágok összes leoltott portokainak száma 415 340 volt, melyből 32 971 haploid pollen-eredetű haploid kallusztényesztet nyertünk MS-2 táptalajon (Kiss

et al., 2001). A három legaktívabb klón százalékban kifejezett kalluszosodási értékei 10% felett voltak: N-309 (14%), N-SL (13,1%) és a D-30 (11,5%). A hajtás regeneráció során a legjobb értékeket az N-SL (844 klón/MS-2 táptalaj) és az N-309 (690 klón/MS-3 táptalaj) jelű feketenyár klónok adták. A hormonmentes gyökerezető táptalajon a klónoknak 25-30%-a hajtott gyökeret (ellentétben a kontroll tenyészetekkel, ahol a szomatikus levélsejtekből regenerált klónok közel 90%-a gyökerezett meg). A 155 N-SL klón flow citometriás elemzése különböző ploid szintű regeneránsokat mutatott ki: 8 regeneráns haploid (n); 132 regeneráns dihaploid (2n), 4 regeneráns tetraploid (4n) és 11 regeneráns aneuploid volt. Az N-309 klón utódaiban: 36 regeneráns dihaploid (2n), 1 regeneráns tetraploid (4n) és 1 regeneráns aneuploid volt. Az eredményeket a levél fonákepidermisz sztóma zárósejtek kloroplasztisz számának meghatározásával is megerősítettük (Kiss et al., 2001). Vizsgálatainkhoz a legvigorabb 35 dihaploid klónt és a két portok donor klónt választottuk.

Az ALF Express vizsgálat és értékelése alapján az SSR fragmentek léte/hiánya alapján elvégzett klaszter analízisben (SPSS 11) a két portok-donor nyárklón (N-SL, N-309) és utódai külön csoportba rendeződtek (1., 2. ábra). Az öt SSR marker közül három mutatott polimorfizmust (WPMS-02; WPMS-04; WPMS-20). Az N-309 klón-csoporton belül három alcsoport jött létre. A huszonkilenc N-SL klón között 5 klóntípus különült el. Huszonhárom azonos genetikai mintázatot mutatott a kontroll klónnal, külön csoportba került a 17. és 24., valamint a 2. és 14., és egytagú csoportba kerültek a 10. és 15. klónok. A klónoknak összesen 26%-a mutatott genetikai változást. A hat N-309 klón között három klóntípus különült el, négy klón egy csoportba került a kontrollal, és egytagú csoportot alkotnak a 35. és 36., amely változások mértéke 33% volt.

Huszonhárom N-SL klón a kontrollal egyező genotípust mutatott, amely igazolta a feketenyár nagyfokú genetikai stabilitását, melyet a létrehozott SSR-klónok előállításával sikerült feltörni és új nemesítési alapanyagot szolgáltatni a nyárfanemesítés számára.

A szekvencia analízisben a WPMS-20 lókuszon azonosított 253 bp (244 bp) hosszúságú allél szekvencia illesztése során hat nukelotid lokuszon azonosítottunk szubsztitúciót a génbanki AJ297293 számú szekvencia összehasonlításában (3. ábra). Négy esetben tranzícióval történt báziscsere (T↔C vagy G↔A), és két esetben transzverzióval, amely során a purinbázis és pirimidinbázis cserélődött fel. A vizsgált klón (30.) ismétlődő szekvenciamotívuma (TTCTGG)_n 3-szoros, míg a génbanki adatban 8-szoros volt (3. ábra). Az 5-szörös deléció feltételezhetően az *in vitro* haploid kultúra indukciós hatására, illetve a gametoklonális variabilitás eredményeként végbemenő genetikai polimorfizmus indukciójának (Gyulai et al., 2000) a szignifikáns eredménye (4. ábra).

A feketeenyár (*Populus nigra*) gametoklónok mikroszatellita allél diverzitása öt SSR lokusz, húsz allél, 280 szekvenciája alapján

SSR:	Mikroszatellita lokuszok(1)																				
	WPMS2 (GA) ₂₃					WPMS4 (GT) ₂₅					WPMS6 (GT) ₂₄					WPMS20 (TTCTGG) ₈					PTR4 (TC) ₁₇
Ismétlődés(2):	200	214	228	240	244	242	248	256	260	262	286	168	174	225	231	238	244	251	257	194	
allélek (bp)(3):	200-244					242-268					168-174					224-257					194
tartomány (bp)(4):	200-244					242-268					168-174					224-257					194
PIC érték(5):	0,600					0,567					0,500					0,680					0,00
# klónok(6)																					
1. 2N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
2. 4N-SL	200	-	-	240	-	-	248	256	-	-	-	168	174	-	-	-	244	251	-	194	
3. 5N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
4. 6N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
5. 7N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
6. 10N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
7. 14N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
8. 15N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
9. 16N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
10. 17N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	286	168	174	-	231	-	-	251	-	194	
11. 18N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
12. 19N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
13. 20N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
14. 22N-SL	200	-	-	240	-	-	248	256	-	-	-	168	174	-	-	-	244	251	-	194	
15. 23N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	260	-	-	168	174	225	-	-	-	-	-	194	
16. 28N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
17. 41N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	260	-	286	168	174	225	231	-	-	-	-	194	
18. 42N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	286	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
19. 43N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
20. 44N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
21. 45N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
22. 46N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
23. 47N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
24. 49N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	260	-	286	168	174	225	231	-	-	-	-	194	
25. 51N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
26. 54N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
27. 55N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
28. 59N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
29. 60N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
30. C-N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
31. 97N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
32. 98N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
33. 99N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
34. 101N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
35. 102N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
36. 104N-309	200	214	228	-	244	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
37. C-N-309	200	214	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
Összes(7): 280	37	2	7	36	1	7	2	2	3	32	4	37	37	3	3	31	26	3	7	37	

Table 2: Gametoclonal allele diversity in black poplar (*Populus nigra*) at five microsatellite loci
 Microsatellite loci(1), SSR repeats(2), Allele length (bp)(3), SSR length range(4), PIC value(5), Clones(6), Total(7)

1. ábra: Példa a feketenyár (*P. nigra*) gametoklónok (1-37) ALF-SSR alléldiverzitására (225 bp – 257 bp) a WPMS-20 lókuszon. A külső (275 bp, 300 bp) és belső (275 bp) molekulatömeg markerek jelölésével

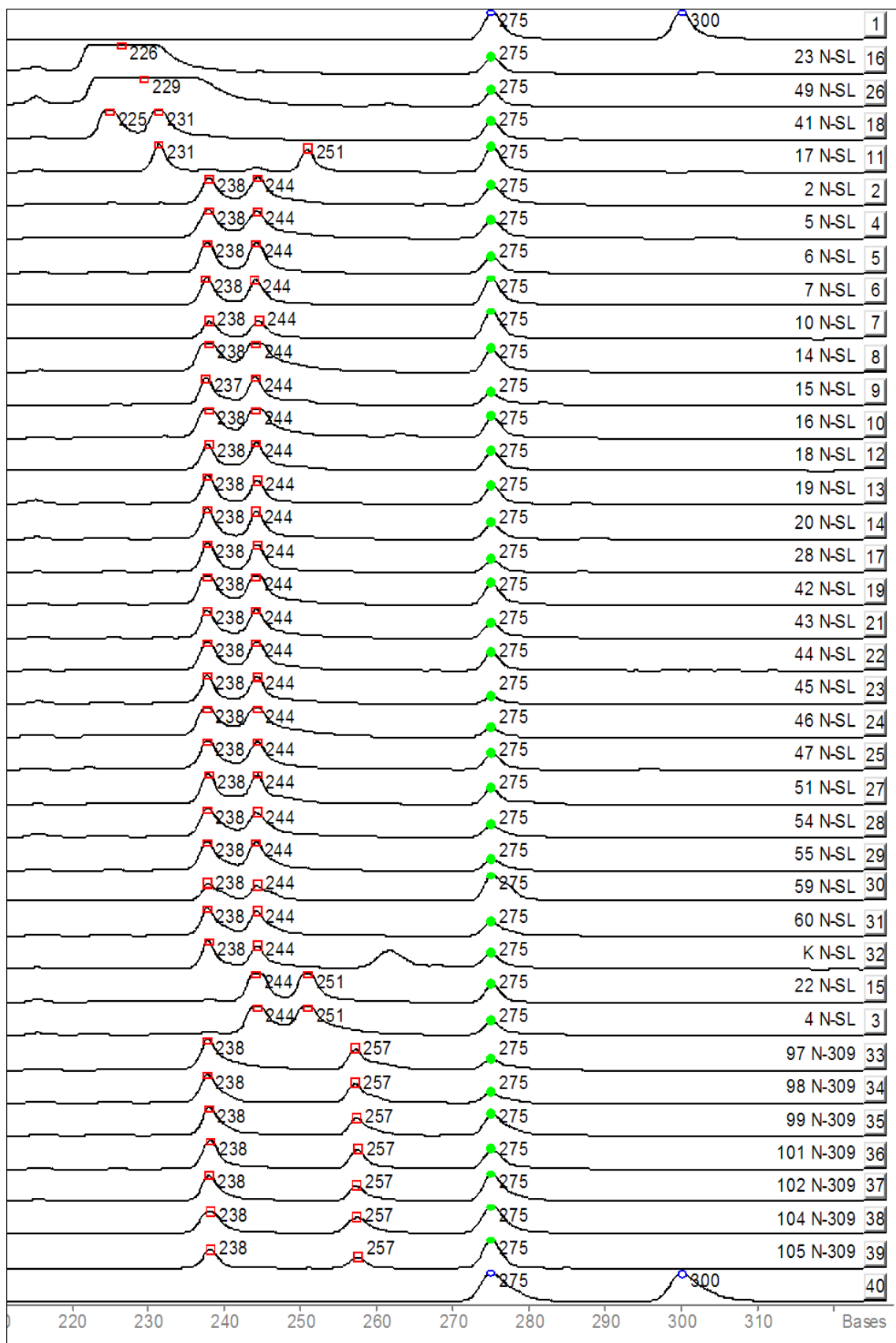


Figure 1: Samples of ALF-SSR fragment diversity (225 bp – 257 bp) at the WPMS20 locus of black polar (*P. nigra*) gametoclones (1-37). The external (275 bp and 300 bp) and internal (275 bp) MW markers are indicated

2. ábra: A feketenyár (*Populus nigra*) gametoklónok (1-37) molekuláris dendrogramja (Rel. G.T. – relatív genetikai távolság)

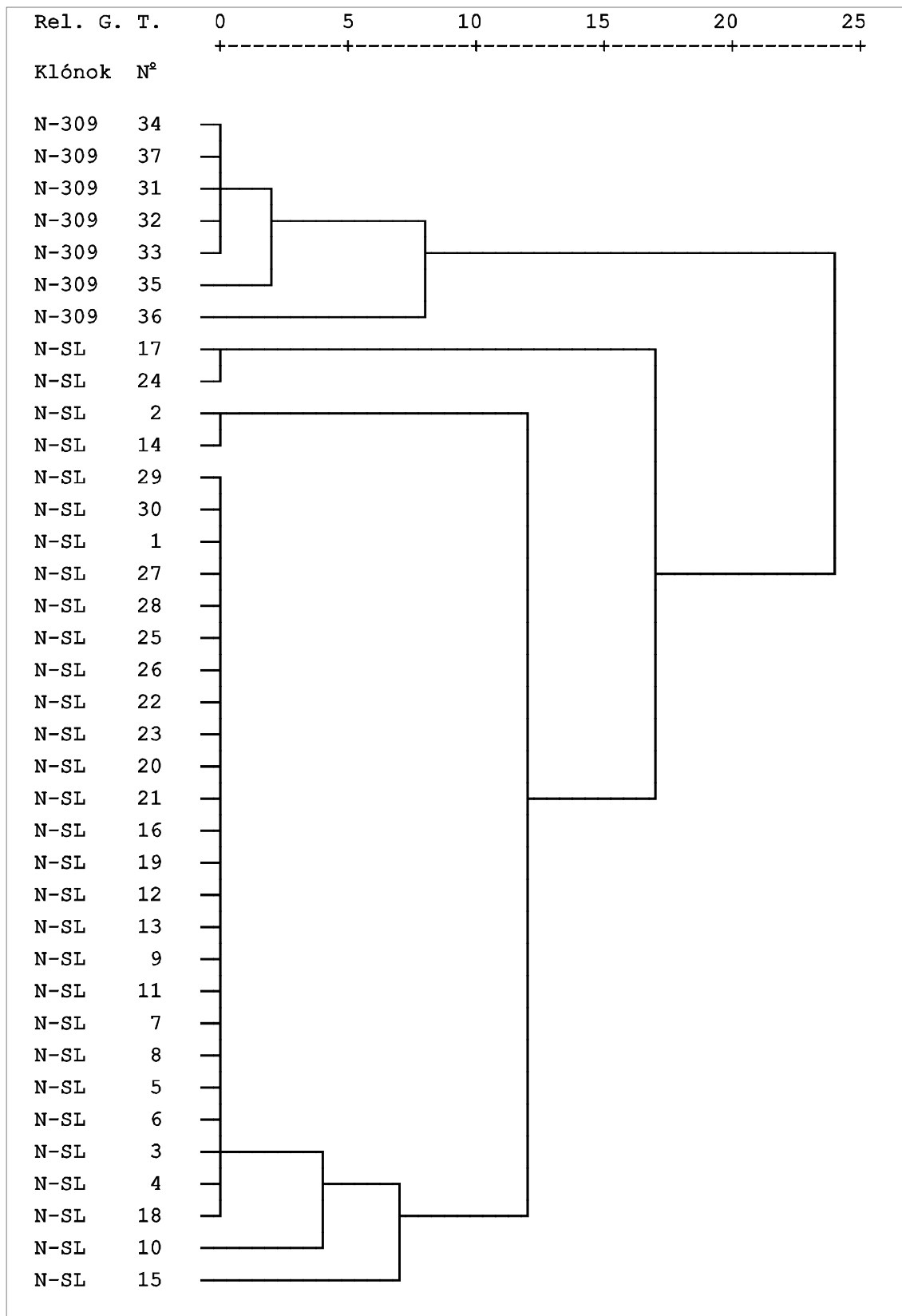


Figure 2: Molecular dendrogram of black poplar (*Populus nigra*) gametoclones (1-37)

3. ábra: Szekvenca elemzés a feketenyár (*Populus nigra*; NS-L-30 klón) a WPMS-20 mikroszatellita lokuszon (TTCTGG)_n a génbanki adat (AJ297293) összehasonlításával

AJ297293	1	GTGCGCACATCTATGACTATCGAAGCCA	G	TGACCCAGTATGTCGTGCTTC	50	
WPMS-20	1	T	50	
AJ297293	51	AATGTGATATGTTTCACAACCAA	C	ATCGTCTTGCTCTGCC	GAAGAATGGTA	100
WPMS-20	51	T	A	100
AJ297293	101	ACCCT	A	GTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGG	156	
WPMS-20	101	G	156	
AJ297293	157	TTTGTACTAGCCA	T	TATTTCTTTTCCATGCGCCAACAAATTTTGG	200	
WPMS-20	157	G	200	
AJ297293	201	TAAATTAATTGATA	A	CTTGAAAGAAGAGAGATGCCCGGAGAATTACAAGAT	253	
WPMS-20	201	G	A	253

Figure 3: Sequence alignment of microsatellite alleles at WPMS-20 loci in black poplar (*Populus nigra*) clone (NS-L. 30) compared to NCBI data (AJ297293)

4. ábra: Az androgenetikus dihaploid feketenyár (*P. nigra*) gametoklónok 1 éves (a) és két éves (b) állományképe (SzIE, Gödöllő)

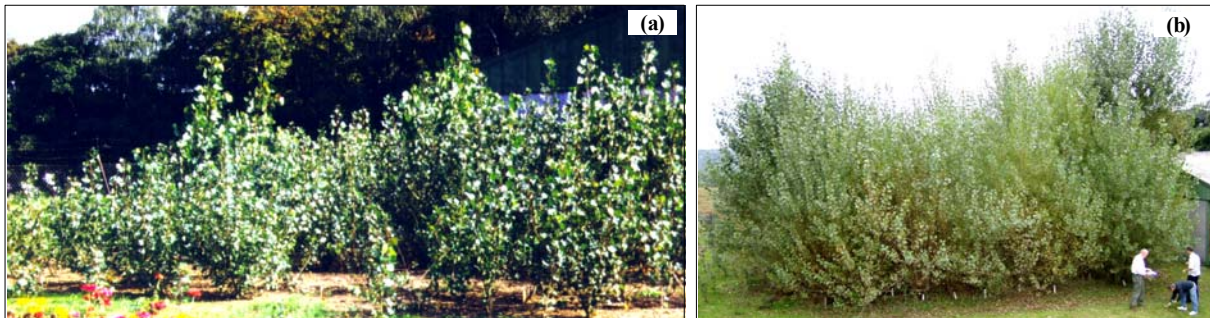


Figure 4: Field performances of poplar (*P. nigra*) gametoclones at the 1st (a) and 2nd year (b)

IRODALOM

- Altschul, S. F.-Madden, T. L.-Schaffer, A. A.-Zhang, J. H.-Zhang, Z.-Miller, W.-Lipmand, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Anderson, J. A.-Churchill, G. A.-Autriques, J. E.-Tanksley, S. D.-Sorrels, M. E. (1993): Optimizing Parental Selection For Genetic-Linkage Maps. *Genome* 36:181-186.
- Bittsánszky, A.-Gyulai, G.-Gullner, G.-Kiss, J.-Csintalan, Zs.-Szabó, Z.-Lágler, R.-Kömíves, T. (2005a): Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus*). *Hung Agric Research* 2005/1:13-15.
- Bittsánszky, A.-Kömíves, T.-Gullner, G.-Gyulai, G.-Kiss, J.-Heszky, L.-Radimsky, L.-Rennenberg, H. (2005b): Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate Zinc (2+) stress. *Environment International* 31:251-254.
- Bittsánszky, A.-Gyulai, G.-Humphreys, M.-Gullner, G.-Csintalan, Zs.-Kiss, J.-Szabó, Z.-Lágler, R.-Tóth, Z.-Rennenberg, H.-Heszky, L.-Kömíves, T. (2006): RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic gsh1-poplar clones (*Populus × canescens*) in response to paraquat exposure. *Z. Naturforschung* 61c:699-730.
- Cervera, M. T.-Storme, V.-Ivens, B.-Gusmao, J.-Liu, B. H.-Hostyn, V.-Van Slycken, J.-Van Montagu, M.-Boerjan, W. (2001): Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.
- Dayanandan, S.-Rajora, O. P.-Bawa, K. S. (1998): Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theoretical and Applied Genetics* 96:950-956.

- Don, R. H.-Cox, P. T.-Wainwright, B. J.-Baker, K.-Mattick, J. S. (1991): Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19:4008-4008.
- Eckenwalder, J. E. (1996): Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler, R. F.-Bradshaw, H. D.-Jr. Heilman, P. E.-Hinckley, T. M. (eds.) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, 7-32. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada
- Gencsi L.-Vancsura R. (1992): *Dendrológia*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 1-728. ISBN 963 81 6008 X
- Gullner, G.-Gyulai, G.-Bittsánszky, A.-Kiss, J.-Heszky, L.-Kömives, T. (2005): Enhanced Inducibility of Glutathione S-Transferase Activity by Paraquat in Poplar Leaf Discs in the Presence of Sucrose. *Phyton* 45:39-44.
- Gyulai, G.-Gémesné, J. A.-Sági, Zs.-Venczel, G.-Pintér, P.-Kristóf, Z.-Törjék, O.-Heszky, L.-Bottka, S.-Kiss, J.-Zatykó, L. (2000): Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J Plant Physiol* 156:168-174.
- Gyulai, G.-Humphreys, M.-Bittsánszky, A.-Sköt, K.-Kiss, J.-Sköt, L.-Gullner, G.-Heywood, S.-Szabó, Z.-Lovatt, A.-Radimsky, L.-Roderick, H.-Abberton, M.-Rennenberg, H.-Kömives, T.-Heszky, L. (2005): AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshI-poplar clones (*Populus canescens* L.) in vitro. *Z. Naturforschung* 60c:300-306.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hamzeh, M.-Dayanandan, S. (2004): Phylogeny of *Populus* (*Salicaceae*) based on nucleotide sequences of chloroplast TRNT-TRNF region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany* 91:1398-1408.
- Jaccard, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44:223-270.
- Kevey B. (1999): Feketenyar-ligetek. Vörös könyv Magyarország növénytársulásairól 2. TermészetBÚVÁR Alapítvány Kiadó, 121-123.
- Kiss, J.-Kondrák, M.-Törjék, O.-Kiss, E.-Gyulai, G.-Mázik-Tőkei, K.-Heszky, L. (2001): Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica* 118:213-221.
- Lagercrantz, U.-Ellegren, H.-Andersson, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-1115.
- Mátyás Cs. (2006): Erdészeti génmegőrzési program: feladatok és megvalósítás. Kézirat. Sopron
- Rahman, M. H.-Rajora, O. P. (2001): Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Reports* 20:531-536.
- Röder, M. S.-Korzun, V.-Wendehake, K.-Plaschke, J.-Tixier, M. H.-Leroy, P.-Ganal, M. W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Smith, R. L.-Sytsma, K. J. (1990): Evolution of *Populus nigra* (sect. *Aigeiros*): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of *Populus alba* (sect. *Populus*). *American Journal of Botany* 77:1176-1187.
- Smulders, M. J. M.-Van der Schoot, J.-Arens, P.-Vosman, B. (2001): Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes* 1:188-190.
- Van der Schoot, J.-Pospikova, M.-Vosman, B.-Smulders, M. J. M. (2000): Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101:317-322.