

Doktori (Ph.D.) értekezés



**A CSERESZNYE S-LÓKUSZÁNAK VARIABILITÁSA A
GÉNCENTRUMBAN**

Szikriszt Bernadett

Kertészettudományi Doktori Iskola

Budapesti Corvinus Egyetem
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest
2012

A Doktori Iskola

Megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
Tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
Vezetője:	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, D.Sc. Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermő Növények Tanszék
Témavezetők:	Dr. Halász Júlia egyetemi docens, Ph.D. Dr. Hegedűs Attila Egyetemi docens, Ph.D. Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános védési eljárásra bocsátható.

.....

Dr. Tóth Magdolna

A doktori iskola vezetőjének jóváhagyása

.....

Dr. Halász Júlia

.....

Dr. Hegedűs Attila

A témavezetők jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2012. évi október 2.-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke:

Tóth Magdolna, D.Sc.

Tagjai:

Palkovics László, D.Sc.

Deák Tamás, Ph. D.

Szani Zsolt, Ph.D.

Janda Tibor, D.Sc.

Opponensek:

Farkas Ágnes, Ph.D.

Bisztray György Dénes, Ph.D.

Titkár:

Deák Tamás, Ph.D.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. Az önmeddőség szerepe a növényvilágban.....	9
2.2. A <i>Prunus</i> fajokat jellemző inkompatibilitási rendszer molekuláris háttere.....	10
2.2.1. A termékenyülésben szerepet játszó molekuláris rendszer bibekomponense: az <i>S</i> -ribonukleáz (<i>S</i> -RN-áz) enzim.....	11
2.2.2. A termékenyülésben szerepet játszó molekuláris rendszer pollenkomponense: az <i>S</i> -haplotípus-specifikus <i>F</i> -box fehérje.....	14
2.2.3. Az <i>S</i> -RN-áz által irányított inkompatibilitási rendszer molekuláris modellje.....	16
2.2.3.1. Az inkompatibilitási rendszer receptor, „gatekeeper” modellje.....	16
2.2.3.2. Az inkompatibilitási rendszer inhibitor modellje.....	16
2.2.3.3. A módosított inhibitor modell.....	17
2.2.3.4. A kompartmentalizációs modell.....	17
2.2.3.5. A 26S proteaszóma rendszer.....	18
2.3. Az <i>S</i> -lókusz kultúrevolúciója.....	19
2.4. Az <i>S</i> -lókusz vizsgálatának módszertani áttekintése.....	20
2.4.1. A termékenyülés vizsgálatának hagyományos módszerei – szabadföldi termékenyülés-vizsgálatok.....	20
2.4.1.1. A cseresznye idegentermékenyülésének szabadföldi vizsgálata.....	21
2.4.1.2. A cseresznye öntermékenyülésének szabadföldi vizsgálata.....	22
2.4.2. Pollentömlő-növekedési vizsgálatok.....	23
2.4.2.1. A pollentömlő útja a bibétől a magházig a <i>Prunus</i> nemzetségben.....	24
2.4.2.2. A pollentömlő növekedésének vizsgálati eszközei.....	25
2.4.3. A fehérje alapú vizsgálatok – az izoelektromos fókuszálás (IEF) és a nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE).....	26
2.4.4. A termékenyülés molekuláris szintű kutatása – a DNS-alapú vizsgálatok.....	26
2.4.4.1. A bibekomponens, azaz az <i>S</i> -RN-áz gén molekuláris vizsgálati technikái.....	27
2.4.4.2. A pollenkomponens, azaz az <i>S</i> -haplotípus-specifikus <i>F</i> -box gén molekuláris vizsgálatának módszere.....	29
2.5. A cseresznye (<i>Prunus avium</i> L.) taxonómiája és származása.....	30
2.6. A cseresznyetermesztés helyzete és a cseresznye felhasználásának lehetőségei.....	33
2.7. A cseresznyenemesítés történeti áttekintése.....	36

2.8. A cseresznye (<i>Prunus avium</i> L.) <i>S</i> -allél rendszere.....	39
2.8.1. A cseresznye öntermékenyülésének kialakulása.....	41
2.9. A törökországi cseresznyefajták jellemzése	43
3. CÉLKITŰZÉS	45
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	46
4.1. Növényanyag	46
4.2. DNS-alapú vizsgálatok.....	46
4.2.1. DNS-kivonás	46
4.2.2. <i>S</i> -PCR analízis.....	46
4.2.3. Allélspecifikus PCR-vizsgálatok.....	47
4.2.4. A PCR-termékek fragmentumhossz-analízise, klónozása, szekvenálása és a szekvenciák vizsgálata	49
4.2.5. A bizonytalan funkciójú <i>S</i> _{7m} - <i>RN-áz</i> allél klónozása és szekvenálása	51
5. EREDMÉNYEK.....	53
5.1. A török cseresznyék <i>S</i> -genotípusának meghatározása konszenzus primerekkel.....	53
5.2. Az <i>S</i> - <i>RN-áz</i> allélok DNS-szekvenciájának meghatározása	59
5.2.1. Vadcsesznye allélok azonosítása.....	59
5.2.2. Egy új cseresznye <i>S</i> - <i>RN-áz</i> allél (<i>S</i> ₃₇) azonosítása és molekuláris jellemzése.....	63
5.2.3. Egy bizonytalan funkciójú <i>S</i> - <i>RN-áz</i> allél (<i>S</i> _{7m}) azonosítása	64
5.2.4. A meggy <i>S</i> ₃₄ - <i>RN-áz</i> allél kimutatása cseresznyében.....	65
5.2.5. Intraallélikus variációk (<i>S</i> ₁ , <i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₄ , <i>S</i> ₆ , <i>S</i> ₁₀ és <i>S</i> ₁₃)	66
5.2.6. Allél-specifikus PCR primerek fejlesztése	66
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	68
6.1. A török cseresznyék <i>S</i> -lókuszának variabilitása	68
6.2. A korábbi <i>S</i> -genotípusok javítása és módszertani fejlesztés	70
6.3. Az <i>S</i> - <i>RN-áz</i> allélok evolúciós kapcsolatai	72
6.4. Géncentrum és kultúrevolúció az <i>S</i> -lókusz tükrében	75
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	79
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	80
9. SUMMARY.....	82
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
MELLÉKLETEK.....	85
M1. IRODALOMJEGYZÉK.....	85

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP	amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus
bp	bázispár
C1–3 és C5	Az <i>S-RN-áz</i> gén 1–3. és 5. konzervatív régiója
cDNS	„copy” DNS, „copy” dezoxiribonukleinsav
D	dalton, relatív molekulatömeg
DNS	dezoxiribonukleinsav
GSI	gametofitikus inkompatibilitás (gametophytic self-incompatibility)
HVa, HVb	A <i>Solanaceae S-RN-ázokra</i> és valamennyi <i>SFB</i> -re jellemző variábilis régiók
IEF	izoelektromos fókuszálás
IPTG	isopropil β -D- thiogalactopyranoside
mRNS	hírvivő RNS
NEpHGE	nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (non-equilibrium pH gradient electrofocusing)
PAL	<i>fenilalanin-ammónia-liáz</i>
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
PP	pollen fehérje
RC4	A <i>Rosaceae S-RN-ázokra</i> jellemző 4. konzervatív régió
RHV	A <i>Rosaceae S-RN-ázokra</i> jellemző hipervariábilis régió
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszomális RNS
RT	reverz transzkripció
SCF	Skp1, Cullin1, Rbx1, F-box fehérje komplex
SFB	<i>S</i> -haplotípus-specifikus F-box protein
SI	inkompatibilitás (self-incompatibility)
SLF	<i>S</i> -lókusz F-box protein
SNP	pontmutáció
SP	szignálpeptid
<i>S-RN-áz</i>	<i>S</i> -ribonukleáz
SSR	mikroszatellit régió
UTR	nem transzlálódó régió
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galaktopyranoside

1. BEVEZETÉS

A gyümölcsstermesztés fejlődése az ökológiai, gazdasági viszonyoknak mind jobban megfelelő fajták előállításával képzelhető el. A fajtaváltáshoz jelentős nemesítési aktivitás szükséges, ami rendkívül hosszú, sok áldozatot követelő folyamat. A korszerű molekuláris módszerek e folyamat könnyítésére, felgyorsítására hivatottak. A nemesítési programokban felhasználható genotípusok (tájfajták, vad fajok, hibridek stb.) molekuláris vizsgálata napjainkban minden jelentős termesztő országban kutatási prioritásnak számít.

A természetben az idegentermékenyülés evolúciós léptékekben szelektív előnyt jelent az adott faj számára, a termesztők azonban jobban kedvelik az öntermékenyülő fajtákat. Önmeddő fajta monokultúrában nem termesztendő, ezért a sikeres ültetvénytársítás tervezésekor a genetikailag meghatározott, ivari összeférhetőséget kiemelt szempontként kell kezelni. A *Rosaceae* családra jellemző gametofitikus inkompatibilitást (GSI) az *S*-lókuszt irányítja.

A gyümölcsstermesztéssel foglalkozó szakemberek közel 100 éve ismerik az önmeddőség (illetve a különböző fajták között fellépő inkompatibilitás) jelenségét, jóllehet annak genetikai, fiziológiai hátteréről akkor még semmit nem tudtak. Alig két évtizeddel ezelőtt sikerült a folyamat hátterében álló legfontosabb tényezőket tisztázni, ami alapot adott a legkülönbözőbb gyümölcsfajok molekuláris alapú vizsgálatára. A kutatási eredmények hasznosítására különösen jó lehetőséget kínálnak a nemesítési programok. A gyümölcsfák esetében a keresztezésből származó utódok ivari összeférhetőségét korábban csak a több éves vegetatív életciklusukat követően, az első néhány termő évben lehetett tisztázni. Molekuláris markerekkel a nemesítő már a keresztezést követő évben elvégezheti a szelekciót, ami jelentős erőforrás-megtakarítást tesz lehetővé.

Gazdasági jelentőségén túlmenően, az inkompatibilitás hátterében álló gének vizsgálata számos alapvető információval gazdagította a gyümölcsfákkal kapcsolatos élettani, genetikai és kultúrevolúciós ismereteinket. A téma aktualitását jól mutatja, hogy évről évre növekvő számú közlemény jelenik meg ezen a szakterületen elismert, nemzetközi folyóiratokban, és a 2011. évben megrendezték a gyümölcsfák termékenyülésének genetikai hátterével foglalkozó első nemzetközi konferenciát. A molekuláris vizsgálatok eredménye ma már számos önmeddő gyümölcsfaj esetében a fajtaleírások részét képezi, amit ültetvények létesítésekor a gyakorlatban megbízható alapként kezelnek.

A csonthéjas gyümölcsfajok túlnyomó többsége önmeddő. Ezek közé tartozik a cseresznye is, jóllehet ma már néhány öntermékenyülő fajta is ismert. A magasabb ploidszintű meggy (4x) esetében önmeddő és öntermékenyülő fajták egyaránt ismertek. A jelenlegi

ismeretek alapján ennél a fajnál a funkcióképtelen *S*-allélok felhalmozódása okozza az öntermékenyülés kialakulását. Világszerte egyre több vad faj vizsgálatára is sor kerül. Valamennyi gazdaságilag jelentős csonthéjas faj számos fajtájának *S*-genotípusát tisztázták, és a legtöbb faj esetében húsznál is több *S*-allél ismert. A termékenyülési fenotípus közvetlen hatással van az adott faj genetikai változékonyságára, ami a nemesítői munka során a szelekció alapját képezi.

Számos faj esetében (pl. kajszi, mandula, diploid szilvák) igazolódott, hogy a géncentrum felé közelítve egyre jelentősebb genetikai variabilitás jellemzi az adott fajt. Ez alól csak az őszibarack számít kivételnek, ahol az öntermékenyülés a faj evolúciós története során hamar, már a géncentrum területén kialakult. A gyümölcsfák *S*-lókuszára vonatkozó információkat elsősorban a termesztett árufajták vizsgálata szolgáltatta, ugyanakkor a legtöbb önmeddő csonthéjas és almatermésű faj esetében napjainkig sem került sor az *S*-lókusz variabilitásának jellemzésére az illető fajok géncentrumában. Az ilyen vizsgálatok nemesítési szempontból, a molekuláris módszerek fejlesztése érdekében, az önmeddőséget meghatározó genetikai háttér megismerése céljából és a faj kultúrevolúciós történetére vonatkozóan egyaránt értékes információkkal szolgálhatnak.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az önmeddőség szerepe a növényvilágban

Az inkompatibilitási rendszereknek alapvetően két csoportját különíthetjük el a hímnős virágú növények körében: Lewis rendszere alapján megkülönböztetünk hetero- és homomorfikus típusú inkompatibilitást (Lewis, 1954). A heteromorfikus önmeddőség esetében az öntermékenyülés fizikai vagy időbeli akadályok miatt hiúsul meg. Erre jó példa a *Primula* nemzetségnél megfigyelhető disztília jelensége. Disztíliáról beszélünk, ha a virágokban a bibe magasabban helyezkedik el, mint a portokok, vagy az antherák sokkal hosszabbak a bibénél, és így az önmegporzás fizikailag lehetetlen. Dichogámia esetében a növény ivarszervei eltérő időben válnak alkalmassá a termékenyülésre / termékenyítésre. Gyümölcsfajok esetében a heteromorfikus inkompatibilitás nem ismert, korábbi adatok szerint összesen 24 növény családnál fordul elő (Ebert és mts., 1989).

A homomorfikus típusú fajokra jellemző ugyan a szaporítószervek egymás közelében való elhelyezkedése, vagyis az önmegporzás morfológiai akadályokba nem ütközik, azonban öntermékenyülés genetikailag meghatározott mechanizmusok miatt mégsem mehet végbe. Ezért a tulajdonságért egy ún. multiallélikus *S*-lókusz felelős (East és Mangelsdorf, 1925). A lókusz a sterilitás szóról kapta az elnevezést. A *Poaceae* növény családon belül kettő, az *Amaranthaceae* növény család *Beta* nemzetségében pedig négy lókusz jelenlétét igazolták (Lundqvist, 1956; Larsen, 1977).

A genetikai inkompatibilitást további két típusra bonthatjuk: sporofitikus és gametofitikus önmeddőségre (Clarke és Newbigin, 1993).

A zárvatermő növények körében 60 családra jellemző homomorfikus önmeddőség (Clarke és Newbigin, 1993), melyek közül 15 családban gametofitikus, hat családban sporofitikus inkompatibilitás alakult ki. Önmeddőséget ezen kívül még 39 növény családban figyeltek meg, melynek típusa tisztázatlan. További 21 zárvatermő növény család esetében az önmeddőség megléte vitatott (Charlesworth, 1985).

Sporofitikus inkompatibilitás esetében a megtermékenyítés sikeressége a pollenadó diploid növény genotípusától függ. Ez a típusú önmeddőség a *Brassicaceae* növény családra, azon belül is főként a *Brassica* nemzetségre jellemző (Thompson és Kirch, 1992; McCubbin és Kao, 2000).

A gametofitikus inkompatibilitás (gametophytic self-incompatibility, GSI) esetén a pollen genotípusa határozza meg az önmeddőségi reakciót, mely során a pollentömlő

növekedése megtorpan. A GSI-t többféle mechanizmus vezérli, melyek közül molekuláris szinten csak néhány vizsgálatára került sor.

A *Papaveraceae* növény családban azonosítottak egy hozzávetőlegesen 15 kD molekulatömegű extracelluláris fehérjét, melyet a GSI bibekomponenseként tartanak számon. A pollenkomponens egy kb. 20 kD méretű transzmembrán fehérje (Franklin-Tong, 2008; Wheeler és mts., 2009).

Az *S*-ribonukleáz enzimek, vagyis *S*-RN-ázok által meghatározott GSI-rendszer a legnagyobb mértékben kutatott s legrégebben leírt folyamat. Mindezidáig a *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Campanulaceae*, *Plantaginaceae* és *Rosaceae* növény családokban azonosították (de Nettancourt, 2001; Franklin-Tong, 2008).

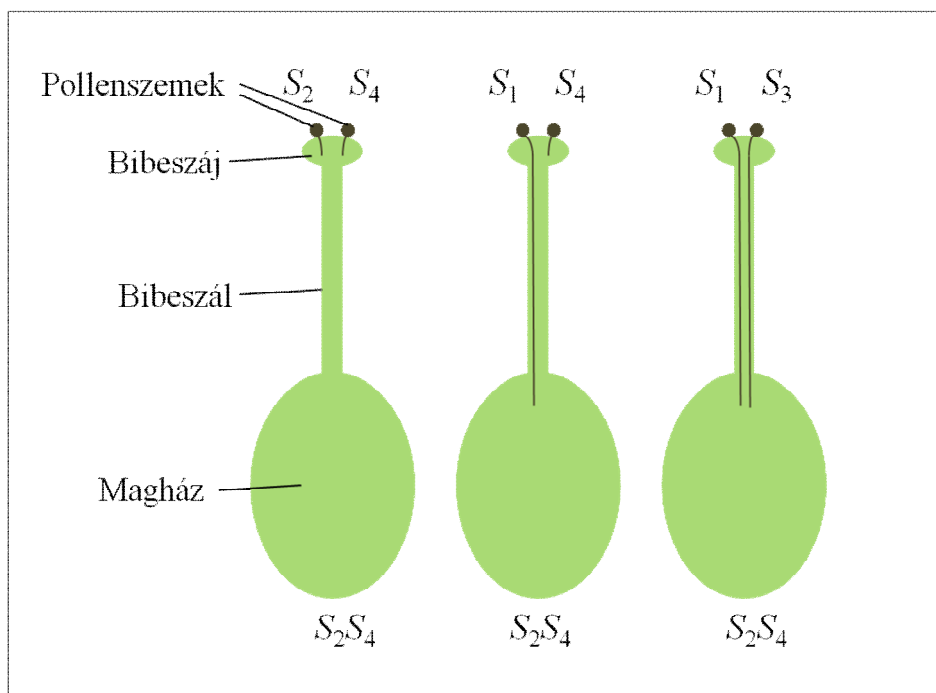
2.2. A *Prunus* fajokat jellemző inkompatibilitási rendszer molekuláris háttere

A *Rosaceae* növény család *Prunoideae* alcsaládjába sorolható valamennyi csonthéjas gyümölcsfaj, többek között a cseresznye önmeddősége is gametofitikus típusú. A termékenyülés viszonyait a multiallélikus *S*-lókusz szabályozza (de Nettancourt, 2001). A GSI genetikai működésének alapelvét East és Mangelsdorf modellezték 1925-ben a *Nicotiana* fajokon (East és Mangelsdorf, 1925).

A gametofitikus inkompatibilitás folyamata során a pollen fenotípusát saját haploid genotípusa határozza meg (1. ábra). Az *S*-lókuszban található két gén, melyek közül az egyik a bibében expresszáldó ribonukleáz (*S*-RN-áz) enzimet (McClure és mts., 1989), míg a másik a pollentömlőben kifejeződő, ún. *S*-haplotípus-specifikus F-box fehérjét kódolja (Lai és mts., 2002; Entani és mts., 2003; Ushijima és mts., 2003). Az *S*-lókusz tehát egy multigén komplexnek tekinthető. [McCubbin és Kao (2000) javaslata alapján a „haplotípus” kifejezés a lókusz valamennyi génváltozatára együttesen értendő, mellyel szemben az „allél” csupán az egyik gén változataira használandó]. A felismerési reakció az *S*-RN-áz és az F-box fehérjék között zajlik le, melynek pontos mechanizmusa a mai napig nem ismert.

Abban az esetben, ha a haploid pollenszem *S*-allélja a bibe *S*-alléljai közül bármelyikkel azonos, gametofitikus önmeddőség alakul ki, a pollenszemek ugyan kicsíráznak a bibe felületén, de a pollentömlő-növekedés a bibeszál felső harmadában megáll. Így a pollentömlő nem képes eljutni az embriózsákig, a termékenyülés megghiúsul.

Ha például egy S_2S_4 genotípusú növény pollenadójának genotípusa vele megegyező, vagyis a pollenszemek szintén az S_2 - vagy S_4 -allélt hordozzák, akkor a két különböző fajta között termékenyülés nem jöhet létre, tehát kölcsönösen inkompatibilisak (1. ábra). A bibe felületén az inkompatibilis és a kompatibilis pollenszemek egyaránt kicsíráznak, inkompatibilis kapcsolat esetén azonban a pollentömlőkben nagy mennyiségű kallóz-felhalmozódás történik (Halász, 2007; Milatović és Nikolić, 2007), s azok növekedése a bibeszálban megáll. Az inkompatibilis kapcsolat során keletkező gyümölcsök néhány hét elteltével lehullanak a fáról. Az S_1S_3 genotípust hordozó pollenadó az S_2S_4 genotípusú anyanövénnyel kompatibilis lesz, és a termékenyítés sikeresen végbemegy.



1. ábra. A gametofitikus típusú önmeddőség genetikai modellje. A pollenszem fenotípusát saját haploid genotípusa határozza meg. Amennyiben a pollenben kifejeződő S -allél azonos a diploid bibében kifejeződő S -allélok bármelyikével, a pollentömlő növekedése a bibeszál felső harmadában megtorpan. A pollenszemek csírázása a bibe felületén gátlódik. Bal oldalon az inkompatibilis kapcsolat, középen a szemikompatibilis, jobb oldalon a kompatibilis kombinációk vázlatos ábrázolása East és Mangelsdorf (1925) valamint Thompson és Kirch (1992) nyomán.

2.2.1. A termékenyülésben szerepet játszó molekuláris rendszer bibekomponense: az S -ribonukleáz (S -RN-áz) enzim

A ribonukleáz enzimek a ribonukleinsav (RNS) molekulák nukleotidokra történő hidrolízisét katalizálják. Számos élettani folyamat esetében játszanak fontos szerepet:

különböző stresszválaszokban, kórokozókkal szembeni védelemben, a növekedés szabályozásában, a magfejlődésben illetve az öregedésben (Wyen és mts., 1972; Wilson, 1975). Schrauwen és Linskens (1972) igazolták elsőként a bibeszövetek eltérő RN-áz aktivitását különböző növényfajoknál.

A termékenyülés során lejátszódó molekuláris folyamatok vizsgálatához az 1980-as évek elejétől a Melbourne-i Egyetem kutatói kezdtek hozzá. Sikerült egy, a cseresznye bibeszálból izolált, 37-39 kD méretű, 10,6 izoelektromos ponttal rendelkező „Antigen S”-nek nevezett glikoproteint azonosítaniuk (Mau és mts., 1982). Ez a glikoprotein *in vitro* gátolta a saját pollentömlő növekedését (Williams és mts., 1982).

Anderson és mts. (1986; 1989) publikálták a bibében expresszáldó *Nicotiana alata* S_2 - S_3 - és S_6 -allélok cDNS-szekvenciáit. A szekvenciák nagymértékű egyezést mutattak egymással, illetve a *Lycopersicon peruvianum* S -glikoproteinjeivel. Anderson és mts. (1989) a gén változékony szakaszait „hipervariábilis” régióknak nevezték el.

McClure és mts. (1989) kimutatták, hogy a *Nicotiana alata* bibeszövegeiben termelődnek az önmeddőség kialakításában fontos szerepet játszó fehérjék, melyek ribonukleáz aktivitásúak. Ezek az S -RN-áz enzimek a pollentömlőbe átjutva, a fehérjeszintézis folyamán a riboszomális RNS (rRNS) molekulák bontására képesek (McClure és mts., 1990). Kompatibilis kapcsolat esetén a rRNS intakt formájában marad, ezzel ellentétben inkompatibilis kombinációkban lebomlik. Huang és mts. (1994) transzgénikus növényekben kapott bizonyítékokkal támasztották alá az RN-áz enzimek szerepét.

A *Rosaceae* család S -RN-ázairól kimutatták, hogy glikoproteinek (Sassa és mts., 1993; Tao és mts., 1999). A humán és az állati immunrendszer felismerési reakcióiban központi szerepe van a glikoproteinek cukorrészének (Wassarman, 1990; Ryan és Farmer, 1991). Mindezek alapján valószínűsíthető volt, hogy az immunrendszer és az önmeddőség működési elve között párhuzam húzható. Ugyanakkor Karunanandaa és mts. (1994) eredménye cáfolta ezt az állítást, mert a deglikolizált állapotban lévő S_3 -RN-áz az S_3 -genotípussal rendelkező pollentömlő fejlődését szintén képes volt gátolni, vagyis az S -haplotípus-specifitásért maga a fehérje tehető felelőssé.

Az S -RN-áz gén öt konzervatív és két hipervariábilis régióra tagolható (Ioerger és mts., 1991; Tsai és mts., 1992). A konzervatív régiókat C1, C2, C3, C4 és C5 régióknak, a két változékony régiót pedig HVa és HVb régióknak nevezzük. Ezeket a régiókat a *Solanaceae* család 12 különféle DNS-szekvenciájának összehasonlításával azonosították. A hipervariábilis régió az allélspecifikus felismerésben játszik fontos szerepet (Matton és mts., 1997).

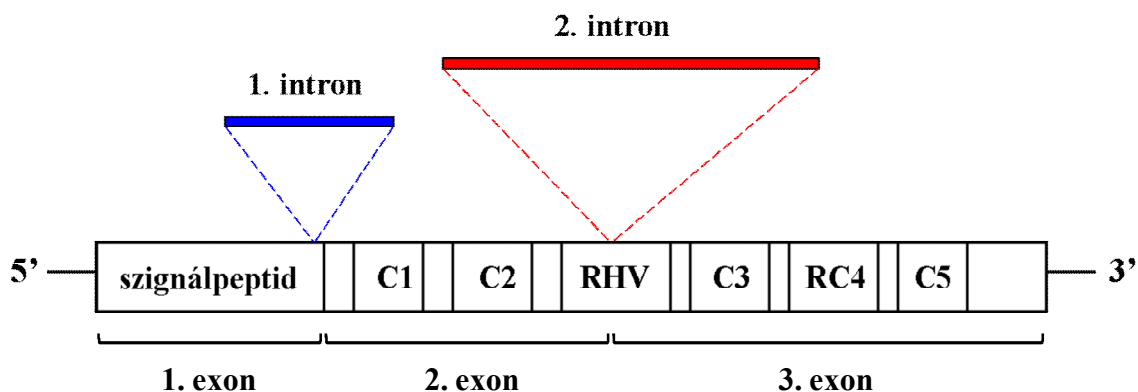
A gametofitikus önmeddőség alapjait kezdetben *Solanaceae* fajokon vizsgálták genetikai transzformációs kísérletekben, amely jó alapot adott a *Rosaceae* *S-RN-áz*ainak későbbi azonosításához. A *Rosaceae* családon belül elsőként a *Maloideae* alcsalád névadó fajának, az almának határozták meg az *S-RN-áz* génszekvenciáit (Broothaerts és mts., 1995). Egy évvel később Sassa és mts. (1996) tisztázták az *S-RN-áz*ok filogenetikai viszonyait. A termékenyüléssel összefüggésbe hozható *S-RN-áz*ok a gomba T₂-*RN-áz*okkal (Kawata és mts., 1988) megegyező osztályba (E.C. 3.1.27.1.) tartoznak.

Ushijima és mts. (1998) tisztázták, hogy az *S-RN-áz* konzervatív régiói a *Solanaceae* és a *Rosaceae* családban csak részben egyeznek meg. A C1-C3 valamint a C5 régiók mindkét növénycsaládnál szekvenciálisan azonosak voltak, a burgonyafélék családjának C4-es konzervatív régiója azonban különbözik a rózsafélékétől, így azt RC4-nek nevezték el (az „R”-betű a *Rosaceae* család nevére utal). A *Rosaceae* család *S-RN-áz* gének a változékony régióban is eltérést mutattak: a *Solanaceae*-től eltérő módon csupán egy hipervariábilis régiót tartalmaz a C2 és C3 génszakaszok között, melyet RHV-nek nevezünk. Az RHV régió a *Solanaceae* fajok génjének HVa szakaszának felel meg.

Az *S-RN-áz*ok bizonyos konzervatív régiói számos hidrofób aminosavat tartalmaznak, ami segít az enzim szerkezetének stabilitását biztosító hidrofób mag kialakulásában (Ioerger és mts., 1991; Ushijima és mts., 1998), ezért e régiók szekvenciája meglehetősen konzervált. A C2 és C3 régiók az *RN-áz* fehérje aktív centrumaként funkcionálnak, az RNS-hidrolízisben fontos szerepet töltenek be (Broothaerts és mts., 1995).

Az *S-RN-áz*ok változékony, hipervariábilis régióiban található aminosavak többsége hidrófil tulajdonságú. Ez a génszakasz – lévén, hogy a bibe és a pollen között lezajló allélspecifikus felismeréshez nélkülözhetetlen – a fehérje globuláris térszerkezetének felszínén elhelyezkedő aminosavakat kódol.

A csonthéjas gyümölcsök *S-RN-áz* génjére két intron jelenléte jellemző. Az intronok hossza allélspecifikus módon változó. Az 1. intron a gén szignálpeptid (SP) és C1 konzervatív régiói között, a 2. intron pedig a hipervariábilis régióon belül foglal helyet (2. ábra). A *Rosaceae* család, *Prunoideae* alcsalád növényfajainak *S-RN-áz*airól általánosságban elmondható, hogy a 2. intron mérete (kb. 110-3100 bp) majdnem minden esetben meghaladja az 1. intron méretét (kb. 100-450 bp).



2. ábra. A *Rosaceae* családra jellemző *S-RN-áz* gén felépítése. A gén öt konzervatív régiót (C1, C2, C3, RC4 és C5) valamint egy változékony, hipervariábilis régiót (RHV) tartalmaz. Az *S-RN-ázok* két intront (az ábrán kékkel, illetve pirossal jelzett szakaszok) hordoznak. Ezek mérete allélspecifikus módon változó (Sonneveld és mts., 2003 nyomán).

2.2.2. A termékenyülésben szerepet játszó molekuláris rendszer pollenkomponense: az *S*-haplotípus-specifikus F-box fehérje

A termékenyülés során lezajló felismerési folyamat a pollen és a bibe között zajlik le, vagyis a termékenyülésért felelős lókusznak a bibekomponensen kívül van egy pollentömlőben expresszálandó fehérjeterméke is.

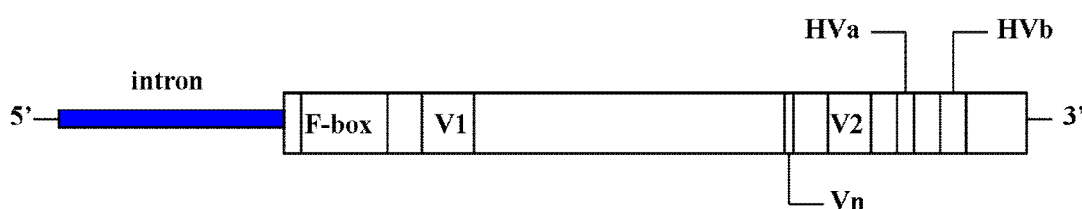
A kétkomponensű GSI-rendszer működésének alapfeltétele a pollenkomponenst kódoló gén és a bibekomponens *S-RN-áz* gén fizikai közelsége, szoros kapcsoltsága a lókuszbán, annak érdekében, hogy rekombináció bekövetkezésének valószínűsége mérsékelt legyen. A rekombináció a haplotípusok egyik génjének kicserélésével tönkretenné a pollen- és bibekomponensek allélspecifikus kapcsolatát, vagyis az önmeddőség nem alakulna ki (Kao és Tsukamoto, 2004). Fontos továbbá a pollenkomponens szekvenciáinak legalább olyan fokú változékonysága, mint a bibekomponens esetében, hiszen minden *S-RN-áz* allélhoz kell egy vele megegyező specifitást kódoló pollenkomponens.

Az első feltételezést, miszerint a pollenben is RN-áz enzim expresszálandó, Dodds és mts. (1999) kísérletei cáfolták. A *Solanaceae* családba tartozó *Lycopersicon peruvianum* transzformációját végezték el pollenhez kötődő promóterhez kapcsolt *S₃-RN-áz* konstrukciók segítségével (Dodds és mts., 1999). Kromoszómaséta (Weaver és Hedrick, 2000) molekuláris technikával *Petunia* és *Antirrhinum* fajokban egy *SLF* (*S-lókuszt F-box*) nevű gént mutattak ki az *S-RN-áz* gén közelében. Az *SLF* gén a *Solanaceae* és a *Plantaginaceae* növény családotk fajaira jellemző. A gén fehérjeterméke a pollenben expresszálandó (Lai és mts., 2002).

Az F-box fehérjék számos biológiai funkciójuk között az SCF (Skp1, Cullin1, Rbx1, F-box fehérje) komplex alkotóelemei, az E3 ubikvitin-ligáz enzimkomplex részei. Ez az enzimkomplex vezérli a célfehérjék ubikvitinálásának folyamatát, melyet követően bekövetkezik a fehérjék célzott lebontása, degradálása a 26S proteaszóma rendszerében (Hershko és Ciechanover, 1998; Vierstra, 2003; Lechner et al., 2006).

Az *Prunus* nemzetség *F-box* génjét első ízben Entani és mts. (2003) írták le japánkajszinál (*Prunus mume*). Ugyanebben az évben jelent meg Ushijima és mts. (2003) közleménye, mely a mandulában azonosított *F-box* génszekvenciáról számolt be. Ezt a gént *SFB*, vagyis az *S-haplotípus-specifikus F-box* névvel jelölték.

Az *F-box* gén az *S-RN-ázoktól* eltérő módon egyetlen intront tartalmaz. Ikeda és mts. (2004a) a *Prunus avium F-box* génjének szekvenciamotívumait vizsgálva kimutatták két változékonny (V1 és V2) valamint két hipervariábilis (HVa és HVb) szakasz jelenlétét (3. ábra). Az F-box ezen régióit hidrofil aminosavak építik fel. Elhelyezkedésüket tekintve a fehérje felületére lokalizálódnak és feltehetően az allélspecifikus felismerésben van kulcsfontosságú szerepük (Ushijima és mts., 2003, Sassa és mts., 2010; Tao és Iezzoni, 2010; Meng és mts., 2011).



3. ábra. Az *F-box* gén, mint pollenkomponens szerkezeti felépítése. A gén két variábilis (V1 és V2), valamint két hipervariábilis (HVa és HVb) szakaszt tartalmaz. Az *F-box* az *S-RN-ázoktól* eltérően egy intronnal (az ábrán kékkkel jelölt génszakasz) rendelkezik (Ikeda és mts., 2004a; valamint Nunes és mts., 2006 nyomán).

A *Maloideae* alcsaládban a *Prunoideae* alcsaládtól eltérő módon több *F-box* gén jelenlétét igazolták (Sassa és mts., 2007). Kakui és mts. (2011) bizonyították, hogy a japánkörte (*Pyrus pyrifolia*) egy többtényezős faktor által irányított „nem-saját felismerési” SI rendszerrel rendelkezik (*non-self recognition by multiple factors*), ami azért meglepő, mert ez a típusú inkompatibilitási modell a *Solanaceae* családra jellemző (Kubo és mts., 2010). Ebben az esetben a pollenkomponens funkcióvesztése nem vezet öntermékenyüléshez. A két eltérő működési elv előfordulásának oka a különböző taxonokban még nem tisztázott.

2.2.3. Az *S*-RN-áz által irányított inkompatibilitási rendszer molekuláris modellje

Eleinte a gametofitikus önmeddőség rendszerének pollenkomponense a tudomány számára ismeretlen volt, a kutatókat azonban foglalkoztatta a folyamat molekuláris mechanizmusa. Lewis 1960-ban úgy gondolta, hogy a GSI rendszer működésének hátterében három komponens áll: a bibében és a pollenben megtalálható komponens, valamint ezen kívül még egy, az allélspecifikus felismerésben kulcsszerepet játszó egység.

A másik feltevés Thompson és Kirch (1992) nyomán terjedt el, miszerint az *S*-lókusz RN-ázán kívül előforduló pollenkomponens gén vagy membránreceptor, vagy egy RN-áz bontó molekula. Az inkompatibilitási rendszer működésére két molekuláris modellt állítottak fel, a receptor („gatekeeper”) és az inhibitor modelleket (Thompson és Kirch, 1992; Kao és McCubbin, 1996).

2.2.3.1. Az inkompatibilitási rendszer receptor, „gatekeeper” modellje

A „gatekeeper modell” szerint az *S*-gén a pollenben egy transzmembrán receptorfehérje. Ezen keresztül a pollentömlőbe kizárólag az azonos allél által kódolt *S*-RN-áz enzimek juthatnak be, így gátolva a pollentömlő növekedését. A modell működése azonban a poliploid fajok esetében nem valósulna meg, hiszen például egy diploid heterozigóta esetén a pollenszemek képesek lennének az öntermékenyítésre.

2.2.3.2. Az inkompatibilitási rendszer inhibitor modellje

Az inhibitor modell alapján az *S*-gén terméke a pollenben egy RN-áz-inhibitor fehérje. Úgy gondolták, hogy az inhibitor a fejlődő pollentömlő citoplazmájában található. A modell szerint minden *S*-RN-áz képes a pollentömlőbe bejutni és az RN-áz-inhibitor fehérje minden *S*-RN-áz aktivitását gátolja. A gátlás alól kivételt képeznek az RN-áz inhibitor fehérjével megegyező, azonos allél által kódolt enzimek.

A pollentömlőkön belül igen nagymértékű RN-áz akkumuláció volt megfigyelhető a bibe *S*-alléljaival azonos, és azoktól különböző allélt hordozó pollennel történt megporzást követően (Luu és mts., 2000). Ez a jelenség az inhibitor modell helyességét látszott bizonyítani. A pollenkomponens F-box fehérje azonosítása is megerősíti az önmeddőségi reakció inhibitor modelljét, a saját/idegen felismerési rendszer meglétét.

2.2.3.3. A módosított inhibitor modell

Az inhibitor modell továbbfejlesztett változata szerint az inkompatibilitási reakció során nem inaktiválás, hanem lebontó folyamat megy végbe. A lebontás az ubikvitin/26S proteaszóma rendszeren keresztül történik, a pollen F-box fehérje ubikvitinálja az idegen *S*-RN-áz molekulákat, melyeket a pollentömlő a proteaszómában lebont (Ushijima és mts., 2004).

Ezt a modellt azonban megcáfolták Sonneveld és mts. (2005) eredményei, melyek igazolták, hogy az *S*-haplotípus specifikus F-box fehérje nem az idegen *S*-RN-ázok lebontását végzi. Szerintük egy általános degradációs mechanizmus bontja le a pollentömlőbe lépő *S*-RN-ázokat, mely folyamat az ubikvitin/26S proteaszóma rendszer közreműködésével történik. Egy molekuláris szintű, allélspecifikus kapcsolat meglétének köszönhetően a pollenkomponens képes a vele azonos allél által kódolt *S*-RN-áz molekulák stabilitását fenntartani.

Idegentermékenyüléskor az *S*-RN-áz enzimek a pollentömlőben degradálódnak, a pollentömlő riboszomális RNS-e sértetlen marad, fejlődése zavartalan, sikeres lesz a megtermékenyülés. Ezzel ellentétben, önmeddőség esetében az *S*-RN-ázok szorosan kapcsolódnak a pollentömlő azonos allél által kódolt F-box fehérjével. Így nem válik lehetővé az enzimek lebontása, a pollentömlő rRNS-e degradálódik, a termékenyülés meghiúsul, s a pollentömlő fejlődése „félúton” megtorpan. Ha ez a modell helyesnek bizonyul, akkor szemben az első hipotézisekkel az F-box nem az *S*-RN-ázok lebontásában vesz részt, hanem azok lebontását akadályozza meg.

2.2.3.4. A kompartmentalizációs modell

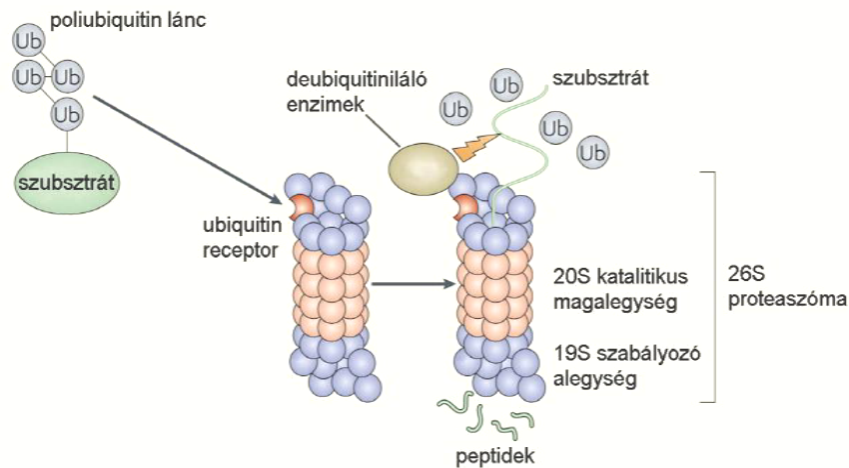
Goldraij és mts. (2006) szerint a *Nicotiana* nemzetségben az önmeddőség hátterében másféle molekuláris folyamatok állnak. E modell értelmében a kompatibilitást nem az *S*-RN-ázok lebontása idézi elő, hanem azok kompartmentalizációja. A bibe sejtjei az *S*-RN-ázok mellett egy HT-B és egy 120 kD glikoprotein (bővebben lásd Cruz-Garcia és mts., 2003) fehérjét is szekretálnak a sejtek közötti térbe. Ezek a fehérjék endocitózissal jutnak be a pollentömlőbe, annak a vakuólumába. A kompatibilis pollentömlőkben egy eddig ismeretlen pollen fehérje (PP) lebontja a HT-B molekulákat. HT-B hiányában az *S*-RN-áz a vakuólumban kompartmentalizálva marad, amely kompatibilitási reakcióhoz vezet. Az *S*-RN-

ázok tehát jelen vannak és stabilak, citotoxikus hatásuk mégsem érvényesül, mert a pollentömlő működése szempontjából kritikus sejten belüli színterektől elzárva helyezkednek el. Az önmegporzás során a PP nem képes a HT-B-t lebontani, így a vakuólumok membránja sérül. Miután az *S*-RN-ázok kiszabadultak a vakuólumból, megzavarják a pollentömlő működését, ami egy önerősítő mechanizmust hoz létre. Az *S*-RN-ázok és SFB-k közti kezdeti kölcsönhatásokat még nem ismerjük, bár e két molekula között valamilyen kapcsolat szükségesnek látszik ahhoz, hogy a reakciósor későbbi lépéseit a kompatibilis vagy inkompatibilis válasz irányába terelje. Napjainkban még kérdéses, hogy a *Solanaceae* családban leírt intracelluláris eseményeknek lehet-e szerepük az önmeddő / öntermékenyülő fenotípus kialakítása során a *Rosaceae* család egyik, másik, esetleg mindkét alcsaládjában.

2.2.3.5. A 26S proteaszóma rendszer

A 26S proteaszóma rendszer (4. ábra) a sejtmagban és a citoplazmában lokalizálódik, 2,5 MD nagyságú. Két alegységből áll: egy 20S katalitikus központi mag-alegységből és egy 19S szabályozó alegységből (Voges és mts., 1999).

A 19S szabályozó alegység feladata a poliubikvitinált fehérjék azonosítása és kitekerése, melyek így jutnak be egy keskeny csatornán keresztül a központi részbe. Itt történik meg a degradálásuk. A lebontás során peptidok; 7-9 aminosavnyi, ubikvitin-kapcsolt oligopeptidok valamint poliubikvitin-láncok jönnek létre, melyek közül az utóbb említett két termékből ubikvitinek szabadulnak fel hidroláz és izopeptidáz enzimek segítségével. A kisebb peptidokat a citoplazmában megtalálható peptidázok tovább degradálják.



4. ábra. A 26S proteaszóma rendszer: a 19S szabályozó alegység a szubsztrát fehérjék felismerését és kitekeredését irányítja, a 20S katalitikus központi mag a proteinek lebontásáért felelős (Vierstra, 2003 valamint Ravid és Hochstrasser, 2008 nyomán).

2.3. Az *S*-lókusz kultúrevolúciója

A legtöbb magasabb rendű növény esetében a virág ivarszervei, a pollenszemeket tartalmazó porzó és a virágot fogadó bibe egymás közelében fejlődnek ki, mégis ritka az öntermékenyülés bekövetkezése. Erre a jelenségre már Darwin is figyelmes lett 1877-ben, s hatalmas jelentőséget tulajdonított neki (Darwin, 1877).

Az önmeddőség molekuláris háttere az egyes növény családknál igen eltérő lehet. Az allélok polimorfizmusa azonban mindenhol nagy jelentőséggel bír. A keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) családjában a különféle allélok kialakulása az inkompatibilitási rendszer keletkezésével egy időben történt (Uyenoyama, 1995). Tsai és mts. (1992) úgy vélik, hogy az allélok sokféleségének kialakulása nem a génen belül végbemenő rekombináció hatásának tudható be, hanem pontmutációk felhalmozódásának.

Vieira és mts. (2003) a burgonyaféléknél (*Solanaceae*), Ortega és mts. (2006) pedig mandula esetében mutatták ki az *S*-RN-áz allélok közti rekombinálódás lehetőségét. Az egészen bizonyos, hogy az *S*-lókuszon belül a két komponensre azonos evolúciós nyomás hatott (Castric és Vekemans, 2004), mert előzetes feltételezések szerint, ha csak az egyik komponens génjét érné mutáció, akkor az inkompatibilitási rendszer nem működne (Lewis és Crowe, 1954). Ilyen módon alakultak ki a *Prunus* fajok ismert öntermékenyülő fenotípusú egyedei (Hegedűs és mts., 2012; Tao és Iezzoni, 2010).

A kutatók sok esetben tapasztalták az ún. transzspecifikus evolúció jelenségét, mint például *Solanum*, *Petunia* és *Nicotiana* fajoknál Ioerger és mts. (1990) valamint a *Malus* és *Pyrus* nemzetségben Sassa és mts. (1996). Különböző *S-RN-áz* szekvenciák összehasonlításával derült fény a jelenségre, miszerint a bizonyos *S*-allélok fajok közötti szekvencia-hasonlósága nagyobb mértékű, mint a fajon belüli különböző *S*-allélok szekvencia-hasonlósága. Mindez arra enged következtetni, hogy az egyes fajok szétválása később történt, mint a különböző *S*-allélok keletkezése (Sassa és mts., 1996; Ishimizu és mts., 1998a).

2.4. Az *S*-lókusz vizsgálatának módszertani áttekintése

2.4.1. A termékenyülés vizsgálatának hagyományos módszerei – szabadföldi termékenyülés-vizsgálatok

Elsőként 1894-ben Waite végzett hagyományos termékenyülési vizsgálatokat. Munkája során a ‘Williams’ körtefajta terméketlenségét figyelte meg körteültetvényében (Waite, 1894). Cseresznye esetében Gardner (1914) foglalkozott ilyen vizsgálatokkal, régi cseresznyefajtákat cserélt le ‘Bing’, ‘Lambert’ és ‘Napoleon’ fajtákra, melynek hatására nem tapasztalt gyümölcskötődést az ültetvényben. Ezek a fajták önmeddőek és kölcsönösen egymást termékenyíteni nem képesek. Tobutt és mts. (2001) munkája alapján ma már tudjuk, hogy a jelenség oka az volt, hogy ezek a fajták azonos inkompatibilitási csoportba tartoznak (*S*-genotípusuk S_3S_4).

A szabadföldi termékenyülési vizsgálatokat sok-sok éven át alkalmazták arra, hogy az egyes fajták termékenyülési viszonyait vizsgálják. Irányított keresztezéseket végeztek, melyet követően hozzávetőlegesen nyolc héttel később vált értékelhetővé a gyümölcskötődés mértéke.

Öntermékenyülés vizsgálatokor, autogámia esetében a bimbós stádiumban lévő ágakat izolálják, és pár hét elteltével értékelik a gyümölcskötődést. Ez a módszer azonban a rovarporozta fajok esetében problémát okoz a rovarok kizárása miatt. Geitonogámia esetében a virágokat kasztrálják, s ezt követően a korábban már begyűjtött saját virágporukkal porozzák be (Nyujtó és mts., 1985; Burgos és mts., 1993; Nyéki és Szabó, 1995).

Költséghatékony módszernek bizonyul, de az időjárás jelentősen befolyásolja a vizsgálat sikerességét. Az értékelést kb. 6-8 hét elteltével végezhetjük el.

A fajták *S*-genotípusának meghatározása szabadföldi vizsgálatok segítségével azonban jóval nagyobb kihívást jelent, hiszen több, különböző féle irányított keresztezés elvégzése válik szükségessé más és más kombinációkban. Közel tíz évet vesz igénybe a gyümölcsfák meglehetősen hosszú ideig tartó juvenilis időszaka miatt. E vizsgálatnál kevésbé időigényesebb módszer a molekuláris szinten végzett analízis, azonban a tesztkeresztezéssel történő ellenőrzés bizonyos esetekben továbbra is javasolható (Halász és Hegedűs, 2006).

2.4.1.1. A cseresznye idegentermékenyülésének szabadföldi vizsgálata

A XX. század kezdetétől jelentek meg ilyen irányú kutatási eredmények Gardner (1914) valamint Kobel és Steinegger (1933) munkáiban. Később Matthews és Dow (1969) összefoglaló áttekintést adtak ki a cseresznyénél tapasztalt termékenyülési eredményeikről.

A jorki kutatóintézetben nemesített cseresznyefajták *S*-genotípusát Schmidt és Timmann (1997) határozták meg tesztkeresztezésekkel valamint pollentömlő-növekedés vizsgálatokkal. Godini és mts. (1998) néhány fajtát hasonlítottak össze az ön- és idegentermékenyülésük tekintetében. Irán fontos cseresznyefajtáját, a ‘Siah Mashad’ fajtát vizsgálta s pollenadó partnereket írt le hozzá Arzani és Khalighi (1998). A Taurus-hegységi török cseresznyefajtakört és az őket termékenyítő fajtákat Paydas és mts. (1998) vizsgálták.

Hazánk első cseresznye-termékenyülés vizsgálatai Maliga Pál nevéhez fűződnek (Maliga, 1952). Munkája során az abban az időben termesztett főbb, rosszul termő fajták, a ‘Badacsonyi óriás’ és a ‘Germersdorfi óriás’ fajták mellé írt le pollenadó fajtákat, azok termékenyítő képességének vizsgálata mellett.

Tíz év elteltével, 1962-ben Brózik Sándor vizsgálta a ‘Germersdorfi óriás’ fajta termékenyülését. A vele termékenyülési szempontból megfelelően párosítható fajtákat a ‘Szomolyai rövidszárú’, ‘Hedelfingeni óriás’ és ‘Solymári szívcsesznye’ fajtákban határozta meg (Brózik, 1962). A vizsgált fajtával nem kompatibilis fajták a ‘Bing’ valamint a ‘Badacsonyi óriás’ cseresznyefajták. Apostolné (1994) foglalta össze a főbb termesztett magyar fajták termékenyülési viszonyait, majd Brózik és Apostol (2000) a fajtaleírásokban már közölték az új fajták és fajtajelöltek pollenadó fajtáit.

Szabó és mts. (2002) foglalták össze a cseresznye termékenyülésével kapcsolatos főbb ismereteket. Nyéki és mts. (2003) hangsúlyozták közleményükben a gyümölcsfajok *S*-genotípus-vizsgálatának fontosságát.

2.4.1.2. A cseresznye öntermékenyülésének szabadföldi vizsgálata

A termesztők munkáját nagyban megkönnyíti, ha öntermékenyülő cseresznyefajtákat telepíthetnek. Az ültetvényekbe az öntermékenyülő fajták tömbösen telepíthetők, hiszen nincs szükség a termékenyülés folyamán a pollenadó fajták elhelyezésére, s minden fajta egymás univerzális pollenadójának tekinthető (Thompson, 1996). Az ilyen fajták esetében azonban fennáll a túlkötődés, és a gyümölcsök ebből következő rendkívüli mértékű elaprósodásának veszélye.

A cseresznye egyike volt azon gyümölcsfajoknak, melyeknél az önmeddőség jelenségét a legkorábban, már a XX. század elején megfigyelték, és leírták. Az öntermékenyülési képességet sokan tanulmányozták szabadföldi vizsgálatok alkalmával, s olykor téves eredményekről is beszámoltak. Stancevic (1971) két cseresznyefajtaról, a 'Black Tartarian' és 'Emperor Francis' fajtaokról írta le, hogy öntermékenyülő. Ugyanakkor ezek a fajták valójában önmeddőnek bizonyultak később (Tobutt és mts., 2005).

Godini és mts. (1998) öntermékenyülő fajtákon végeztek mesterséges ön- és idegentermékenyítést, majd a terméskötődés mértékét hasonlították össze. Arra a kérdésre kerestek választ, hogy nem okoz-e termésvesztést az öntermékenyülő fajták tömbös telepítése. A két kísérlet elvégzésével kapott terméskötődési eredmények hasonlóak voltak: az egyfajtás tömbökbe való ültetés nem rontotta a fák teljesítményét. Fontos azonban a pollenátvitel biztosítása.

Magyarországon Maliga (1952) 23 cseresznyefajta öntermékenyülését vizsgálta megporzatlan és saját virággal megporzott virágaikat használva. Néhány fajta esetében tapasztalt csekély mértékű, 1-5 %-os terméskötődést, melyet elenyészőnek tartott, s ezen fajtákat önmeddőnek tekintette. Brózik (1962) a 'Germersdorfi óriás' cseresznyefajta önmeddőségét állapította meg, valamint leírta az első inter-inkompatibilis csoportokat. Nyéki (1989) 14 cseresznyefajta öntermékenyítését követően csupán elhanyagolható terméskötődést tapasztalt: a 'Germersdorfi óriás' fajtánál 1,5 %-ot, a 'Vic' fajtánál pedig 0,5 %-ot.

A nemesítői munka során nagyon fontos célkitűzéssé vált az öntermékenyülő cseresznyefajták előállítására. Az önmeddő fajták esetében termesztési kockázatokkal kell számolnunk, a termesztés szervezésekor nehézségekbe ütközünk, hiszen pollenadó fajták telepítését is számba kell vennünk, melynek költségvonzata van. Mindezen okból megnövekedett az igény a jó minőségű öntermékenyülő fajták iránt.

A termesztésben lévő fajták között nem találtak öntermékenyülő fajtát. Az első öntermékenyülő cseresznyefajta előállítására az angliai John Innes Intézetben került sor. A kísérlet során az önmeddő 'Napoleon' fajta pollenanyasejtjeit röntgensugárzásnak vetették

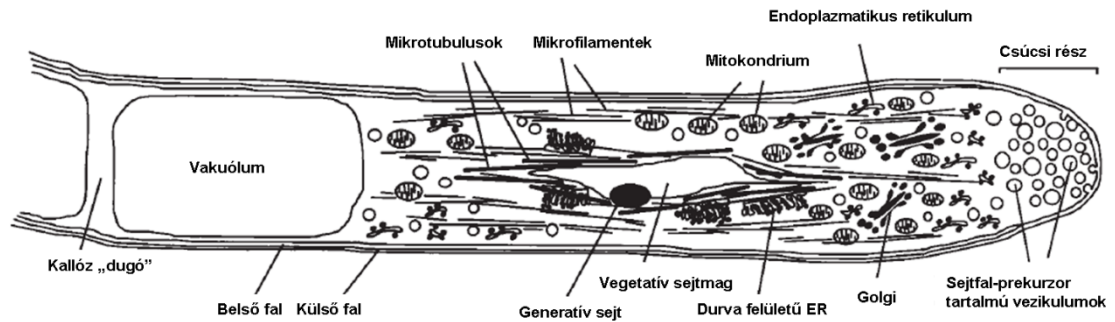
alá. A 'Napoleon' fajta genotípusa ismert volt, S_3S_4 . A sugárzásnak kitett pollenszemekkel egy, a 'Napoleon' fajtával azonos S -genotípusú fajta ('Emperor Francis') virágait porozták meg (Lewis, 1949). A fent leírt keresztezésből csak akkor kaphatunk kötődött terméseket, amennyiben a pollenanyasejtekénél alkalmazott röntgensugárzás tönkretette az önmeddőség kialakításáért felelős gént. A kísérlet során kapott, kötődött gyümölcsök magjából nyert növények szolgáltak nemesítési alapanyagul az öntermékenyülő cseresznyefajták előállításához (JI 2420 és JI 2434 szelekciós vonalak). Így hozták létre az első öntermékenyülő cseresznyefajtát, a 'Stellát' (Lapins, 1971).

Brózik Sándor öntermékenyülő hibrideket kapott a 'Bigarreau Burlat' és a 'Stella' cseresznyefajták keresztezéséből. Brózik és Apostol az 'Alex' nevű fajtához a John Innes Intézetből kapott 'Cherry Self Fertile 46' fajtát használták fel. Magyarországon jelenleg államilag elismert öntermékenyülő cseresznyefajták az 'Alex', 'Sunburst' és 'Stella'.

2.4.2. Pollentömlő-növekedési vizsgálatok

Annak érdekében, hogy a hímivarsejt az embriózsákba eljuthasson, a bibe felületére hullott pollenszemek tömlőt hajtanak, amit a pollen vegetatív sejtmagja irányít. A pollentömlő a bibeszövetbe hatol, egy ún. transzmissziós vagy stigmatoid szöveten keresztül, és a generatív sejt osztódása révén létrejött két hímivarsejtet a pollentömlő aktív citoplazmáját tartalmazó csúcsi részben tartva eljuttatja az embriózsákig. A zárvatermőkre a kettős megtermékenyítés jellemző, melynek lényege, hogy az egyik hímivarsejt a petesejttel egyesül, melyből kifejlődik az embrió, a másik hímivarsejt pedig a központi diploid sejttel olvad össze, ezáltal kialakítva a belső táplálósövetet, azaz a triploid endospermiumot (Franklin-Tong, 2002).

A növekvő pollentömlő a sejtközötti járatokban talál magának utat, növekedéséhez a tápanyagot a bibeszál stigmatoid szövege adja. A pollentömlőn belül a sejteket elnyálkásító, ún. pektinázok termelődnek. A pollentömlő tulajdonképpen egy speciális „óriássejt”, mely a bibére rákerülő pollenszemtől az embriózsákig terjed. A növekvő pollentömlő csúcsi része, a tömlővég citoplazma tartalmú, melyben megtalálhatók a sejtorganellumok, azaz az endoplazmatikus retikulum, a mitokondrium illetve a Golgi-készülék, valamint a vegetatív és a generatív sejtek. Maga a pollentömlő növekedése mindig a csúcsi részre, azaz a tömlővégre koncentrálódik, s itt történik a pollentömlő falát felépítő anyagok bioszintézise is. Ahogyan a pollentömlő növekedése elkezdődik, folyamatosan alakulnak ki a „kimerültnek” nevezhető részek, melyeket kallóz-felhalmozódások fűznek le, s ezek később vakuólizálódnak (5. ábra).



5. ábra. A pollentömlő szerkezete. A pollentömlő gyors ütemben növekszik, mely a tömlővégre (csúcsi részre) korlátozódik. A növekedés során keletkező úgynevezett „kimerült” részeket kallóz „dugók” (lefüződés) választják el egymástól (Franklin-Tong, 1999 nyomán Halász, 2007 módosításaival).

A kallóz „dugók” kialakulása szabályszerűen történik, a pollentömlő létraszerűen növekszik (Franklin-Tong, 1999). A két fajta között fellépő inkompatibilitás esetén a kutatók megfigyelték, hogy a pollentömlőkön belül bekövetkező kallóz-akkumuláció sokkal nagyobb mértékű (de Nettancourt és mts., 1973; Cresti és Went, 1976). A pollen csírázására és a pollentömlő növekedésére befolyással vannak a környezeti tényezők, de az egyes növényfajok között is tapasztalhatók eltérések.

2.4.2.1. A pollentömlő útja a bibétől a magházig a *Prunus* nemzetségben

Stösser (1980) a *Prunus* nemzetség fajaira jellemző pollentömlő-növekedést vizsgálta, elsősorban a cseresznye, meggy és szilva fajokat. A pollentömlő a bibeszál transzmissziós szövetébe behatolva kezdi meg növekedését. E szöveti rész sejtközötti járatai szénhidrátban gazdagok, melyek a szövet keményítőtartalmával együtt szolgáltatják a pollentömlő növekedéséhez szükséges energiát. Bár a cseresznyebibe felületi részéről néhány száz pollentömlő indul növekedésnek, a magházon belül a pollentömlők száma mindössze 1-6-ra redukálódik (Stösser és Anvari, 1981). Ennek oka nem ismert, a legvalószínűbb a pollentömlők versengése a tápanyagokért. A cseresznye- és meggyfajtáknál gyakran előfordul, hogy ahogy a pollentömlő eléri a magház üregét, a pollentömlőkön rendellenes elágazódások, torzulások jelennek meg (Stösser és Anvari, 1981).

Herrero (2000) a *Prunus* nemzetség egyik tagjánál, az őszibaracknál vizsgálta a pollentömlő növekedésének sajátosságait. Megfigyelései alapján elmondható, hogy a

pollentömlő azonosítja az életképes magkezdeményt, a pollentömlő növekedését a szekretáló szövetrészek (külső integumentum, mikropile) irányítják, majd a pollentömlő eléri a magkezdeményt. A pollentömlő növekedését jól jellemezhetjük a növekedés sebességével, vagyis annak az időtartamnak a meghatározásával, amíg a pollentömlő a megporzástól a bibeszál alapi részét eléri, vagy amely idő a megtermékenyülésig eltelik. Cseresznye és meggy esetében 2-3 nap alatt éri el a pollentömlő a bibeszál alapját szabadföldi körülmények között. A megporzás és megtermékenyítés között eltelt idő az egyes közleményekben különbözőnek bizonyult: 3-4 nap (Bradbury, 1929; Tukey, 1933, 1934) illetve 1-3 nap (Nyéki, 1974).

2.4.2.2. A pollentömlő növekedésének vizsgálati eszközei

A pollentömlő növekedésének nyomon követése szövettani vizsgálatok útján anilinkék festék segítségével történik, mely megfesti a kallózt és ezáltal a pollentömlő UV-fluoreszcens mikroszkóppal ellenőrizhetővé válik (Martin, 1959). Ezzel a módszerrel tehát végigkísérhetjük a pollentömlő útját a bibétől az embriózsákig a fluoreszkáló kallóz „dugók” megfigyelésével. A technika hátrányaként róható fel, hogy az anilinkék olyan szövetrészeket is megfest, amelyek zavaró tényezőként jelenhetnek meg a kiértékelés során, mint például a szállítószövetek illetve a bőrszöveti szőrök elszíneződése.

Ezt a vizsgálati technikát eredményesen alkalmazták számos almatermésű és csonthéjas gyümölcsfajnál, köztük cseresznyénél (Williams és mts., 1982; Békefi és Halász, 2005) és meggyénél is (Yamane és mts., 2001; 2003a).

In vivo körülmények között is alávethetjük az adott növényt pollentömlő vizsgálatnak, miszerint szabadföldi körülmények között elvégezzük a mesterséges megporzást, azonban számolnunk kell a pollentömlő növekedését legnagyobb mértékben befolyásoló hatással, a hőmérséklettel, mely ebben az esetben nem szabályozható. *In vitro* vizsgálatok során a megfelelő stádiumban lévő, virágzó ágakat leválasztjuk a fáról, és a mesterséges megporzást ellenőrzött körülmények között végezzük.

2.4.3. A fehérje alapú vizsgálatok – az izoelektromos fókuszálás (IEF) és a nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE)

A különböző allélok által kódolt *S*-RN-áz izoenzimek egymástól főként aminosav-szekvenciájukban térnek el, nem méretükben. Az allélspecifikus felismerés az *S*-RN-ázokat jellemző kisebb-nagyobb szekvencia-különbségeken alapul. Amennyiben két fehérje aminosav-szekvenciája különbözik egymástól, akkor feltehetően eltérő a fehérjékben a különböző disszociációs tulajdonsággal rendelkező aminosavak aránya is. Ez azt jelenti, hogy adott kémhatás mellett, adott pH-értéknél más töltés jellemző rájuk, így izoelektromos fókuszálással (IEF) elkülöníthetők egymástól.

Elsőként Sassa és mts. (1992) használták ezt a technikát japánkörtefajták vizsgálatához. A következő faj, amelynél a termesztett fajták kölcsönös termékenyülési képességeit ezzel a technikával jellemezték a cseresznye volt (Bošković és Tobutt, 1996; 2001; Bošković és mts., 1997), valamint meggyénél (Tobutt és mts., 2004; Bošković és mts., 2006) is jelentős eredményekről számoltak be a kutatók. Később a gyümölcsfajok száma az évek során egyre inkább bővült.

Az izoelektromos fókuszálás mellett említést érdemel az ún. nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE). A technika leírói (O'Farrell és mts., 1977) ezt a módszert a kétdimenziós gélelektroforézis kezdeti lépéseként alkalmazták. A NEpHGE esetében is a fehérjék katód irányába történő vándorlása történik a gélfuttatáskor, a futtatást azonban a fehérjék izoelektromos pontjának elérése előtt leállítjuk. A NEpHGE technikát is alkalmazták cseresznyénél (Bošković és Tobutt, 2001) és meggyénél (Tobutt és mts., 2004; Hegedűs és mts.; 2008).

A fehérje-alapú vizsgálatok nagy előnyeként mondható el, hogy a szabadföldi termékenyülés vizsgálatokkal valamint a pollentömlő vizsgálatokkal ellentétben, lehetővé válik az egyes *S*-allélok direkt módon történő azonosítása, ugyanakkor a vizsgálathoz továbbra is virágzó fákra van szükség.

2.4.4. A termékenyülés molekuláris szintű kutatása – a DNS-alapú vizsgálatok

Brace és mts. (1993) végezték el az *S*-allélok első DNS-alapú, polimeráz láncreakcióval (PCR) történő azonosítását. A munkacsoport a sporofitikus önmeddőséget mutató *Brassica oleracea* termékenyülését jellemezte. A korábbi munkák eredményei alapján már ismert szekvenciák jó alapot adtak a primerek tervezéséhez, az amplifikáció során felszaporított

fragmentumokat – az egyes *S*-allélokat – pedig restriktív endonukleázokkal hasítva választották szét.

2.4.4.1. A bibekomponens, azaz az *S-RN-áz* gén molekuláris vizsgálati technikái

A gametofitikus típusú önmeddőséget mutató fajok közül elsőként a *Solanum carolinense* fajt vizsgálták. A bibeszövetből mRNS-t vontak ki, majd reverz transzkripciót (RT) követően amplifikáltak *S*-allél szekvenciákat (Richman és mts., 1995). A kapott fragmentumokat hasították, és igazolták, hogy a GSI rendszer működése következtében valamennyi önmeddő genotípus heterozigóta. Homozigóta genotípus abban az esetben alakulhat ki, ha az *S*-allélok közül egy, vagy akár mindkettő funkcióvesztésen esett át. A parthenokarp úton kialakult termésekben esetlegesen előforduló magvakból is homozigóta növények keletkezhetnek (Verdoodt és mts., 1998).

A rózsafélék (*Rosaceae*) családjában elsőként az almánál értek el eredményeket. DNS-alapú markerezési technikával sikerült *S*-allélokat azonosítani (Broothaerts és mts., 1995). Meghatározták a bibeszövetekből származó *S-RN-áz* fehérjék N-terminális végi aminosavszekvenciáját. A kapott adatok alapján került sor PCR-primerek tervezésére. A bibeszálakból mRNS-t vontak ki, majd reverz transzkripció során cDNS-t szintetizáltak. A genomi- és a cDNS-szekvenciákat összevetve megállapították az almatermésűekre jellemző egyetlen intron pozícióját, valamint az *S*₂- és *S*₃-allélok intronjai közötti méretkülönbséget. Az almatermésűekre jellemző, *S-RN-áz* génen belüli egyetlen intron allélok közötti méretbeli eltérése igen csekély mértékű, ezért az *S*-genotípus megbízható azonosítása érdekében allélspecifikus primerek használata szükséges, vagy a konszenzus primerekkel amplifikált fragmentumok *S*-allél-specifikus restriktív enzimekkel történő hasítása, azaz ún. PCR-RFLP technika alkalmazása.

Almánál (Goldway és mts., 1999; Schneider és mts., 2001; Kitahara és Matsumoto, 2002b; Broothaerts, 2003), valamint európai körténél (Zisovich és mts., 2004a;b) eredményesen alkalmazták az allélspecifikus primereket az *S*-genotípus meghatározásához. Japánkörténél (Ishimizu és mts., 1999; Kim és mts., 2004), európai körténél (Zuccherelli és mts., 2002; Takasaki és mts., 2006) és alma esetében (Kitahara és Matsumoto, 2002a) pedig a PCR-RFLP technikát használták sikerrel.

Alma esetében kidolgozásra került egy olyan *S*-genotípus meghatározására alkalmas technika is, ahol az allél-specifikus primerekkel végzett PCR-t követően a PCR-fragmentumokat restriktív enzimes emésztésnek vetik alá. Ezáltal tovább növelik az adott

allél kimutatásának megbízhatóságát. Így további alma *S*-allélok detektálására nyílt lehetőség (Janssens és mts., 1995; Matsumoto és mts., 1999; Matsumoto és Kitahara, 2000; Van Nerum és mts., 2001; Kitahara és Matsumoto, 2002b; Matsumoto és mts., 2003).

A *Prunus* nemzetség fajaira – az almatermésűekkel ellentétben – két intront tartalmazó *S-RN-áz* allélok jellemzőek (Ushijima és mts., 1998; Igc és Kohn, 2001). Az *S-RN-áz* gén két intronjának pontos elhelyezkedése a 2. ábrán látható. Az *S-RN-áz* gén 2. intronja a C2 és C3 konzervatív régiók közötti rendkívül változékonny régióba ékelődik. A 2. intron méretben meglehetősen polimorf, mely megkönnyíti a csonthéjas gyümölcsfajok *S*-genotípusának DNS-alapon történő kimutatását.

Amennyiben az *S-RN-áz* gén 2. intronjától 3' és 5' irányban található konzervatív régiókra primereket tervezünk, majd PCR-reakciót mérünk össze, a fragmentumok agaróz gélen allélspecifikusan, az adott *S*-genotípusra jellemző mintázatot mutatnak.

Elsőként Tao és mts. (1999) terveztek cseresznye *S*-genotípus vizsgálatra konszenzus primereket (Pru-T2, Pru-C2 és PruC4R), melyeket cseresznye cDNS-szekvenciákból terveztek. Két évvel később, Wiersma és mts. (2001) illetve Sonneveld és mts. (2001) újabb konszenzus primereket terveztek. Sutherland és mts. (2004) 27 *S-RN-áz* allél szekvenciájának felhasználásával terveztek konszenzus primereket, melyek a korábbi primerekhez képest sokkal hatékonyabban működtek több *Prunus* faj esetében. Ezek használatával sikerült a legtöbb ismert cseresznye, mandula és kajszi *S-RN-áz* allélt kimutatni.

Olykor az egyes *S-RN-áz* allélok intronjainak mérete között annyira kicsi a különbség, hogy agaróz gélelektroforézist követően az allélokat reprezentáló fragmentumok nem különböztethetők meg. Ekkor lehetőség nyílik az *S-RN-áz* gén hipervariábilis régiójához és/vagy az intronrégiókhoz kötődő allélspecifikus primerek tervezésére. Az első allélspecifikus primereket a termesztett fajtákban azonosított tizenhárom *S-RN-áz* allélra (S_1 - S_7 , S_9 , S_{10} , S_{12} - S_{14} és S_{16}) Sonneveld és mts. (2001; 2003) közölték.

A különböző allélok intronméretei között fennálló csekély méretkülönbség okozta problémák megoldása érdekében növelhetjük a meghatározás felbontóképességét. Ezt a technikát a mikroszatellit markerek vizsgálatokor is rutinszerűen alkalmazzák, miszerint az 500 bp méretnél kisebb fragmentumok mérete fluoreszcens jelöléssel (például FAM, 6-FAM, JOE, TET stb.) ellátott primerekkel végzett amplifikációt követően, a keletkezett fragmentumok automata szekvenátorban történő kromatográfiás futtatásával is meghatározható.

Cseresznyefajták *S*-genotípusának meghatározására Sonneveld és mts. (2006) alkalmazták először ezt a megközelítést, akik mind a 13 ismert *S-RN-áz* allél esetében meghatározták az 1. intron régiót magába foglaló PCR-fragmentumok pontos méretét, ami

234 bp és 460 bp között változott. Az S_2 - és S_7 - cseresznye S -RN-áz allélok első intronrégiójának mérete azonosnak mutatkozott. Az S_{13} -allél esetében különböző fajtáknál mikroszatellit régiókhoz hasonló, eltérő fragmentum-hosszakat detektáltak. Ezek későbbi részletes vizsgálata kimutatta, hogy az allél mindkét intronjában (AT) ismétlődő egységek találhatók, melyek tagszáma fajspecifikus különbséget mutat (Marchese és mts., 2010). Ezek felhasználásával a vizsgált 14 termesztett cseresznye, 17 vadcsesznye és 42 meggy megbízhatóan elkülöníthető volt.

2.4.4.2. A pollenkomponens, azaz az S -haplotípus-specifikus F -box gén molekuláris vizsgálatának módszere

A *Rosaceae* GSI rendszerének pollenkomponens génjét az S -genotípus meghatározásához elsőként Yamane és mts. (2003b) használták. Hasítást végeztek *Hind*III restrikciós enzimmel, a fragmentumokat szétválasztották, majd jelölt Pm -SFB cDNS-t hibridizáltak hozzájuk. A japánkajszi S_1 – S_7 alléljainál egy sávot kaptak, az S_f -allélnál azonban kettőt. Eleinte ezt a jelenséget két eltérő SFB gén jelenlétével magyarázták, később azonban kiderült, hogy az SFB_f szekvenciájában megtalálható egy beékelődő nukleinsav szakasz, mely több *Hind*III hasítóhelyet tartalmaz (Ushijima és mts., 2004).

Lewis és Crowe (1954) igazolták, hogy az öntermékenyülést cseresznye esetében a pollenkomponens génben – nagyenergiájú röntgensugárzás hatására – végbemenő funkcióvesztéses mutáció eredményezte. Ushijima és mts. (2004) meghatározták a cseresznye mutációt szenvedett SFB_4' -alléljának szekvenciáját. Ezt követően a nemesítési projekteknél egyszerűen használható, mégis költséghatékony molekuláris markerezési eljárás kidolgozása volt a cél.

Ikeda és mts. (2004b) ún. nested PCR-technikával amplifikálták az SFB_4 - és SFB_4' -allélokot, s poliakrilamid gélen (6 % PAGE) tették láthatóvá a fragmentumokat. Ha a felszaporított fragmentumokat az SFB_4' -allélra specifikus restrikciós endonukleázokkal emésztették, már agaróz gélen is látható mintázatot kaptak. Zhu és mts. (2004) az SFB_4' -allélra specifikus primereket terveztek, így az adott allél egyszerű és közvetlen detektálását érték el, mely eredmények a nemesítési programokban felhasználhatók.

Sonneveld és mts. (2005) mind az SFB_3 -, mind az SFB_4 -allélra specifikus primert terveztek. Igazolták, hogy az öntermékenyülést nem a heteroallélikus pollen okozza. Az SFB_4 -specifikus primer, a PaSFB4 esetében az S_4 - és S_4' -allélok PCR-fragmentumai agaróz gélen nem voltak elkülöníthetők egymástól, de az SFB_3 -allélra specifikus PaSFB3 csak az S_3 -

allélt amplifikálta. Az S_3' nem szaporodott fel, mert ennél az allélnál az SFB_3 -gén deléciós mutációt szenvedett.

A *Prunus* fajokra jellemző, hogy SFB génjük 5' vége felőli át nem íródó régióján egy 100 bp körüli mérettel rendelkező intron helyezkedik el (Ushijima és mts., 2003; Yamane és mts., 2003b). Vaughan és mts. (2006) ezt az intronrégiót körülvevő szekvenciarezsre tervezett fluoreszcens jelöléssel ellátott primereket. Az így felszaporított SFB -fragmentumok közül több allélnál megegyező méretet detektáltak. Annak érdekében, hogy az adott allélt azonosítsák, multiplex PCR-t használtak, azaz az $S-RN$ -ázok 1. intronrégióját felszaporító és az SFB -re tervezett primereket egyidejűleg, egy PCR során használták. A multiplex PCR alkalmazható az allélspecifikus PCR-reakciók alternatívájaként, ami főként nagy mintaszám esetében lehet előnyös (Vaughan és mts., 2006).

Az S -lókusz vizsgálatára irányuló egyes módszerek közül kétségkívül a DNS-alapú technikák költségvonzata a legjelentősebb, a megfelelő laboratóriumi felszerelés valamint a nagy vegyszerigény miatt. Legfőbb előnye, hogy már a csírákorú magoncok esetében használhatók ezek a technikák, vagyis a több éves várakozás, míg az adott fa termőre fordul, elmarad (Halász és Hegedűs, 2006). A különböző kutatók által elért eredmények, azaz az S -allél szekvenciák nemzetközi adatbázisokban hozzáférhetők (EMBL/GenBank/DDBJ).

2.5. A cseresznye (*Prunus avium* L.) taxonómiája és származása

A cseresznye (*Prunus avium* L.) az *Eurosid I (fabid)* klád *Rosales* rendjének *Rosaceae* növénycsaládjába, azon belül a *Prunoideae* alcsaládba tartozik (Stevens, 2012). A *Prunoideae* alcsaládon belül a *Microcerasus*, *Pseudocerasus*, *Eurocerasus* és *Mahaleb* fajcsoportokat (*sectio*) különböztetjük meg (Bailey, 1927; Rehder, 1958). A *Pseudocerasus* fajcsoportba tartozik számos dísznövényként tartott faj, pl. a *Prunus pseudocerasus* és a *Prunus speciosa*, míg az *Eurocerasus sectio*-ba soroljuk a termesztett cseresznyét, meggyet (*Prunus cerasus*) és a csepleszmeggyet (*Prunus fruticosa*). A cseresznye általában diploid ($2n = 16$), ismerünk azonban triploid ($3n = 24$) és tetraploid ($4n = 32$) egyedeket is.

A cseresznyefajok spektruma igen széles, megközelítően 30 cseresznyefajt ismerünk. Ezek közül említést érdemel a vadcsesznye (*Prunus avium* ssp. *avium*), mely fajt a kocsányos-tölgyesekben a lombkoronaszint jellemző fájaként tartanak számon a tölgy, gyertyán, hárs és juhar fajok mellett. Dísznövényként használják főleg Japánban a díszcsesznye (*Prunus serrulata* Lindl.) és a higancsesznye (*Prunus subhirtella* Miq.) díszfa fajokat. Fontos szerepet tulajdonítunk a díszfaiskolákban a cseresznye és meggy

alanyaként használt sajmeggynek (*Prunus mahaleb* L.) is. A termesztésbe vont meggy egyik szülő növényfajaként a csepleszmeggyet tartják számon (*Prunus fruticosa* Pall.). A különböző cseresznye- és meggytípusok rendszerezését első ízben Hogg (1860) végezte el, mely szerint léteznek puha és kemény húsú cseresznyék, ezeken belül is sötét és világos hússzínűek.

A *Prunus avium* alakköre igen változatos, ebbe a fajba három különböző taxont soroltak: ssp. *avium* (*sylvestris*, *actiana*) – valódi madárcseresznye, convar. *juliana* – szívcsesznyék, convar. *duracina* – ropogós cseresznyék (Terpó, 1974). A termesztett taxonok a vad alakoktól származtathatók (Tóth és Simon, 2009). A termesztők eligazodását segítő mesterséges rendszer hat csoportot tartalmaz, ami nem egyezik meg a botanikai rendszerezéssel. Ebben a cseresznyefajtákat színük szerint három fő csoportra osztották: fekete, tarka és sárga cseresznyék. Ezeken a csoportokon belül megkülönböztették a szívcsesznyéket és a ropogós cseresznyéket, így alakult ki a 6 különböző csoport (Mohácsy és Maliga, 1956).

A cseresznyefajták növekedésében és habitusában is határozott eltérések vannak. A fajták növekedési erélyében (*vigor*) nincsenek olyan nagy különbségek, mint például az őszibarack esetén. Egy igen erős növekedésű fajta nagyjából kétszer akkora koronát fejleszt, mint egy gyenge növekedéssel jellemezhető spur fajta. A növekedésük alapján 4 kategóriába sorolhatjuk a fajtákat: igen erős: ‘Germersdorfi 1’; erős: ‘Hedelfingeni óriás’; középerős: ‘Katalin’, ‘Alex’; gyenge: ‘Compact Stella’. A fák habitusa alapján 3 fő típust különítenek el: feltörő, széthajló valamint lecsüngő (Tóth és Simon, 2009).

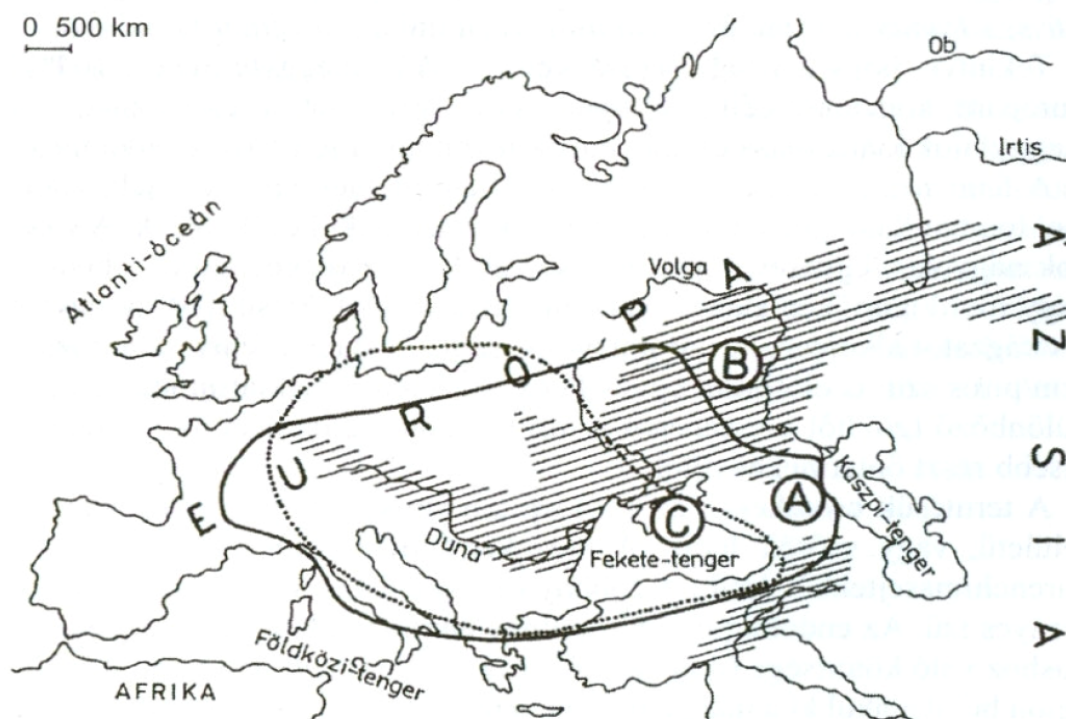
A cseresznye az egyik legrégebben termesztésben lévő gyümölcsfajunk, az első írásos emlékek mégis csupán i.e. 300-ban tesznek róla említést (Faust és Surányi, 1997). Az elsődleges vélt géncentruma Nyugat-Ázsia területére tehető, a mérsékelt égövi régióra (De Candolle, 1894). Ezen belül a Fekete-tenger déli partvidéke, a nyugat-anatóliai régió szerepét mint elsődleges géncentrumot erősen vélelmezték annak köszönhetően, hogy a latin *Cerasus* szó feltehetően a hajdani pontuszi Kerasun város nevéből származik. Ez a régió jelenleg Törökországban található, mai elnevezése Giresun (Faust és Surányi, 1997). Hedrick (1915) ezzel szemben úgy gondolta, hogy Kerasun város kapta a nevét a gyümölcseről, nem fordítva. Ezen vélekedés szerint azért nevezték el Kerasunt a cseresznyéről, mert itt voltak megtalálhatók a legjobb minőségű gyümölcset adó fák. Lucullus és mások itt szerezték be, és innen kiindulva terjesztették el a legjobb változatokat. Ilyen módon, a termesztett cseresznye géncentruma nagy valószínűséggel valóban erre a régióra tehető.

A Vavilov-féle géncentrum rendszerezés alapján a cseresznye az elő-ázsiai géncentrum fajait gazdagítja (Vavilov, 1926) (6. ábra). Ezen elterjedési régió alatt Kis-Ázsia belső részeit, a Kaukázust, Iránt illetve Türkmenisztán fennsíkos területeit értjük. A cseresznye másodlagos

géncentrumának az európai központ (IX.) tekinthető, ahol a ma is természetben lévő kultúrfaj valamint a cseresznyével rokon fajhibridek kialakulása valószínűsíthető.

A meggy szülőfaja feltételezések szerint a cseplésmeggy (*Prunus fruticosa* Pall.). Ez a faj Közép- és Délkelet-Európa szubmediterrán területein tekinthető őshonosnak (Tomcsányi, 1979). A vadcsereznye (*Prunus avium* ssp. *avium*) Dél-Amerikában meglehetősen ritkaságnak számít, de a Kaszpi- és a Fekete-tenger között, valamint az ettől délre húzódó területeken nagy gyakorisággal megtalálható (6. ábra) (Mohácsy és Maliga, 1956).

Molekuláris vizsgálatok arra utalnak, hogy a cseresznye domesztikációja nem egy területre korlátozódó, egyszeri eseménynek tekinthető, hanem számos helyen került sor a kiválasztott vadon termő egyedek természetbe vonására (Mariette és mts., 2010). Ezt követően a természet és vadcsereznye állományok közti allélcsere is számos területen intenzív maradhatott. Molekuláris markerekkel (SSR és *S*-lókusz) domesztikációs szindróma nem volt kimutatható, ugyanakkor a modern nemesítési programok hatására a cseresznyét jellemző genetikai diverzitás jelentős része elveszett.



6. ábra. A meggy (A, összefüggő vonallal körbezárt terület), a vadcsereznye (B, csíkozott terület) és a cseplésmeggy (C, pontozott vonallal határolt terület) származási helye és areája (Faust és Surányi, 1997).

2.6. A cseresznyetermesztés helyzete és a cseresznye felhasználásának lehetőségei

A nemzetközi szakirodalomban a cseresznyét és a meggyet legtöbbször egyetlen szóval, a „cherry”-vel illetik, s a két faj megkülönböztetésére szolgáló „sweet” (édes) és „sour”, vagy „tart” (savanyú) jelzőket ritka esetben használják. A két fajra összevonva jelennek meg a statisztikai adatok, mely meglehetősen megnehezíti a cseresznyetermesztés mindenkori helyzetének és jelentőségének egzakt megítélését és felmérését.

A világon az összes cseresznye- és meggytermés közel 2,1 millió tonna (Faostat, 2010). Ennek közel 40 %-át Ázsiában, 35 %-át Európában és 20 %-át Amerikában termelik. Az öt legjelentősebb cseresznye- és meggytermesztő ország Törökország, az USA, Irán, Európán belül pedig Olaszország valamint Spanyolország (Kállayné, 2003). A legnagyobb termésmennyiséget az USA produkálja 284.130 tonnával, melyhez képest Magyarország termés mennyisége 5.758 tonna (Faostat, 2010). A cseresznye- és meggykereskedelemben Európa továbbra is a legjelentősebb földrész. A világ exportált termésének körülbelül 37 %-a az európai térségből származik. Az amerikai kontinens bonyolítja le az export 33 %-át, Ázsia pedig a 28 %-át, ami szintén jelentős mennyiségnek számít. A legnagyobb felvevőpiac Európa, ami nem csupán a cseresznyére jellemző. A külföldre eladásra szánt cseresznye és meggy mennyiségének 64 %-a Európában kerül forgalomba (Faostat, 2010).

A cseresznye Közép-Európa területén, tehát Magyarországon is őshonosnak tekinthető gyümölcsfaj. A cseresznye a csonthéjas gyümölcsök körében a kajszit és az őszibarackot követve, de a meggyet és a szilvát megelőzve virágzik. A legtöbb gyümölcsfaj virágzási idejét számba véve a cseresznye a közép-korai csoportba sorolható (Soltész, 2000).

A gyümölcsstermesztésről szóló legkorábbi írások szerint a cseresznyét hazánk egész területén termesztették, a magyarság szívéhez közelálló gyümölcs volt. Nagyon korán kialakultak Magyarországon a cseresznye termesztési körzetei, melyeket manapság már hagyományos termőtájoknak is tekinthetünk: a Duna-Tisza közének déli része, Szeged és Kelebia térsége, Mátraalja (Eger-Gyöngyös), Észak-Buda területe (Solymár, Szentendre, Dunabogdány). Hazánk tájkörzeteiben a XV.-XVI. századra már tizenkét tájfajta kialakult, melyek közül több fajta Európában is elhíresült (Apostol és Brózik, 1998).

A Központi Statisztikai Hivatal 1895-ben hazánk területére 1,1 millió cseresznyefát jegyzett be, mely adat 1935-re az általános gyümölcsfa összeírás idejére megkétszereződött. Ezt követően a trianoni béke következtében elcsatolt országrészek a gyümölcsstermesztés

jelentős kiesését eredményezték. A területi veszteséget újabb gyümölcsös telepítésével próbálták ellensúlyozni, de ez a törekvés a II. világháború miatt félbeszakadt.

A 1961 és 1965 között lezajló kampányszerű telepítéssel az árugyümölcsösökben ugyan nagymértékű faállomány növekedés volt tapasztalható, a nagyüzemi műveléssel a szórványgyümölcsösök valamint a szőlők közötti fák száma megcsappant. A cseresznye megmaradt a kisárutermelés gyümölcsének a nagyüzemi termelés 1960-1990 közti időszakában (Kállayné, 2003).

Jelenleg hazánkban 6.000-8.000 tonna közé tehető a cseresznye éves termésmennyisége. Az 1990-es évek hajnalán, Magyarországon 25.000 tonna körül alakult a cseresznyetermesztés mértéke, majd a korszerűtlennek bizonyuló, elöregedett (3-5 t/ha hozamú) ültetvényeket kivágták. Később, a '90-es évek derekától az össztermés 20.000 tonna körülire volt tehető, melyet további csökkenés követett 15.000 tonnára. A 2002. és 2003. években tapasztalt kedvezőtlen időjárás – fagyok és nagymértékű monília-fertőzés – miatt a cseresznye termésmennyisége 10.000 tonna alá csökkent. Az elmúlt pár évben korszerű művelésmódú, intenzív cseresznyeültetvények kerültek telepítésre, melyeknek a termőre fordulás utáni termésátlaga magyarországi viszonylatban megközelítően 10-15 t/ha (Tóth és Simon, 2009).

Világviszonylatban ugyanakkor egyre inkább nő a kereslet a jó gyümölcsminőséggel rendelkező cseresznye iránt. Nagy gyümölcsméretű, biztonságosan termesztethető és jól szállítható cseresznyefajták telepítésére van szükség intenzív termesztésmód alkalmazása mellett. Hazánkban mindehhez az ökológiai feltételek megfelelőek, magyar cseresznyefajtáink az európai és amerikai fajtákkal versenyképes piacot tudnak kialakítani.

A gyümölcs felhasználása tekintetében a cseresznye gyümölcse a legnagyobb hányadban friss fogyasztásra szánt, hiszen az év első vitaminforrásaként, a tavaszi és kora nyári időszak első gyümölcseként fogyaszthatjuk. A kora nyárig, azaz június első dekádjáig beérő, sötét színű gyümölcsöket tehát friss fogyasztásra értékesítik. Az egyes cseresznyefajták felhasználásának iránya a gyümölcs színétől, az érés idejétől, valamint a fizikai és a beltartalmi tulajdonságaitól függ. A középidőben beérő, illetve a későn érő fajták nagy része többhasznosítású, az elsődleges friss fogyasztás mellett feldolgozásra egyaránt alkalmasak (Soltész, 1998; Kollár, 2003).

A friss fogyasztásból hátrányba kerültek, majd teljesen kiszorultak a piros színű, de puhuló húsállományú, valamint a fekete-tarka színű fajták. Ehelyett a frisspiacon előtérbe kerülnek a nagy gyümölcsméretű (28-30 mm), bordóspiros színű, ropogós húsállománnyal rendelkező, kézzel, kocsánnyal együtt leszüretelt cseresznyék. Nagyon fontos továbbá, hogy

rekeszen belül homogén színű, méretű és érettségi állapotú, továbbá tárolásra és gépi osztályozásra alkalmas legyen (Szabó és mts., 2011).

A hazánkban termesztett korai fajták május közepe-végi éréssel nem tudják felvenni a versenyt a spanyol és török importáruval sem gyümölcsminőség, sem mennyiség tekintetében. A június elejei termésérésű hibridek, mint például a 'Tünde', 'Carmen', 'Vera' az európai piacokon is értékesíthetők. A július eleje-közepe táján érő, azaz kései szezonú cseresznyefajták hazánkban kedvezők, mert ekkor a tőlünk délre húzódó országok nem szállítanak cseresznyét a nemzetközi piacokra, ám az exportpiac gyümölcsminőséggel és -mennyiséggel szemben támasztott követelményeinek ekkor is meg kell felelni (Tóth és Simon, 2009).

A feldolgozásra szánt cseresznye a tartósítóipar egyik fontos nyersanyaga, befőtt-készítés gyanánt, valamint légyártás és gyorsfagyasztás céljára. Ugyan az édesipar cukrászati célra, a szeszipar pálinkakészítésre előszeretettel használja, de ennek mértéke nem túl jelentős (Faluba, 1982; Tóth és Simon, 2009).

A nyugat-európai és amerikai területeken a sárga gyümölcsszínnel rendelkező cseresznyefajtákból készített beföttek iránt nagy a vásárlói igény, ennél fogva a befőtt-készítés célfajtái általában sárga vagy tarka színűek. Ezzel ellentétben Magyarországon, mivel a sárga gyümölcsszínű fajták száma a termesztésben meglehetősen csekély, kizárólag a sötét színű gyümölcsökből készülnek beföttek (Tóth és Simon, 2009).

Említést érdemelnek a fekete színű, festőlevű cseresznyefajták is, melyek leginkább gyorsfagyasztásra, légyártásra, élelmiszerszínezésre alkalmazhatók. Az élelmiszeripar szívéhez egyre közelebb kerülnek a természetes színezékek, ezért a festőlevű fajták iránt megnövekedett a kereslet.

A festőlevű fajták egészségvédő hatással rendelkeznek, melynek háttere több mint egy évtizede kutatott. A kedvező élettani hatás kialakításában egyrészt a színanyagoknak, másrészt más antioxidáns hatással bíró polifenolos vegyületeknek van fontos szerepe. A gyümölcsök antioxidáns kapacitása a későbbiek során a gyümölcsök minőségét meghatározó paraméterek közé tartozhat (Díaz-Mula és mts., 2009; Szikriszt és mts., 2011a; Tóth és Simon, 2009).

2.7. A cseresznyenemesítés történeti áttekintése

A cseresznyenemesítést az időszámításunk előtti időktől fogva egészen a XVII. századig a magról szaporított cseresznyefák közül a legértékesebb egyedek szelektálása, majd azok továbbszaporítása határozta meg. Angliában, Franciaországban és Németország területén ebben az időszakban terjedt el a szabadmegporzású magoncok pomológiai jellemzése, majd ezek közül a fajták szelektálása. A 'Germersdorfi óriás', a 'Boppardi korai' és a 'Hedelfingeni óriás' fajták kialakulása is így zajlott, melyek később hazánkban is elterjedtek. A Kárpát-medence már ekkoriban bőven büszkélkedhetett táj- és helyi cseresznyefajtákkal, mint például a 'Badacsonyi óriás', a 'Cserszegi mézes' és a 'Disznódi fűszeres' (Pór és Faluba, 1982).

A tudatosan végzett keresztezéses nemesítés kezdete országonként más és más időpontra esik, de általánosan elmondható, hogy a XIX. század végén, a XX. század elején indult meg. A nemesítési munka 1895-ben kezdődött az USA-ban és Anglia területén. Az 1910 és 1920 közötti időszakban a nemesítést elméleti alapokra helyezve végezték Amerikában (Davis, Geneva), Kanadában (Vineland), Angliában (East Malling), valamint Németországban (Dresden-Pillnitz) (Pór és Faluba, 1982).

Az 1900-as években röntgen- és kobaltbesugárzással öntermékenyülő, gyenge növekedésű (spur) fajták sikeres előállításuk zajlott. Ezek a jellemzők a mutációs nemesítést megelőzően egyetlen világfajtáról sem voltak elmondhatók. Az 1950-es évek tájékán L.K. Lewis indukált mutáció során hozott létre öntermékenyülő cseresznye-hibrideket az angliai John Innes Intézetben. Az előállított hibrideket Cherry Self Fertile 45, és 46-nak nevezte el. A hibridek produkciója igen gyenge volt mind a termésmennyiség, mind a termés minőségének tekintetében (Lewis, 1949).

1971-ből Lapins nevéhez fűződik az első gazdaságilag is jelentősnek mondható, értékes öntermékenyülő fajta, a 'Stella'. Lapins munkája megfelelő alapot teremtett az első gyenge növekedési eréllyel jellemezhető és öntermékenyülő fajták előállításához, mint például 'Lambert spur 1', '2', '3' és a 'Stella spur'. Innentől kezdve lehetőség nyílt az elismert, már létező fajták spur változatainak előállítására is pl. a 'Napoleon', 'Bing' és 'Van' fajtákból. Az Amerikai Egyesült Államokban és Kanadában több öntermékenyülő fajta nemesítése zajlott sikeresen, mint például 'Sunburst', 'Sweetheart' és 'Sonata' (Apostol és Brózik, 1998).

A tájfajták valamint a helyi fajták felkutatása is megindult a keresztezéses és a mutációs nemesítési munkák mellett. Ez a típusú munkafolyamat ugyan költséghatékonyabb módszer, és kevesebb szaktudással elvégezhető, mégis több értékes, a termesztésben jelentős, elismert

fajta kialakulását eredményezte. Így kerültek természetbe a 'Bigarreau Burlat', 'Vega' és a 'Szomolyai fekete' cseresznyefajták (Pór és Faluba, 1982).

A klónszelekciós munkákhoz a II. világháborút követő időszakban fogtak hozzá. A cseresznyefajtákról elmondható a genetikai stabilitás, vegetatív hasadás kevésbé jellemző rájuk, mint a meggyfajtákra. Több cseresznyeklónt részesítettek állami elismerésben ('Germersdorfi 1', 'Germersdorfi 3', 'Germersdorfi 45') (Apostol és Brózik, 1998).

Magyarországon a cseresznyetermesztés atyjaként Brózik Sándort tartjuk számon, aki a hagyományos termesztő tájakban a helyi állományok felmérésének, tájfajták gyűjtésének, szelekciójának irányítója volt. A szelektált, értékesnek tartott változatokat több termőéven át megfigyelte, majd kiválasztotta a legkiválóbb pollenadó párokat. A tájszelekció eredményeként jött létre a 'Solymári gömbölyű', a 'Pomázi hosszúszarú' és a 'Szomolyai fekete'. Brózik honosította a 'Germersdorfi óriás' fajtát, s rövid idő alatt az ország legnagyobb részén termesztett fajtává vált (Apostol, 2003).

Brózik keresztezéses nemesítői munkásságát öt szakaszra oszthatjuk. Az 1953-1957 közé tehető első ciklus során fő szülőfajtaként a 'Germersdorfi óriás' fajtát használta fel, melyet a 'Budakalászi helyi fekete', a 'Podjebrád' és a 'Hedelfingeni óriás' fajtákkal keresztezett, valamint szelektált a 'Germersdorfi' szabadbeporzású magoncaiból (Pór és Faluba, 1982). E munka gyümölcse négy államilag elismert cseresznyefajta lett, a 'Margit', a 'Linda', a 'Katalin' és a 'Kavics'.

A második nemesítői munkaszakasz 1972-től kezdődött, amikor is fő célul öntermékenyülő fajták előállítását tűzte ki. Az angliai John Innes Intézetből származó Cherry Self Fertile 45 és 46 hibridekkel porozta Brózik a 'Ljana', a 'Van' és a 'Kavics' fajtákat, s a kapott magoncokat szelekciónak vetette alá. Így keletkeztek az öntermékenyülő 'Alex' és a kései érésű 'Vera' cseresznyefajták.

A harmadik ciklus az 1974 és 1984 közötti időszakot ölelte fel, amikor a szelekció alapját a 'Ljana', a 'Bigarreau Burlat', a 'Van', a 'Trusenszkaja 2', a 'Sárga Dragán' és a 'Hedelfingeni óriás' hibridjei, F₂-es visszakeresztezett nemzedékei, valamint a 'Bigarreau Burlat' és az öntermékenyülő 'Stella' hibridjei adták. A hibridizációs munka eredményeként kialakult a tradicionális fajták közül a 'Rita', a 'Carmen', az 'Aida', illetve az öntermékenyülő fajták közül a 'Petrus', a 'Paulus' és a 'Sándor' (Apostol, 2003).

A negyedik munkaszakasz 1987-től kezdődött. Ekkor az öntermékenyülő világfajták, azaz a 'Stella', a 'Sunburst', és a 'Celeste', valamint a magyar öntermékenyülő hibridek keresztezése folyt.

Az ötödik ciklust 1998-tól tartjuk számon, amikor is a világon első ízben indult meg a cseresznye különböző betegségeit előidéző kórokozókkal (mint például *Blumeriella jaapi*,

Cytospora cincta) szembeni rezisztens fajták előállítására. Az ezzel kapcsolatos keresztezési eredmények még nem kerültek a köztermesztésbe.

A cseresznyenemesítés során kitűzött célok közé sorolhatjuk a megfelelő termésmennyiség, termésbiztonság, gyümölcsminőség elérését. Fontos cél még a cseresznyeszezon széthúzó, vagyis korai és kései fajták nemesítése. A nemesítők, cseresznyetermesztők számára egyre fontosabb tényező a megfelelő gyümölcskötődés, tehát vagy az öntermékenyülés, vagy megfelelő pollenadó fajták kiválasztása. Továbbá elvárás még a termesztők részéről az intenzív művelésre való alkalmasság, a nagyfokú ökotolerancia, és különösen a repedéssel szembeni ellenálló képesség. Egy mai modern fajta esetében fontos, hogy minél több kártevővel, betegséggel szemben ellenálló legyen.

Kereskedelmi szempontból kiemelhető a pulpon tarthatóság, tárolhatóság, szállíthatóság, mely tényezőket már a nemesítés során figyelembe kell venni. A beltartalmi paraméterek nyomon követése igen nagy jelentőségű. Egyrészt a feldolgozóipar elvárásai is bővülnek ilyen téren, másrészt a fogyasztók körében is egyre nagyobb az igény és a kereslet a minél kedvezőbb egészségi hatású gyümölcsök iránt.

2.8. A cseresznye (*Prunus avium* L.) *S*-allél rendszere

Lippay 1667-ben, a „Posoni kert” Gyümölcsös kert című harmadik kötetében leírta azon megfigyelését, hogy a cseresznyefái bőségesen virágoznak, ugyanakkor a gyümölcskötődés mértéke elhanyagolható. A jelenség háttérében álló önmeddőséget azonban csak közel 250 év elteltével ismerték meg részletesebben. Az első kölcsönösen inkompatibilis fajtákat már az 1900-as évek elején ismerték, szabadföldi keresztezéses kísérletek alapján publikálták (Crane és Lawrence, 1929). Majd Crane és Brown (1937) 45 cseresznyefajtát soroltak be összesen 11 inkompatibilitási csoportba. Az inkompatibilitási csoportok száma a XX. század derekára 12-re emelkedett. Az egy azonos inkompatibilitási csoportba tartozó fajták egymást nem képesek megtermékenyíteni.

Matthews és Dow (1969) teszt-keresztezésekre alapozva, hat cseresznye *S*-allélt azonosítottak, melyek az S_1 - S_6 elnevezést kapták, ezen felül mintegy 160 cseresznyefajta *S*-genotípusát tették közzé. A fajtákat tíz inkompatibilitási csoportba sorolták, valamint kialakítottak egy ún. „0” csoportot az addig ismeretlen *S*-genotípusú fajták számára, melyek minden más genotípust/fajtát termékenyíteni tudtak ún. univerzális pollenadóként.

A termesztésben lévő cseresznyefajtákban összesen tizenhat, míg a vad cseresznyepopulációkban mindösszesen tizenkét *S*-allél jelenlétét igazolták (Békefi és mts., 2003; De Cuyper és mts., 2005; Tobutt és mts., 2005). Lacis és mts. 2008-ban svéd és lett fajták *S*-genotípusát határozták meg.

Napjainkban eddig mintegy 500 cseresznyefajta *S*-genotípusát ismertük meg, melyek között 44 inkompatibilitási csoportot tartunk számon. Tobutt és mts. (2005) 26 inkompatibilitási csoportot írt össze a klasszikus és molekuláris adatok feldolgozásával. A csoportok számát később Schuster és mts. (2007) 36-ra bővítették. Nem sokkal később Marchese és mts. (2007a) leírták a XXXVII-XL, majd Gisbert és mts. (2008) a XLI és Ipek és mts. (2011) a XLII-XLIV inkompatibilitási csoportokat (1. táblázat). Békefi és mts. (2010) egy évvel korábban szintén publikáltak egy csoportot, melynek a XLII. csoport elnevezést javasolták. Ez az S_6S_{13} genotípusú csoport azonban különbözik az Ipek és mts. (2011) által leírt csoporttól (S_2S_{10}).

Azok a cseresznyefajták, melyek vagy önmeddők – azonban egyedi *S*-genotípussal rendelkeznek –, vagy öntermékenyülők, bármely más fajta mellé telepíthetők az ültetvényben, univerzális pollenadóként tekinthetők. A két cseresznyefajta közötti gyümölcskötődés mértékét azonban nem csupán az *S*-genotípus határozza meg, hanem természetesen számos egyéb tényező együttes hatása, mint például a két fajta virágzási idejének átfedése (Nyéki és

mts., 2002), a virágzásfenológia, a virágok rovarvonzásának mértéke (Farkas és Orosz-Kovács, 2003) és nem utolsó sorban az éghajlati tényezők, főként az időjárás. Az azonban nyilvánvaló, hogy amennyiben két fajta egy inkompatibilitási csoport tagja, tehát az *S*-genotípusuk azonos, egymást termékenyíteni nem képesek, tehát a kölcsönös termékenyülés minden más tényezőtől függetlenül gátolt, gyümölcskötődés nem tapasztalható.

1. táblázat. A cseresznye inkompatibilitási csoportjai. Mindeddig összesen 45 inkompatibilitási csoportot ismerünk (Cross Incompatibility Group, CIG, egy homonim elnevezéssel)

CIG (<i>S</i>-genotípus)	Néhány reprezentatív fajta (a csoportba tartozó termesztett fajták száma)^b	A csoport leírói
I (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₂)	Canada Giant, Early Rivers, Summit (19)	Tobutt és mts., 2004
II (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₃)	Cristalina, Regina, Tigre, Van (44)	Tobutt és mts., 2004
III (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₄)	Bing, Emperor Francis, Napoleon (45)	Tobutt és mts., 2004
IV (<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₃)	Cavalier, Late Amber, Vega (51)	Tobutt és mts., 2004
V (<i>S</i> ₄ <i>S</i> ₅)	Late Black Big., Turkey Heart EM (6)	Tobutt és mts., 2004
VI (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₆)	Julia, Merton Heart, Turkish Black (50)	Tobutt és mts., 2004
VII (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₅)	Bigarreau Gaucher, Hedelfingen (18)	Tobutt és mts., 2004
VIII (<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₅)	Malling Black Eagle, Vista (3)	Tobutt és mts., 2004
IX (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₄)	Black Giant, Rainier, Symphony (30)	Tobutt és mts., 2004
X (<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₉)	Black Tartarian E, Jurgita, Lyons (20)	Tobutt és mts., 2004
XI (<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₇)	Early Purple, Guigne d'Annonay (3)	Tobutt és mts., 2004
XII (<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₁₃)	Durona di Vignola, Noble (4)	Tobutt és mts., 2004
XIII (<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₄)	Corum, Peggy Rivers, Türkine, Vic (22)	Tobutt és mts., 2004
XIV (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₅)	Annabella, Bianca, Valera (14)	Tobutt és mts., 2004
XV (<i>S</i> ₅ <i>S</i> ₆)	Colney, Erienne, Zweitfrühe (3)	Tobutt és mts., 2004
XVI (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₉)	Bigarreau Burlat, Chelan, Naline (18)	Tobutt és mts., 2004
XVII (<i>S</i> ₄ <i>S</i> ₆)	Beni-Shuho, Larian, Merton Glory (7)	Tobutt és mts., 2004
XVIII (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₉)	Brooks, Earlise, Firm Red (11)	Tobutt és mts., 2004
XIX (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₁₃)	Reverchon, Sir Tom, Wellington A (6)	Tobutt és mts., 2004
XX (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆)	Bowyer Heart, Valery Chkalov EM (19)	Tobutt és mts., 2004
XXI (<i>S</i> ₄ <i>S</i> ₉)	Agila, Inge, Merchant, Summersun (9)	Tobutt és mts., 2004
XXII (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₁₂)	Ferrovía, 0900 Ziraat (25)	Tobutt és mts., 2004
XXIII (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₁₆)	Strawberry Heart, Rodmersham Seedl. (6)	Tobutt és mts., 2004
XXIV (<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₁₂)	Aida, Flamentiner (3)	Tobutt és mts., 2004
XXV (<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₆)	Arcina, Knauffs Riesen, Luké (8)	Tobutt és mts., 2004
XXVI (<i>S</i> ₅ <i>S</i> ₁₃)	Ferbolus, Goodnestone Black (3)	Tobutt és mts., 2004
XXVII (<i>S</i> ₄ <i>S</i> ₁₂)	Katalin, Kavics, Margit (4)	Békefi és mts., 2003
XXVIII (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₇)	Benjaminer, Charger, Polenkirsche (9)	Schuster és mts., 2007
XXIX (<i>S</i> ₄ <i>S</i> ₇)	Hartwälder, Ritterkirsche, Stolzer (5)	Schuster és mts., 2007
XXX (<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₇)	Brennkirsche Doll, Schwarze Schüttler (2)	Schuster és mts., 2007
XXXI (<i>S</i> ₄ <i>S</i> ₁₄)	Feuerkirsche, Rotstilller (4)	Schuster és mts., 2007
XXXII (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₁₂)	Castor, Johanna (2)	Schuster és mts., 2007
XXXIII (<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₁₄)	Adriana, Fermina (2)	Schuster és mts., 2007
XXXIV (<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₁₄)	Carlotta, Vittoria (3)	Schuster és mts., 2007

XXXV (S_5S_{14})	Dikkeloen, Herzkirschen (3)	Schuster és mts., 2007
XXXVI (S_7S_{19})	Pflugwirtle, Rote Kirsche (2)	Schuster és mts., 2007
XXXVII (S_5S_9)	Cavallaro, Krupnoplodnaja (3)	Marchese és mts., 2007a
XXXVIII (S_3S_{22})	Carrubbedda, Toscanella (2)	Marchese és mts., 2007a
XXXIX (S_6S_{16})	Cappuccia Imperiale, Forma di Cuore (4)	Marchese és mts., 2007a
XL (S_6S_{22})	Cappuccia Bivona, Cappuccia Etna (3)	Marchese és mts., 2007a
XLI ($S_{12}S_{22}$)	Nadal Tendre, Cherovina Primerenca (2)	Gisbert és mts., 2008
XLII (S_2S_{10}) ^a	Bademli, Tabanlı (2)	Ipek és mts., 2011
XLII (S_6S_{13}) ^a	Fertődi Csüngő, Tasziló (3)	Békefi és mts., 2010
XLIII (S_2S_9)	Ferprime, Kara Turani 0888, Primulat (4)	Ipek és mts., 2011
XLIV (S_3S_7)	Acı Bursa, Augustkirsche (2)	Ipek és mts., 2011

^aHomonim jelölésű csoportok.

^bA fajták *S*-genotípusát a következő publikációkból gyűjtöttük ki: Békefi és mts. (2003); Békefi és mts. (2010); Ercisli és mts. (2012); Gisbert és mts. (2008); Ipek és mts. (2011); Marchese és mts. (2007a); Schuster és mts. (2007); Stanys és mts. (2008); Tobutt és mts. (2004).

2.8.1. A cseresznye öntermékenyülésének kialakulása

Kobel és Steinegger (1933) 75 cseresznyefajta esetében figyelt meg önmeddő jelleget. Crane és Brown (1937) munkájuk során 66 cseresznyefajtánál vizsgálták az öntermékenyülést, s 49.160 darab önmegporzott virágból csupán 0,06 %-os terméskötődést figyeltek meg.

A korábban termesztésben lévő cseresznyefajták mind önmeddők voltak (Brózik, 1962; 1971). Ugyan manapság is kevés öntermékenyülő fajta van termesztésben, az öntermékenyülés kialakítása egyre nagyobb teret nyer a nemesítési programokban, s így az öntermékenyülő fajták részaránya évről évre növekvő tendenciát mutat.

Hugard (1978) említést tett az emberi beavatkozás nélkül, spontán mutációval létrejött öntermékenyülő cseresznyefajtaról, a ‘Cristobalináról’, mely a termesztésben csak szűk körben terjedt el (Wünsch és Hormaza, 2004). Az öntermékenyülés hátterében álló molekuláris változás még nem ismert, de feltehetően egy, az *S*-lókuszon kívüli mutáció okozza, mely a pollenfunkciót gátolja (Wünsch és mts., 2010). A fajta igen korai virágzású, a tavaszi fagyok károsítják. Tunézia területén is megtalálható egy spontán mutációval kialakult cseresznyefajta, a ‘Bou Argoub’. Marchese és mts. (2007b) egy szicíliai tájfajta, a ‘Kronio’ esetében tapasztaltak öntermékenyülést. Az *SFB*₅-allél korai stop kodont tartalmazott, aminek következtében az *SFB* fehérje HVa régióját tartalmazó részlete hiányzott.

Ahogy azt említettük, a cseresznye esetében az öntermékenyülés a spontán mutáción kívül indukált mutációval is előidézhető. 1954-ben Lewis és Crowe az angol John Innes Intézetben két öntermékenyülő mutáns (JI 2420 és JI 2434) izolált. Mindkét magonc hordozza a nem mutáns S_3 -allélt. Az S_3 -allélt hordozó más fajtákkal végzett keresztezésekből 100 %-ban öntermékenyülő utódok keletkeznek, amennyiben a fent említett két magonc bármelyikét apai szülőfajtaként használjuk. A nemesítési programból három fajta kiemelésére került sor, melyeket a világszerte folyó cseresznyenemesítési programokban felhasználnak.

A JI 2420 és JI 2434 mutánsok az S_3S_4 genotípusú 'Emperor Francis' valamint a szintúgy S_3S_4 (röntgensugárzásnak alávetett pollen) genotípusú 'Napoleon' hibridjéből származnak. Egy harmadik szelekciós vonal, a JI 2538, spontán mutációval alakult ki a 'Merton42' öntermékenyüléséből (Matthews, 1970.) A JI 2420-as mutánsnál az öntermékenyülő jelleget az S_4 mutációja okozza, ami a pollenkomponens funkcióvesztését idézte elő (Lewis és Crowe, 1954; Matthews, 1970). Genotípusát S_4S_4' -ként tartjuk számon (Bošković és mts., 2000).

A röntgensugárzásnak alávetett, s ezáltal kialakult öntermékenyülő fenotípus mögött ennél a szelekciós vonalnál (JI 2420) az S_4 -haplotípus pollenkomponens génjében 4 bázispár deléciós mutációt szenvedett, ami frameshift mutációt (a leolvasási keret eltolódását) hozott létre (Sonneveld és mts., 2005).

A JI 2434 szelekciós vonal esetében az S_3 -allélt módosította a mutáció. Ugyanezen a néven nyilvántartva két intézetben különböző S -genotípust írtak le: az east mallingi változat $S_3'S_4$, az ahrensburgi változat S_3S_3' genotípusú (Bošković és mts., 2000). A JI 2434 magoncnál kialakult öntermékenyülés az S_3 -haplotípus SFB -génszakaszában történt delécióinak tulajdonítható (Sonneveld és mts., 2005). A JI 2538 genotípusa S_1S_3' vagy $S_1'S_3$ (Schmidt és mts., 1999).

Az angliai öntermékenyülő magoncokból hozták létre az első öntermékenyülő fajtát, a 'Stellát' (Lapins, 1971). A fajtát a JI 2420 magoncból Kanadában, Summerlandben állították elő. Innentől kezdve megindult az öntermékenyülő fajták elterjedése, mint például a 'Lapins', 'Sunburst' (Lane és Schmidt, 1984), valamint a 'Sweetheart'. Világszerte főként a 'Stella' öntermékenyülő cseresznyefajta a legnépszerűbb. A JI 2434 szelekciós vonalból származik a magyar nemesítési programban előállított 'Alex' fajta (Apostol, 2005). A fontosabb öntermékenyülő cseresznyefajtákat néhány jellemzőjükkel a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat. A fontosabb öntermékenyülő cseresznyefajták származása és pedigréje

Fajta neve	Származási ország	Pedigré	Referencia
'Alex'	Magyarország	'Van' × 'Cherry Self Fertile 46'	Brózik és Apostol, 2000
'Isabella'	Olaszország	'Starking Hardy Giant' × 'Stella'	Bargioni, 1996
'Celeste'	Kanada	'Van' × 'New Star'	Bargioni, 1996
'Lapins'	Kanada	'Van' × 'Stella'	Bargioni, 1996
'Santina'	Kanada	'Stella' × 'Summit'	Albertini és Strada, 2001
'Newstar'	Kanada és Olaszország	'Van' × 'Stella'	Bargioni, 1996
'Stella'	Kanada	'Lambert' × 'JI 2420'	Bargioni, 1996
'Sunburst'	Kanada	'Van' × 'Stella'	Bargioni, 1996
'Sweetheart'	Kanada	'Van' × 'New Star'	Bargioni, 1996
'Cashmere'	USA	'Stella' × 'Early Burlat'	Lang és mts., 1998
'Columbia'	USA	'Stella' × 'Beaulieu'	Olmstead és mts., 2005
'Glacier'	USA	'Stella' × 'Early Burlat'	Lang és mts., 1998

2.9. A törökországi cseresznyefajták jellemzése

A vadcsesznyye Törökország számos területén jelentős gyakorisággal előfordul erdőségekből, legelőknél és kertekben (Ercisli, 2004). Leggyakrabban a Földközi-tenger-melléki partvidék erdőalkotó fája, egészen az 1600 m tengerszint feletti magasságig megtalálható. A vadon növő populációkban mindenféle méretű, színű, alakú és ízű gyümölcsöt termő változat felfedezhető. A meggy vadon növő egyedek elsősorban Északkelet-Törökországban figyelhetők meg. Számos egyéb faj (pl. *P. mahaleb*, *P. laurocerasus*, *P. prostrata*, *P. incana* stb.) szintén megtalálható Törökországban.

Általánosan elfogadott nézet, hogy a faj géncentrumának azt a területet tartjuk, ahol populációit a legnagyobb mértékű változékonyság jellemzi. Molekuláris vizsgálatok arra utalnak, hogy az önmeddő fajok esetében a domesztikáció nem okoz jelentős mértékű palacknyak effektust (Mariette és mts., 2010; Szikriszt és mts., 2011b), vagyis nem következik be a genetikai változékonyság nagymértékű csökkenése.

Gulen és mts. (2010) 49 török tájfajta és 29 nemzetközi árufajta AFLP (amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus) és SSR analízisét végezte el. A dendrogrammon több olyan tájfajták alkotta csoportot azonosítottak, amelyek között nemzetközi fajták nem voltak megtalálhatók. Mindez arra utal, hogy a török tájfajtákat jelentős mértékű genetikai variabilitás jellemzi, nagyobb, mint az európai, illetve amerikai nemesítési programokból származó árufajtákat.

Törökország legnépszerűbb cseresznyefajtája a nagy gyümölcsű '0900 Ziraat' fajta, melynek *S*-genotípusa (S_3S_{12}) (Ipek és mts., 2011). A török tájfajták nagy genetikai variabilitását mutatta az a tény is, hogy 40 fajta vizsgálatával három, korábban nem ismert inkompatibilitási csoportot sikerült azonosítani (Ipek és mts., 2011). Ugyanakkor bizonyos török fajták nagy hasonlóságot mutattak egyes nemzetközi fajtákhoz. Például a 'Mustafa Kemalpaşa' és a 'Noir de Guben' fajták Kacar és mts. (2005) szerint azonos genotípusok. Gulen és mts. (2010) ugyan talált olyan AFLP és SSR markereket, amelyekkel a két fajta egymástól elkülöníthető volt, de genetikai kapcsolatuk kétségkívül szorosnak bizonyult.

A török fajták nemzetközi hatását az is híven mutatja, hogy a nemzetközi fajták között találunk olyanokat, mint a 'Turkey Heart' és a 'Turkish Black'. A magyar és török cseresznyetermesztés közti érdekes kapcsolatra utal, hogy Törökországban ismert egy 'Macar' nevű fajta, mely bizonyos régiókban nagy népszerűségnek örvend (A. Dogan és S. Ercisli, szóbeli közlés). A fajta eredete azonban nem ismert, és mindeztáig molekuláris vizsgálatokba sem emelték be.

3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Termesztési és / vagy nemesítési szempontból értékes török cseresznyefajták, illetve a Fekete-tenger partvidékén szelektált klónok termékenyülési viszonyait meghatározó *S*-genotípusának tisztázása.
2. Új cseresznye *S-RN-áz* allélok parciális génszekvenciájának meghatározása és molekuláris jellemzése.
3. A vizsgált mintakör *S*-allél-készletének áttekintése, a lókuszt variabilitásának jellemzése.
4. Megismerni, milyen folyamatok állnak a géncentrumra jellemző genetikai változékonyság kialakulásának hátterében.
5. Az *S*-genotípus meghatározására használható molekuláris vizsgálati eljárások fejlesztése, mely nagy genetikai variabilitású növényanyag vizsgálata során is megbízható eredményt ad.
6. Az *S-RN-áz* génben bekövetkezett mutációk feltárása, evolúciós / filogenetikai elemzése.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

A kísérleteink során 30, Törökországból származó őshonos cseresznyefajtát, valamint 17, a Fekete-tenger mellékén élő vad populációból szelektált fajtajelöltet vizsgáltunk, melyek a törökországi Atatürk Központi Kertészeti Kutatóintézet (Atatürk Central Horticultural Research Institute, Yalova) génbanki ültetvényében találhatók meg (6. táblázat).

4.2. DNS-alapú vizsgálatok

4.2.1. DNS-kivonás

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

4.2.2. S-PCR analízis

Az *S*-RN-áz-allélok amplifikációjához konszenzus primereket használtunk, melyeknek szekvenciáit a 3. táblázat mutatja. Az első intronrégió felszaporításához a PaConsI-F valamint PaConsI-R primerpárt, míg a második intronrégió amplifikációjához a PaConsII-F és PaConsII-R primerpárt alkalmaztuk (Sonneveld és mts, 2003).

Az *S*₁₃-RN-áz esetében az első illetve második intronrégióon belül megtalálható mikroszatellit régió kimutatását a Marchese és mts. (2010) által kifejlesztett (a forward primer 6-FAM fluoreszcens jelöléssel ellátott) *S*₁₃-1SSR (F: ATT ATG AGC ACT GGT GGG TTG C; R: ACC AAA GAA ACC ATG CAG AAA TGT) és *S*₁₃-2SSR (F: TTT GAT GTT GGT TTT CTG TTA GG; R: TTT GAG AAA ACA GAT AGA TAG ACA G) primerpárok segítségével végeztük el.

Az *S*-RN-áz gén harmadik exonjának – a gén C3 és C5 közötti régiójának – amplifikációjához az EM-PC3consRD primer (Sutherland és mts, 2004) reverz komplementer

oligonukleotidját használtuk – melyet EM-PC3consFD primernek nevezünk el – az EM-PC5consRD primerrel párosítva.

A PCR-reakciókhoz körülbelül 20-80 ng DNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban. A 10x Dream *Taq* puffer (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) KCl-ot és (NH₄)₂SO₄-ot is tartalmazott a Dream*Taq*TM DNS-polimeráz enzim (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) megfelelő működéséhez szükséges arányban. A PCR-reakcióelegy végső koncentrációja 4,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM a megfelelő primerekből és 0,06 U Dream*Taq* DNS-polimeráz enzim.

A PCR-reakciók PTC 200 (MJ Research, Quebec, Kanada) típusú készülékben futottak. A reakciók során alkalmazott programok a primerektől függően eltérőek voltak.

A PCR-termékeket 1,2 %-os TAE illetve TBE agaróz gélben különítettük el egymástól (1,5 h 100 V) és etidium-bromidos festéssel, UV-fénnyel átvilágítva tettük láthatóvá. Az egyes PCR-fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb DNS-markert (Promega, Mannheim, Németország) használtunk.

3. táblázat. A konszenzus PCR során felhasznált primerek nukleotidsorrendje

Primer neve	Szekvencia 5'–3'	Forrás
PaConsI-F	(C/A)CTTGTTCTTG(C/G)TTT(T/C)GCTTTCTTC	Sonneveld és mts., 2003
PaConsI-R	CATG(A/G)ATGGTGAA(A/G)T(T/A)TTGTAATGG	Sonneveld és mts., 2003
PaConsII-F	GGCCAAGTAATTATTCAAACC	Sonneveld és mts., 2003
PaConsII-R	CA(T/A)AACAAA(A/G)TACCACTTCATGTAAC	Sonneveld és mts., 2003
EM-PC2consFD	TCAC(A/C)AT(C/T)CATGGCCTATGG	Sutherland és mts., 2004
EM-PC3consRD	A(A/T)(C/G)T(A/G)CC(A/G)TG(C/T)TTGTTCCATTC	Sutherland és mts., 2004
EM-PC3consFD	GAATGGAACAA(A/G)CA(C/T)GG(C/T)A(C/G)(A/T)T	EM-PC3consRD reverz komplementere
EM-PC5consRD	CAAAATACCACTTCATGTAACA(A/G)C	Sutherland és mts., 2004

4.2.3. Allélspecifikus PCR-vizsgálatok

Az első- és második intronrégió amplifikációját célzó, konszenzus primerekkel végzett *S*-PCR-analíziseket követően, annak érdekében, hogy az adott *S-RN-áz* allél intronméretek szerinti azonosítását megbízhatóbbá tegyük, allélspecifikus PCR-reakciókat végeztünk. Az allélspecifikus primerek pontosan az adott allél DNS-szekvenciájára illeszkednek, ezért

minden egyes *S*-allél esetében külön-külön PCR-reakciót kellett beállítanunk különböző primerpárokkal és az azoknak megfelelő primer-tapadási hőmérsékletekkel.

Az allélspecifikus PCR-vizsgálatot minden fajta esetében a rendelkezésre álló összes allélra (*S*₁-*S*₇, *S*₉, *S*₁₀, *S*₁₂-*S*₁₄ és *S*₁₆) nézve elvégeztük. A reakcióelegyek elkészítése és a PCR-készülék típusa megegyezik a konszenzus *S*-PCR-nél leírtakkal.

Az egyes PCR-reakciók ellenőrzéséhez belső kontrollként egy minden genotípusban megtalálható szekvenciát felszaporító primerpárt (Pa11 (Pa)-F3 és Pa11 (Pa)-R4) használtunk. A PAL elnevezés a *fenilalanin-ammónia-liáz* elnevezés rövidítéséből adódik.

A PCR-reakció lépései 3 perc 94 °C-os kezdeti denaturációs lépés, ciklusonkénti lépések: 30 másodperc 94 °C denaturáció, 30 másodperc primerek kötődése a primer olvadáspontjától függő hőmérsékleten, 1 perc 72 °C polimerizációs lépés, melyet 35 ciklus után egy 5 perces 72 °C-os végső extenziós lépés követ.

A PCR-termékeket gélelektroforézis során 1 %-os TBE agaróz gélen választottuk el, 100 V-on 1 óra alatt, s etidium-bromiddal megfestve, UV transzilluminátorral megvilágítva tettük láthatóvá. A fragmentumok méretének meghatározását 1 kb DNS létra (Promega, Mannheim, Németország) segítette.

A PCR-reakciókhoz felhasznált allélspecifikus primerek szekvenciáját, tapadási hőmérsékleteket és a várt PCR-termékméreteket a 4. táblázat foglalja össze (Sonneveld és mts., 2001; 2003).

4. táblázat. Az *S*₁-*S*₇, *S*₉, *S*₁₀, *S*₁₂-*S*₁₄ és *S*₁₆ cseresznye allélokra tervezett allélspecifikus primerek és kontrollként használt primerek (PAL) nukleotidszekvenciája a hozzájuk tartozó primertapadási hőmérsékleti értékekkel és a várt PCR-termékek méretével (Sonneveld és mts., 2001; 2003)

<i>S</i> -allél	Primer	Szekvencia (5'-3')	Tapadási hőm. (°C)	PCR-termékmérete (bp)
<i>S</i> ₁	PaS1-F PaS1-R	GTAATTGCAACGGGTCAAATATGAG ACAACCTCAGTATTAGTTGCTGGATCA	56	820
<i>S</i> ₂	Pa-S2-Fnew PaS2-R	CCTGCTTACTTTGTCACGCA AAGTGCAATCGTTCATTTG	57-61	640
<i>S</i> ₃	PaS3-F PaS4-R	GGGTCGCGATTTAAGAAAGAGC AACAATCGTACTTTGTGATGACTTTAGG	60	960
<i>S</i> ₄	Pa-S4-F Pa-S4-R	CACTGGGTCGCTGTTAACTTTAGG TTGCATTTGATTAAGTGAGGCTTCA	60	820
<i>S</i> ₅	PaS5-F PaS5-R	ACATGGTACATGTTCCCAACGGATC CTGCTGTTTCGATTACAGTCAATATGTAC	50	300
<i>S</i> ₆	PaS6-F PaS6-R	ACTGGACCGCAATTTAAGCG AGTTGCTGCTTTAATGGGTGCA	53	470

<i>S</i> ₇	PaS7-F PaS7-R	AGTTTCTTTAGCGACGTTAGATG TGCATTTGGTTTAGTTTCTCTACA	55-60	584
<i>S</i> ₉	PaS9-F PaS9-R	TTTGTTACGTTATGAGCAGCAG ATGAAACAATACATACCACTTTGCTA	58-62	495
<i>S</i> ₁₀	PaS10-F PaS10-R	GTTTGACGATGCTCAGTATCAC GTACTTCCATCTTTGTCTTGCCAC	58-62	505
<i>S</i> ₁₂	PaS12-F PaS12-R	ATTCTGATGCTGGTCCTATAG AACTCAGGCTTATTAGGGTG	59-63	562
<i>S</i> ₁₃	PaS13-F PaS13-R	CAATGGGTCGCAATTTGACGA CGAGGAGGTGGATTTCGAACACTTG	62-66	306
<i>S</i> ₁₄	PaS14-F PaS14-R	GCAGAATTTGGTATGTGTTGGA GGATCGCTGGAAGTATTGCATTAT	61-65	468
<i>S</i> ₁₆	PaS16-F PaS16-R	TCATCAATTGCGTGATTAGCAG TGTACCATGTTTGTCCATTCCAT	57-61	429
Kontroll (PAL)	Pal1(Pa)-F3 Pal1(Pa)-R4	CAAATTGAAGCTGCAGCAATTATGGA GGTAAGACCTGCATTCCGTAATCCTGTT	55-60	1036

A kísérleteink során újként azonosított *S-RN-áz* allélok esetében – az új allél szekvenciájának megismerését követően – allélspecifikus primereket terveztünk, melyeknek paramétereit az alábbi 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat. Az általunk tervezett, új allélokra specifikus primerek paramétereit

<i>S</i> - allél	Allélspecifikus primer	Szekvencia (5'-3')	Hossz (nt)	Primer párja	Amplifikált régió (bp)
<i>S</i> ₁₇	PavS17R2	CCACGTTGGGCCAAGATATCTTC	23	EM-PC2ConsFD	631
<i>S</i> ₁₈	PavS18R	CAACTTTGATTTTGACCCTTTC	22	EM-PC2ConsFD	530
<i>S</i> ₁₉	PavS19R	GGTACAAACTTAAGGCATAATTAGAG	26	EM-PC2ConsFD	661
<i>S</i> ₂₅	PavS25R	GGATAATATGGTAAATTCACACTTTTTTC	28	EM-PC2ConsFD	773
<i>S</i> ₃₄	Pce34F	CCAATTTTCGAGAGACTAGACCAT	24	Pce34R2	690
<i>S</i> ₃₄	Pce34R2	CACCTAGTACCACTAAAACCATAC	24	Pce34F	690
<i>S</i> ₃₇	PavS37R	CTCATATTTAGGAGCTCATAGAGG	24	EM-PC2ConsFD	660

4.2.4. A PCR-termékek fragmentumhossz-analízise, klónozása, szekvenálása és a szekvenciák vizsgálata

Az *S-RN-áz* gének első intronrégiójára irányuló vizsgálatok esetében kapott PCR-fragmentumok pontos méretének meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) elnevezésű automata DNS-szekvenátorral történt. A fragmentumhossz-analízisre szánt minták esetében a PCR során 5' végen fluoreszcensen jelölt (6-FAM) forward primereket használtunk. A vizsgálat során nyert adatokat Peak Scanner Software v1.0 programmal (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) értékeltük ki.

Az *S*-RN-áz második intronrégiójának PCR-fragmentumait 1,2 %-os TAE agaróz gélből izoláltuk vissza EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Kanada) segítségével, a gyártó utasításait követve. A PCR-termékek 3' végein túlnyúló adenin található, ezért klónozásuk általában olyan plazmiddal történik, melynek 3' végén extra timin van.

Vizsgálatainkhoz a pGEM-T Easy Vector Systemet (Promega, Mannheim, Németország), valamint az InsTA Clone PCR Cloning Kitet (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) használtuk. A ligálás egy éjszakán át 4 °C-on 10 µl végtérfogatban történt: a pGEM-T Easy Vector System esetében 20–50 ng tisztított PCR-termék, 3 U T₄ DNS-ligáz, 50 ng pGEM-T Easy Vector, 2x puffer (60 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10 % polietilén-glikol) (Promega, Mannheim, Németország), desztillált vízzel kiegészítve; az InsTA Clone PCR Cloning Kit esetében pedig 20-50 ng tisztított PCR-fragmentum, 1,65 U T₄ DNS-ligáz, 55 ng pTz57R/T plazmid vektor, 5x ligációs puffer (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) desztillált vízzel kiegészítve.

A klónozott fragmentumokat JM109 valamint DH5α kompetenssé tett *E. coli* baktériumsejtekbe transzformáltuk. A kompetens sejteket Z-Competent™ *E. coli* Transformation Kit (Zymo Research Corp., Irvine, Kalifornia, USA) segítségével preparáltuk, a gyártó utasításainak megfelelő eljárással. A teljes ligációs elegyet 100 µl –70 °C-on tárolt kompetens baktérium-szuszpenzióval finoman elegyítettük, majd hőkezeltük, azaz 20 percen át jégen tartottuk, azután 45 másodpercig 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd 2 percig ismét jégre tettük. Végül 950 µl 37 °C-os folyékony, antibiotikum-mentes LB táptalajt adtunk hozzá, és másfél óráig rázattuk 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámmal. Ezután 100–400 µl-nyi suszpenziót szélesztettünk LB / ampicillin / IPTG / X-gal rétegzett szilárd táptalajon: 10 g / l Bacto-tripton, 5 g / l Bacto-élesztőkivonat, 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, fél óráig 37 °C-on tartottuk a szélesztés előtt. A kész plate-eket fordított helyzetben 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

A ligálás sikerességére a baktériumkolóniák színéből következtethetünk. A kék-fehér szelekció eredményeképpen kapott telepek közül 20-20 darab különálló, nagyméretű fehér telepet oltottunk le steril pipettahegygel, melyet először masterplate-hez érintettünk, majd

M13 primerpárral végzett kolónia-PCR során teszteltük, hogy a baktériumtelep plazmid DNS-e valóban tartalmazza-e az általunk beklónozott inszertet.

A kolónia-PCR során pozitívnak mutatózó baktériumkolóniákból folyadékkultúrát indítottunk. A masterplate-en egy éjszakán át 37 °C-on felszaporított eredeti telepekről oltottuk le a pozitív, inszertet tartalmazó baktériumtelepeket 2 ml folyékony, 100 mg / ml ampicillint tartalmazó LB táptalajba. A folyadékkultúrákat egy éjszakán át rázattuk 37 °C-on 200 rpm fordulaton.

A plazmidokat EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Kanada) izoláltuk. Az inszertek ellenőrzését pGEM-T Easy plazmidok esetében *EcoRI* restrikciós enzimmel, pTz-57R/T plazmidok esetében pedig *XbaI* és *BamHI* (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) dupla restrikciós enzimes emésztéssel végeztük 37 °C-on 2 órán át. Szekvenciájuk meghatározása szintén ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) automata DNS-szekvenátorral történt. Minden fajta és haplotípus esetében három-öt klón szekvenálását végeztük el mindkét irányban.

A DNS- és aminosav-szekvenciák homológiavizsgálatához az NCBI BLASTN 2.2.27+ szoftverét (Zhang és mts., 2000) használtuk. Az illesztéseket a CLUSTAL W (Thompson és mts., 1994) és a BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, Kalifornia, USA) programokkal hoztuk létre. A restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit a TACG 3.2 szoftverrel (Biology Workbench, <http://workbench.sdsc.edu>) határoztuk meg. A filogenetikai és molekuláris evolúciós analíziseket a MEGA version 5.1 szoftver segítségével hajtottuk végre (Tamura és mts., 2011).

4.2.5. A bizonytalan funkciójú S_{7m} -RN-áz allél klónozása és szekvenálása

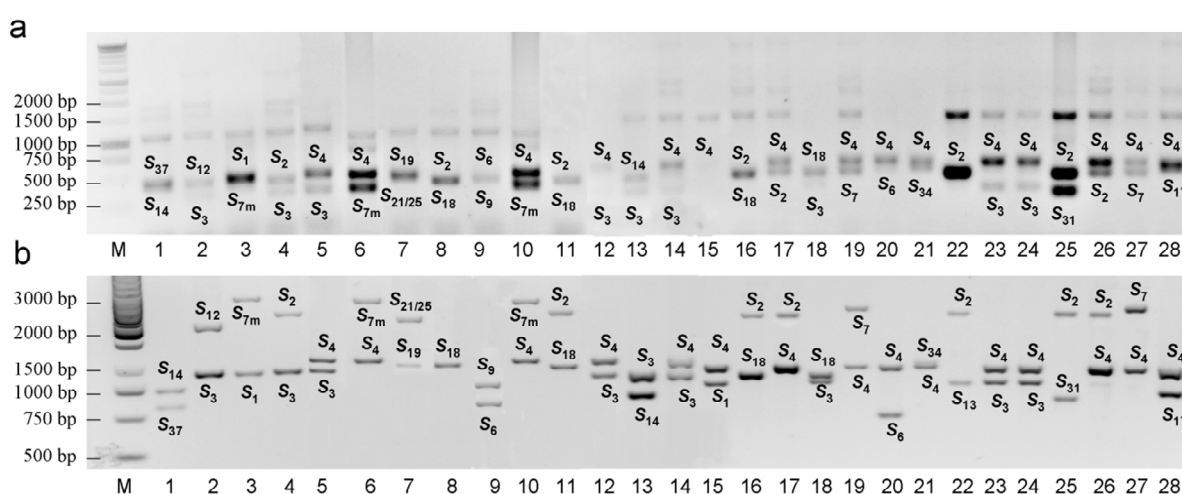
A török cseresznyefajták közül a ‘Turfanda Kara’-ban (S_4S_{7m}) a második intron PCR-analízise során egy körülbelül 3000 bp méretű fragmentum keletkezett, mely az eddig ismert cseresznye *S*-allélok között szokatlan méretű, továbbá a teljes fragmentum klónozása plazmid vektorba nehezen megoldható. Ezért a gén harmadik exonját amplifikáltuk C3 és C5 közötti régiókban EM-PC3consFD és EM-PC5consRD primerpárok segítségével, az alábbi PCR-program alkalmazásával: 3 perc 94 °C, 30 cikluson keresztül: 1 perc 94 °C, 1 perc 48 °C és 1,5 perc 72 °C, végül egy 5 perces 72 °C-os végső extenziós lépés. A fragmentumokat klónoztuk és kompetens sejtekbe transzformáltuk.

Az eddig ismeretlen *S-RN-áz* allél (későbbiek során S_{7m} -ként jelölt) harmadik exonjának transzformált fragmentumát kolónia-PCR-t követően restriktív enzimmel hasítottuk. A ‘Turfanda Kara’ másik allélja az S_4 . Az S_4 -*RN-áz* allél szekvenciája ismert, melyet az *EcoRV* restriktív enzim két darabra hasít szét. A kék-fehér szelekciót követően a fehér telepekből nyert kolónia-PCR-termékeket *EcoRV* (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) restriktív enzimmel hasítottuk, a mintákat 1 órán keresztül 37 °C-on tartva. Az emésztés után a hasított termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Kizárólag azokból a kolóniákból izoláltunk plazmid DNS-eket, amelyek nem hasítódtak az S_4 -*RN-áz* jelenlétére utaló méretnél (81 és 165 bp).

5. EREDMÉNYEK

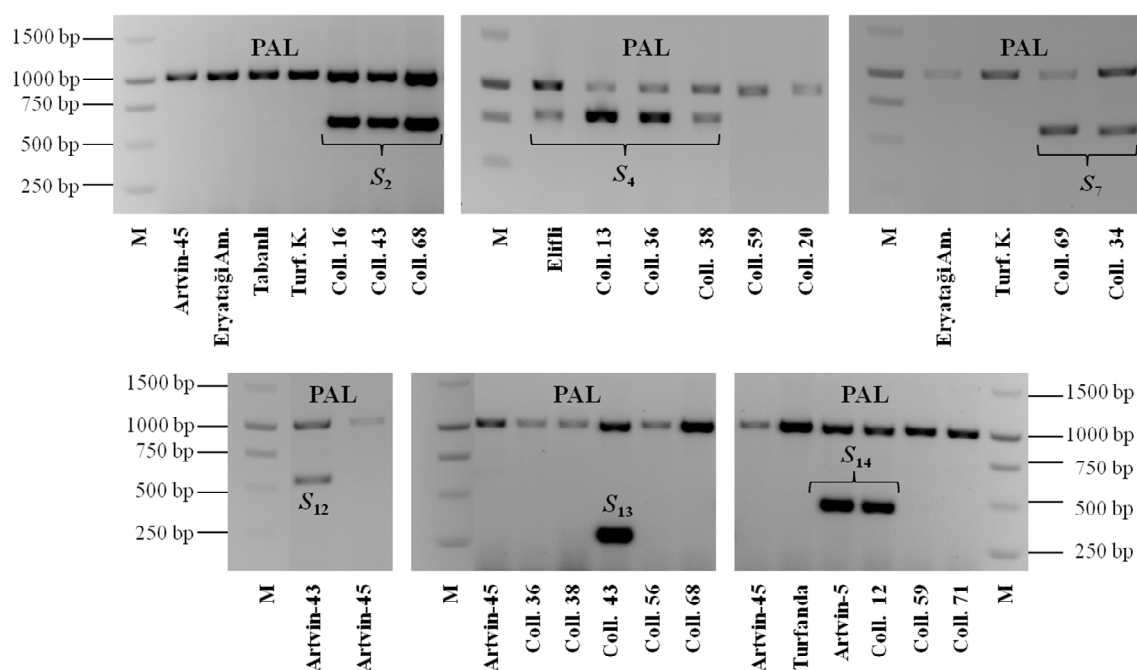
5.1. A török cseresznyék *S*-genotípusának meghatározása konszenzus primerekkel

Vizsgálataink első lépése a török cseresznyefajták és szelektált klónok *S*-genotípusának meghatározása volt. Konszenzus primerekkel végzett PCR analízis során meghatároztuk valamennyi vizsgált cseresznye mindkét *S*-alléljának első és második intronméretét (7. ábra, 6. táblázat). Az első intronrégió pontos méretét automata szekvenátorral határoztuk meg, miután a fragmentumokat fluoreszcens festékkel (6-FAM) jelöltük. A méreteket összevetettük az ismert természetű és vadcseresznye allélokra korábban meghatározott értékekkel (De Cuyper és mts., 2005; Sonneveld és mts., 2003; Vaughan és mts., 2008). A 47 török cseresznye vizsgálata összesen húsz különböző *S*-*RN*-áz allél jelenlétét valószínűsítette. Preferenciális amplifikációt (a két allél közül mindössze egy kimutatását) csak a Coll. 43 jelű szelektált klón esetén tapasztaltunk.



7. ábra. Néhány vizsgált török cseresznye tájfajta és szelektált klón *S*-PCR analízise az *S*-*RN*-áz gén első intronrégióját amplifikáló PaConsI-F és PaConsI-R (a) és a második intronrégiót amplifikáló PaConsII-F és PaConsII-R (b) konszenzus primerekkel. M: 1 kb méretmarker (Promega, Mannheim, Németország), 1. ‘Artvin-5’ ($S_{14}S_{37}$), 2. ‘Artvin-43’ (S_3S_{12}), 3. ‘Artvin-45’ (S_1S_{7m}), 4. ‘Ayдын Kirazı 0890’ (S_2S_3), 5. ‘Elifli’ (S_3S_4), 6. ‘Eryatađı Amasya 0849’ (S_4S_{7m}), 7. ‘Tabanlı’ ($S_{19}S_{21/25}$), 8. ‘Tezce 0912’ (S_2S_{18}), 9. ‘Turfanda’ (S_6S_9), 10. ‘Turfanda Kara’ (S_4S_{7m}), 11. ‘Yakacık’ (S_2S_{18}), 12. Coll. 1 (S_3S_4), 13. Coll. 12 (S_3S_{14}), 14. Coll. 13 (S_3S_4), 15. Coll. 14 (S_1S_4), 16. Coll. 16 (S_2S_{18}), 17. Coll. 19 (S_2S_4), 18. Coll. 20 (S_3S_{18}), 19. Coll. 34 (S_4S_7), 20. Coll. 36 (S_4S_6), 21. Coll. 38 (S_4S_{34}), 22. Coll. 43 (S_2S_{13}), 23. Coll. 54 (S_3S_4), 24. Coll. 56 (S_3S_4), 25. Coll. 59 (S_2S_{31}), 26. Coll. 68 (S_2S_4), 27. Coll. 69 (S_4S_7) és 28. Coll. 71 (S_4S_{17}).

Tekintettel arra, hogy néhány ismert allél (S_{16} / S_{32} , S_2 / S_7 vagy S_9 / S_{10}) mindkét intronrégiója közel azonos méretű, illetve a géncentrumhoz közeli területen a fajra jellemző genetikai diverzitás felveti korábban nem azonosított allélok jelenlétének lehetőségét is, szükséges valamennyi vélelmezett allél megerősítése. Sonneveld és mts. (2001; 2003) allél-specifikus primereket terveztek az általuk azonosított S_1 - S_7 , S_9 - S_{10} , S_{12} - S_{13} , S_{14} és S_{16} allélok kimutatására. A primereket azokban az esetekben használtuk megerősítésként, ahol a konszenzus primerek által amplifikált fragmentumok mérete valószínűsítette az adott allél jelenlétét (8. ábra).



8. ábra. Néhány példa az S_2 -, S_4 -, S_7 -, S_{12} -, S_{13} - és S_{14} -allélspecifikus primerek által elvégzett vizsgálatra. M: 1 kb méretmarker, PAL: belső kontroll (*fenilalanin-ammónia-liáz* gén egy szakaszának amplifikációja).

A konszenzus és allélspecifikus PCR vizsgálat eredményeként az S_4 - és az S_3 -allélt tizenkilenc, az S_2 -t tizennégy, az S_6 -ot hét, az S_7 -et öt, az S_1 -et négy, az S_9 -et és S_{12} -t három, az S_5 -öt, S_{10} -et és S_{14} -et kettő, végül az S_{13} -at egy fajtában sikerült kimutatni.

A rendelkezésre álló allélspecifikus primerek 13 esetben nem adtak amplifikációt az egyik vagy mindkét allél esetében. Jóllehet a konszenzus primerrel meghatározott intronméretek alapján feltételezhető volt a Coll. 71 szelektált klónban az S_{17} -allél, a ‘Tezce 0912’, ‘Yakacık’, Coll. 16 és Coll. 20 genotípusokban az S_{18} , a ‘Tabanlı’ fajtában az S_{19} és $S_{21/25}$, a Coll. 59-ben az S_{31} -allél jelenléte, de ennek megerősítéséhez további vizsgálatokra volt szükség. Ráadásul néhány minta esetében olyan fragmentumméreteket határoztunk meg,

melyek minden ismert allél jellemző fragmentumméretétől különbözők voltak. A Coll. 38-ban például kimutattunk egy allélt, melynek első intronrégiója 454 bp, második intronrégiója kb. 1100 bp méretű volt. Az 'Artvin-5' egyik allélját 467 bp-os első intronrégió és kb. 560 bp-os második intronrégió jellemezte. Három minta esetén ('Artvin-45', 'Eryataği Amasya 0849' és 'Turfanda Kara') az első intronrégió 376 bp, a második intronrégió közel 3000 bp méretűnek bizonyult. Mivel ilyen méretek egyetlen ismert allélra sem jellemzőek, feltételezésünk szerint új, cseresznyében korábban nem azonosított allélokot reprezentálnak.

6. táblázat. A vizsgálatokhoz használt török cseresznye tájfajták és szelektált klónok eredete és az *S*-genotípus meghatározásához használt módszerekkel elért eredmények

	Származási hely (tartomány)	Az első intronrégió mérete a PaConSI primerpárral ^a	A második intronrégió hozzávetőleges mérete a PaConSII primerpárral ^a	Pozitív allél-specifikus PCR ^b	Negatív allél-specifikus PCR ^c	<i>S</i> -genotípus	Inkompatibilitási csoport ^e
<i>Fajták</i>							
Abdullah	Bursa	518, 428	580, 800	<i>S</i> ₆ , <i>S</i> ₉		<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₉	Group X
Acı Bursa	Bursa	303, 420	900, 2400	<i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₇		<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₇	Group XLIV
Artvin-5	Artvin	406, 467	720, <u>560</u>	<i>S</i> ₁₄ , <i>S</i> ₃₇ [*]	<i>S</i> ₁ - <i>S</i> ₁₃ , <i>S</i> ₁₆	<i>S</i> ₁₄ <i>S</i> ₃₇	Group 0
Artvin-43	Artvin	303, 420	900, 1800	<i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₁₂		<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₁₂	Group XXII
Artvin-45	Artvin	456, <u>376</u>	<u>880</u> , 3000	<i>S</i> ₁	<i>S</i> ₁ - <i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₅ - <i>S</i> ₁₆	<i>S</i> ₁ <i>S</i> _{7m}	Az <i>S</i> _{7m} -allél funkciójától függ ^f
Aydın Kirazi 0890	Aydın	420, 303	2200, 900	<i>S</i> ₂ , <i>S</i> ₃	<i>S</i> ₇	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₃	Group IV
Aydın Siyahı	Aydın	420, <u>440</u>	2200, <u>730</u>	<i>S</i> ₂ , <i>S</i> ₁₀	<i>S</i> ₃	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₁₀ ^d	Group XLII
Bademli 0898	Izmir	420, 440	2200, 730	<i>S</i> ₂ , <i>S</i> ₁₀		<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₁₀	Group XLII
Cemal	Sanliurfa	303, 523	900, 1060	<i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₄		<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₄	Group III
Demir 0903	Erzincan	303, 518	900, 580	<i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₆		<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₆	Group VI
Elifli	Afyon	303, 523	<u>900</u> , 1060	<i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₄		<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₄	Group III
Eryatağı Amasya 0849	Amasya	523, <u>376</u>	1060, 3000	<i>S</i> ₄	<i>S</i> ₁ - <i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₅ - <i>S</i> ₁₆	<i>S</i> ₄ <i>S</i> _{7m}	Az <i>S</i> _{7m} -allél funkciójától függ ^g
Halil Efendi	Manisa	456, 518	880, 580			<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆	Group XX
Kadı 0878	İzmir	518, 428	580, 800			<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₉	Group X
Kara 0908	İzmir	420, 303	2200, 900	<i>S</i> ₂ , <i>S</i> ₃		<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₃	Group IV
Kara Gevrek	İzmir	420, 462	2200, 2160	<i>S</i> ₃ , <i>S</i> ₅	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₃ <i>S</i> ₅ ^d	Group VIII

Kara Kiraz	Bursa	303, 420	900, 1800			S_3S_{12}	Group XXII
Kazancioğlu	Artvin	303, 420	900, 1800	S_3, S_{12}		S_3S_{12}	Group XXII
Kirdar	Manisa	420, 518	2200, 580	S_2, S_6		S_2S_6	Group XXV
Mustafa Kemalpaşa	İzmir	456, 462	880, 2160	S_1, S_5		S_1S_5	Group XIV
Niğde	Niğde	523, 420	1060, 2400	S_4, S_7		S_4S_7	Group XXIX
Sarı	Aydın	420, 303	2200, 900	S_2, S_3		S_2S_3	Group IV
Sultan	Aydın	523, 420	1060, 2400	S_4, S_7		S_4S_7	Group XXIX
Sultan Hisar	Aydın	303, 523	900, 1060	S_3, S_4		S_3S_4	Group III
Tabanlı	Erzincan	502, <u>451</u>	<u>975</u> , 2000	$S_{19}^*, S_{21/25}^*$	S_2, S_{10}	$S_{19}S_{21/25}^d$	Group 0
Tezce 0912	Amasya	420, 409	2200, 970	S_2, S_{18}^*	S_1, S_3- S_{16}	S_2S_{18}	Group XLV*
Turfanda	Hatay	518, 428	<u>580</u> , 800	S_6, S_9		S_6S_9	Group X
Turfanda Kara	Bursa	523, <u>376</u>	1060, 3000	S_4	$S_1-S_3,$ S_5-S_{16}	S_4S_{7m}	Az S_{7m} -allél funkciójától függ ^g
Yakacık	İzmir	420, 409	2200, <u>969</u>	S_2, S_{18}^*	S_1, S_3- S_{16}	S_2S_{18}	Group XLV*
Zeyidali 0906	Denizli	420, 303	2200, 900	S_2, S_3		S_2S_3	Group IV
<i>Szelektált klónok</i>							
Coll. 1	Tokat	303, 523	900, 1060	S_3, S_4		S_3S_4	Group III
Coll. 12	Tokat	303, 406	900, 720	S_3, S_{14}		S_3S_{14}	Group XXXIV
Coll. 13	Tokat	<u>303</u> , 523	900, 1060	S_3, S_4		S_3S_4	Group III
Coll. 14	Amasya	456, 523	880, 1060	S_1, S_4		S_1S_4	Group IX
Coll. 16	Amasya	420, 409	2200, <u>970</u>	S_2, S_{18}^*	S_1, S_3- S_{16}	S_2S_{18}	Group XLV*
Coll. 19	Amasya	420, 523	2200, 1060	S_2, S_4		S_2S_4	Group XIII
Coll. 20	Amasya	303, 409	900, 970	S_3, S_{18}^*	$S_1-S_2,$ S_4-S_{16}	S_3S_{18}	Group 0
Coll. 34	Kastamonu	523, 420	1060, 2400	S_4, S_7		S_4S_7	Group XXIX
Coll. 36	Kastamonu	523, 518	1060, 580	S_4, S_6		S_4S_6	Group XVII
Coll. 38	Kastamonu	523, <u>454</u>	1060, <u>1100</u>	S_4, S_{34}^*		S_4S_{34}	Group 0

Coll. 43	Kastamonu	420, n.a.	2200, <u>870</u>	S_2, S_{13}		S_2S_{13}	Group 0
Coll. 54	Karabük	303, 523	900, 1060	S_3, S_4		S_3S_4	Group III
Coll. 56	Karabük	303, 523	900, <u>1060</u>	S_3, S_4		S_3S_4	Group III
Coll. 59	Zonguldak	420, <u>284</u>	2200, <u>721</u>	$S_2,$	S_1, S_3- S_{16}	S_2S_{31}	Group 0
Coll. 68	Zonguldak	420, 523	2200, 1060	S_2, S_4		S_2S_4	Group XIII
Coll. 69	Zonguldak	523, 420	1060, 2400	S_4, S_7		S_4S_7	Group XXIX
Coll. 71	Düzce	523, n.a.	1060, <u>796</u>	S_4, S_{17}^*	$S_1-S_3,$ S_5-S_{16}	S_4S_{17}	Group 0

^aAz aláhúzás olyan fragmentumokra utal, melyek részleges vagy teljes DNS-szekvenciáját meghatároztuk; n.a. nem amplifikált fragmentumok

^bA csillaggal jelölt allélokot az újonnan kifejlesztett allélspecifikus primerekkel ellenőriztük.

^cAzok a negatív allélspecifikus reakciók kerültek feltüntetésre, ahol a negatív eredmény döntőnek bizonyult az S -genotípus meghatározása során.

^dAz Ipek és mts. (2011) által meghatározott S -genotípusok javítását javasoljuk.

^eA csillaggal jelölt inkompatibilitási csoport felismerése e munka eredménye.

^fA fajták vagy a XXVIII (S_1S_7) inkompatibilitási csoportba tartoznak, vagy univerzális pollenadók az S_{7m} -allél funkciójától függően.

^gA fajták a XXIX (S_4S_7) inkompatibilitási csoportba tartoznak, vagy együtt alkotnak új csoportot az S_{7m} -allél funkciójától függően.

5.2. Az *S-RN-áz* allélok DNS-szekvenciájának meghatározása

Összesen 21, PCR által amplifikált fragmentumot tisztítottunk ki agarózgélből, melyeket klónoztunk, és meghatároztuk DNS-szekvenciájukat (7. táblázat). A szekvenciák a fragmentum amplifikálásához használt primerek szekvenciáját nem tartalmazzák.

5.2.1. Vadcseresznye allélok azonosítása

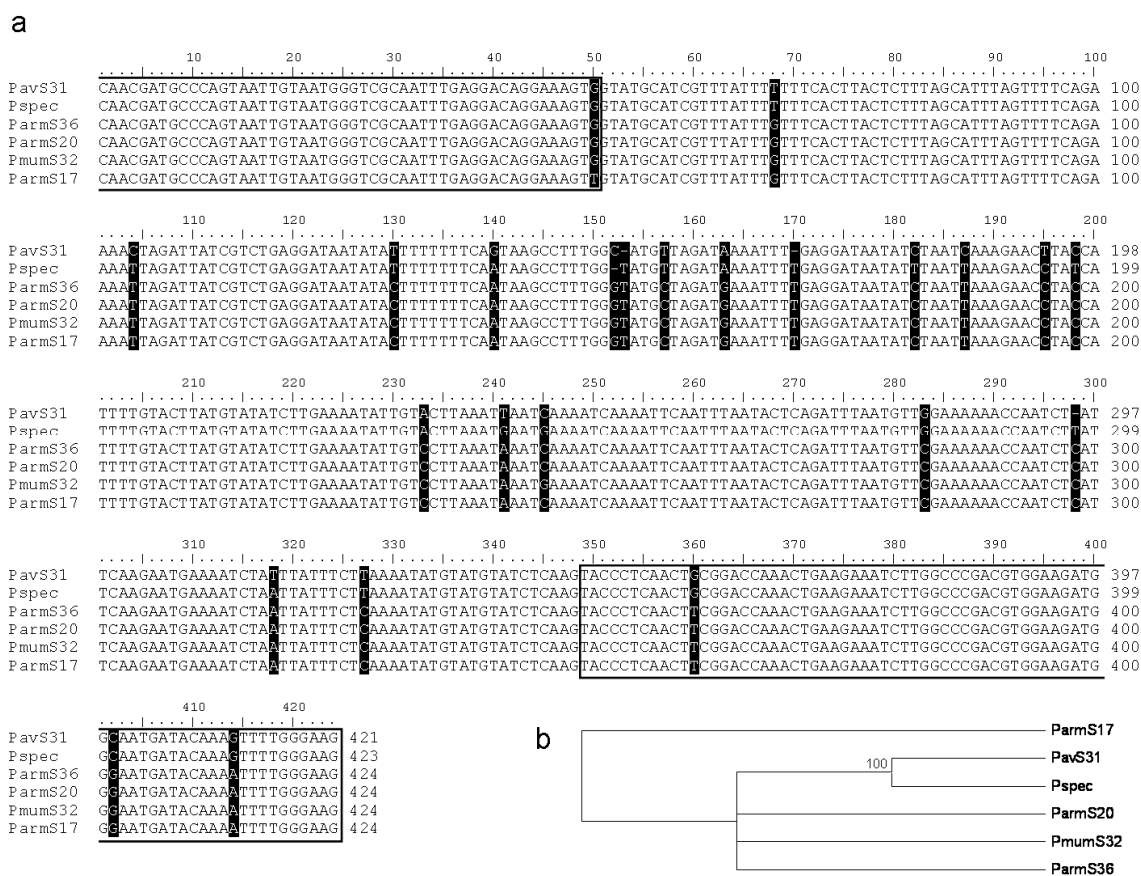
A fragmentumok DNS-szekvenciájának meghatározása lehetővé tette a korábban kizárólag vadcseresznyében kimutatott allélok megbízható azonosítását, melyek igazolásához allélspecifikus primerek nem álltak rendelkezésre. A Coll. 71 által hordozott fragmentum szekvenciája az S_{17} -allél jelenlétét igazolta, míg a ‘Yakacik’ és Coll. 16 az S_{18} -allélt hordozza. A ‘Tabanlı’ fajta esetében egyetlen allélspecifikus reakció sem működött, így meghatároztuk a 975 bp-os második intronrégió DNS-szekvenciáját. A BLASTN analízis 99 %-os azonosságot mutatott ki az S_{19} vadcseresznye alléllal. Mivel a másik allél második intronrégiója 2000 bp körüli méretet mutatott, a fragmentum klónozása nem járt sikerrel. Sikerült azonban az első intronrégióra tervezett konszenzus primerek által elvégzett amplifikációval nyert 451 bp-os fragmentumot klónozni, és szekvenciáját meghatározni. A BLASTN analízis igazolta, hogy az allél megegyezik a spanyol ‘Taleguera Brillante’ (Wünsch és Hormaza, 2004) tájfajtában detektált S_{25} -alléllal (AY259113).

7. táblázat. A munka során meghatározott cseresznye *S-RN-áz* allélszekvenciák GenBank/EMBL adatbázisbeli azonosító száma, a szekvenáláshoz használt genotípus megnevezése, a szekvencia hossza és az *S-RN-áz* gén szekvencia által lefedett régiói

Allél	Adatbázisbeli azonosító	Fajta/Szelektált klón	A szekvencia hossza (bp)	Az <i>S-RN-áz</i> gén szekvencia által lefedett régiói
S_1	JQ280523	Artvin-45 (S_1S_{7m})	827	C2-től a C5-ig
S_3	JQ280520	Coll. 13 (S_3S_4)	253	Szignál peptidtől a C2-ig
S_3	JQ280530	Elifli (S_3S_4)	843	C2-től a C5-ig
S_4	JQ280527	Coll. 56 (S_3S_4)	566	A második intron 3' végétől a C5-ig
S_6	JQ280532	Turfanda (S_6S_9)	530	C2-től a C5-ig
S_{7m}	JQ280516	Artvin-45 (S_1S_{7m})	384	Szignál peptidtől a C2-ig
S_{7m}	JQ280517	Eryataği Amasya 0849 (S_4S_{7m})	384	Szignál peptidtől a C2-ig
S_{7m}	JQ280518	Turfanda Kara (S_4S_{7m})	709	Szignál peptidtől a C2 ig és C3-tól a C5-ig
S_{10}	JQ280519	Aydın Siyahi (S_2S_{10})	1159	Szignál peptidtől a C2-ig és az RHV-tól C5-ig (a második intron 3' végével)
S_{13}	JQ280526	Coll. 43 (S_2S_{13})	823	C2-től a C5-ig
S_{17}	JQ280528	Coll. 71 (S_4S_{17})	749	C2-től a C5-ig
S_{18}	JQ280524	Coll. 16 (S_2S_{18})	615	C2-től a második intron 3' részéig
S_{18}	JQ280533	Yakacık (S_2S_{18})	922	C2-től a C5-ig
S_{19}	JQ280531	Tabanlı ($S_{19}S_{21/25}$)	938	C2-től a C5-ig
$S_{21/25}$	JQ280521	Tabanlı ($S_{19}S_{21/25}$)	400	Szignál peptidtől a C2-ig

S_{31}	JQ280529	Coll. 59 (S_2S_{31})	1007	Szignál peptidtől a C2 ig és C2-től a C5-ig
S_{34}	JQ280525	Coll. 38 (S_4S_{34})	1173	Szignál peptidtől a C2 ig és a második intron 3' végétől a 3' nem transzlálódó régió kezdeti szakaszáig
S_{37}	JQ280522	Artvin-5 ($S_{14}S_{37}$)	522	C2-től a C5-ig

A Coll. 59 szelektált klónban amplifikált 284 bp-os első intronrégió és a 721 bp-os második intronrégió DNS-szekvenciája jelentős mértékű egyezést mutatott az *S*₃₁ vadcserezsnye allél szekvenciájával. A hipervariábilis RHV régiót és a második intront tartalmazó második intronrégió 95 %-ot meghaladó azonosságot mutatott más *Prunus S-RN-áz* allélokkal, például egy *P. speciosa* alléllal (AB289900), a *P. armeniaca S*₃₆ (GU574198), *P. armeniaca S*₂₀ (EF173402) és *P. mume S*₃₂ (JN232977) allélokkal. A szekvenciák illesztése egynukleotidos szekvencia-polimorfizmusokat (SNP) mutatott ki, illetve egynukleotidos inszerció / deléció események következményét tárta fel (9. a. ábra). Az exonrégiókban kimutatott SNP-k egyetlen esetben sem okoznak aminosavcsere-t a transzlált fehérjében (szinonim mutációk). A transz-specifikus allélok szekvenciaillesztése alapján a maximális parszimónia módszerrel készített filogenetikai elemzés megbízhatóan tükrözte a *Prunus* fajok filogenetikai kapcsolatrendszerét (9. b. ábra).



9. ábra. A *Prunus avium S*₃₁-RN-áz allél és transz-specifikus testvéralléljainak (a) illesztése és (b) a maximális parszimónia módszer alapján elvégzett filogenetikai analízise (MEGA 5.1). Az exonokat keret jelöli. Az eltérő pozíciók fekete alapon fehér karakterekkel szerepelnek. Az elemzéshez használt allélok: *P. avium S*₃₁ (PavS31; DQ266443), *P. speciosa* (Pspec; AB289900), *P. armeniaca S*₃₆ (ParmS36; GU574198), *P. armeniaca S*₂₀ (ParmS20; EF173402) és *P. mume S*₃₂ (PmumS32; JN232977).

Az 'Artvin-5' cseresznyefajtából azonosított és a *P. speciosából* leírt allélok további molekuláris vizsgálata megerősítette az allélok közeli rokonságát. Mindössze négy SNP volt kimutatható, melyek közül kettő az intronban, egy az első exonban, a negyedik a második exonban (10. ábra). A négy közül egyetlen egy bizonyult nem szinonim mutációnak, a *P. speciosa* GAC kodon TAC-ra változott, melynek következtében a fehérje RHV régiójában egy nem konzervatív aminosav-csere következik be (D→Y).

Az allélt továbbiakban a természetett cseresznye (*P. avium*) *S*₃₇-*RN-áz* alléljaként javasoljuk elnevezni.

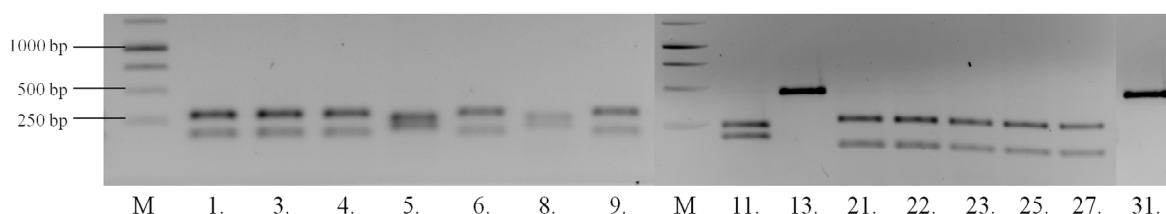
5.2.3. Egy bizonytalan funkciójú *S-RN-áz* allél (*S*_{7m}) azonosítása

Az 'Artvin-45', 'Eryataği Amasya 0849' és 'Turfanda Kara' genotípusok második intronrégiójának PCR-analízise során egy közel 3000 bp méretű fragmentumot mutattunk ki (7. ábra), ami meghaladja valamennyi ismert cseresznye *S-RN-áz* allél második intronméretét. Ennek alapján új, korábban nem azonosított *S-RN-áz* allélnak gondoltuk. A 376 bp méretű első intronrégió DNS-szekvenciája a legnagyobb mértékű hasonlóságot a cseresznye *S*₄-*RN-áz* allél szekvenciájával mutatta, a hasonlóság mértéke 91 % volt, ami alátámasztotta, hogy egy eddig feltehetően nem ismert allélt találtunk. Ennek igazolásához szükség lett volna a második intronrégió szekvenciájára is, hiszen ennek részét képezi az allélspecifitásban jelentős szerepet játszó RHV régió is. A 3 kb méretű fragmentum klónozása azonban sikertelennek bizonyult.

A probléma megoldása érdekében egy új primert (EM-PC3consFD) használtunk fel. Ez a primer a Sutherland és mts. (2004) által közölt EM-PC3consRD primer reverz komplementere, mely forward primerként használható az EM-PC5consRD primerrel. A primer sikeresen működött, és használatával lehetővé vált az *S-RN-áz gén* C3 és C5 régiói közötti szakasz felszaporítása. Az amplifikált régió azonban nem tartalmazta az eltérő méretű intront, így a 'Turfanda Kara' (*S*₄*S*_?) két *S-RN-áz* alléljának megkülönböztetésére egy új eljárást kellett kidolgoznunk. A klónozott fragmentumokat kolónia PCR-rel felszaporítottuk, és *EcoRV* enzimmel (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) hasítottuk, mivel az *S*₄-*RN-áz* kérdéses szekvenciájában megtalálható az enzim hasítóhelye (GAT↓ATC). Az *EcoRV* restrikciós endonukleáz enzim a 246 bp méretű fragmentum 81. nukleotidja után hasít, így 81 és 165 bp méretű termékek keletkeznek. Az M13 forward és reverse primerrel végzett kolónia PCR során a vektor klónozó helyét határoló szekvenciák egy részlete is amplifikálódik (53 bp illetve 101 bp), így annak megfelelően, hogy az inszert milyen

orientációban épült be a vektorba 81 bp + 53 bp = **134 bp** és 165 bp + 101 bp = **266 bp** (11. ábra: 1., 3., 4., 6., 9., 21., 22., 23., 25., 27. klónok), valamint 81 bp + 101 bp = **182 bp** és 165 bp + 53 bp = **218 bp** (11. ábra: 5., 8., 11. klónok) méretű ampliconokat kaphatunk abban az esetben, ha az adott szekvencia rendelkezik az *EcoRV* hasítóhelyével. A 11. ábrán látható, hogy a 13. és 31. számú klónok esetében hasítás nem következett be, mely fragmentum 400 bp-os méretet mutat. A hasítatlan fragmentum ennek alapján azokat az inszerteket mutatja, melyekben a másik, általunk keresett, ismeretlen allél volt megtalálható. Ezeket az inszerteket megszekvenáltuk, és az allél szekvenciája (egy szinonim SNP kivételével) megegyezett a *P. avium* *S*₇-*RN-áz* allél szekvenciájával.

Az első intronrégió DNS-szekvenciája azonban jelentős különbséget mutatott mind méretében, mind szekvenciájában. Ráadásul, a C1 és C2 régiók közötti exonszekvenciában is számos aminosavcsere és inszerció/delécio volt kimutatható. Az allél funkciójával kapcsolatos további információk hiányában, átmenetileg az *S*_{7m}-allél elnevezést javasoljuk.



11. ábra. A bizonytalan funkciójú *S*_{7m}-*RN-áz* allél azonosítására kidolgozott új eljárás ‘Turfanda Kara’ cseresznyefajta esetében. A klónozás során az inszertek beépülésének ellenőrzésére szolgáló kolónia-PCR-t követően az inszertet tartalmazó, pozitív klónokat *EcoRV* restrikciós enzimmel hasítottuk. A fajta ismert funkciójú *S*₄-allélját az alkalmazott restrikciós enzim ismert méretnél hasítja, kétféle hasítási mintázatot mutatva az inszert beépülésének kétféle irányultsága miatt (1., 3., 4., 5., 6., 8., 9., 11., 21., 22., 23., 25., 27. számú klónok). A hasítatlan fragmentum azokat az inszerteket mutatja, melyekben a másik, általunk keresett, ismeretlen allél volt megtalálható (13. és 31. számú klónok). M.: 1 kb méretmarker (Promega, Mannheim, Németország).

5.2.4. A meggy *S*₃₄-*RN-áz* allél kimutatása cseresznyében

A Coll. 38 szelektált klón esetében az első intronrégiót felszaporító primerekkel 454 bp, a második intronrégiót amplifikáló PCR során 1100 bp méretű fragmentumokat kaptunk. A 454 bp-os fragmentumot klónoztuk, és DNS-szekvenciáját meghatároztattuk. A szekvencia a meggy *S*₃₄-*RN-áz* alléllal azonosnak bizonyult, mindössze négy SNP-t találtunk az első

intronban és egy szinonim SNP-t a 2. exonban. Az 1100 bp méretű második intronrégió klónozása sikertelen volt, ezért allélspecifikus primerpárt (Pce34 F + Pce34 R2) terveztünk, mellyel az allél 671 bp méretű részletét amplifikáltuk. A szekvencia a második intron 3' végéből 216 bp-t tartalmazott valamint a 3. exon egészét az RHV régiótól a 3' UTR-ig. A szekvencia 96 %-os azonosságot mutatott a meggy *S*₃₄-RN-áz alléllal, az eltérések zöme (14 SNP és három 1 bp méretű indel) az intronban volt megtalálható. A harmadik exonban összesen három szinonim és három nem szinonim (A→S, Q→R és R→K) aminosavcserét mutattunk ki, mely utóbbiak az RHV régióban illetve az RC4 és C5 régiók között voltak megtalálhatók.

5.2.5. Intraallélikus variációk (*S*₁, *S*₃, *S*₄, *S*₆, *S*₁₀ és *S*₁₃)

Az 'Aydın Siyahı' fajta az *S*₂-allélon kívül az első illetve második intronrégiót felszaporító PCR során az Ipek és mts. (2011) által javasolt *S*₃-allél jellemző intronméreteitől eltérő méretű fragmentumokat eredményezett: az *S*₃-ra jellemző 303 bp első intronrégiójánál nagyobb (410 bp), az *S*₃ második intronrégiójánál (900 bp) kisebb, 730 bp méretű fragmentumot kaptunk. Mindkét fragmentumot klónoztuk, és meghatároztuk a DNS-szekvenciájukat. A szekvencia a cseresznye *S*₁₀-RN-áz allél szekvenciájával azonosnak bizonyult, mindössze egy-egy SNP-t találtunk a két intronban.

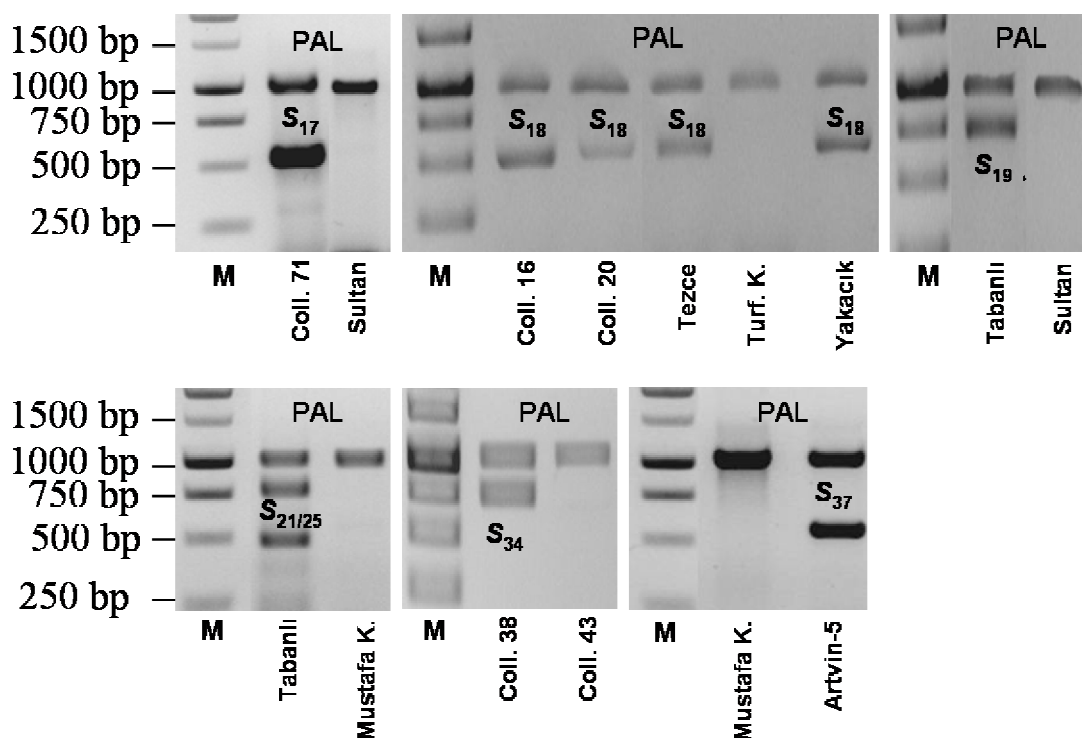
További kisebb szekvencia-eltérések voltak kimutathatók az 'Artvin-45' *S*₁, 'Elifli' *S*₃, 'Turfanda' *S*₆ és Coll. 56 *S*₄ allélok és az adatbázisban fellelhető, árufajtákból szekvenált azonos elnevezésű allélok között. A Coll. 43 *S*₁₃-alléljának első intronjában elhelyezkedő mikroszatellit régió mérete 251 bp volt, míg a második intronban található SSR régió 310 bp. Az utóbbi méretet szekvenálással is igazoltuk, az intronban egy (AT)₁₉ ismétlődő motívum volt jelen.

5.2.6. Allél-specifikus PCR primerek fejlesztése

Eredményeink igazolták, hogy a korábban kidolgozott allélspecifikus PCR primerek kizárólagos használata nem elégséges egy genetikailag változékony mintakör *S*-genotípusának megbízható meghatározásához. A megbízhatóság fokozása csak valamilyen szekvencia-specifikus markerezési technikával oldható meg. Ha a költséges és időigényes

klónozás/szekvenálás szükségességét szeretnénk elkerülni, az allélspecifikus primerekkel végzett PCR adja a legjobb lehetőséget. Ezért az ismert cseresznye, vadcsesznye és meggy *S-RN-áz* allélok illesztése (nem közölt adat) alapján primereket terveztünk a *S*₁₇, *S*₁₈, *S*₁₉, *S*_{21/25}, *S*₃₄ és *S*₃₇-allélok szelektív kimutatására. A primereket belső kontrollal (*fenilalanin-ammónia-liáz* gén, *PAL*) együtt, multiplex PCR-ben teszteltük, hogy kizárjuk a téves negatív eredményeket. A PCR során a legtöbb esetben elegendő volt egyetlen szekvenspecifikus primer használata (reverz primerként), ami a forward primerként használt megfelelő konszenzus primerekkel párosítva megbízhatóan működött (6. táblázat). Az *S*₃₄-*RN-áz* kimutató allélspecifikus primerként az allél szekvenálása során tervezett szekvenáló primereket használtuk (Pce34F és Pce34R2).

Az újonnan fejlesztett allélspecifikus primerek használatával igazoltuk, hogy az *S*₁₇-allélt csak a Coll. 71 szelektált klón, az *S*₁₉- és *S*_{21/25}-allélokot csak a ‘Tabanlı’, az *S*₃₄-allélt a Coll. 38, míg az *S*₃₇-et csak az ‘Artvin-5’ hordozza (12. ábra). Az *S*₁₈-*RN-áz* vadcsesznyeallél ezzel szemben négy genotípusban is kimutatható volt (‘Tezce 0912’ ‘Yakacık’, Coll. 16 és Coll. 20).



12. ábra. Új allélspecifikus primerek felhasználása a cseresznye *S*₁₇, *S*₁₈, *S*₁₉, *S*_{21/25}, *S*₃₄ és *S*₃₇-allélok szelektív kimutatására. M: 1kb méretmarker, PAL: belső kontroll (*fenilalanin-ammónia-liáz* gén egy szakaszának amplifikációja).

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A török cseresznyék *S*-lókuszának variabilitása

A 47 vizsgált török cseresznyéből tizenkét ismert, természetű cseresznyefajtából leírt *S*-*RN*-áz allélt (S_1 - S_7 , S_9 , S_{10} és S_{12} - S_{14}) mutattunk ki. Tekintettel arra, hogy az S_8 , S_{15} és S_{11} -alléljelöléseket használaton kívül helyezték, mert azok az S_3 , S_5 és S_7 -alléloknak felelnek meg (szinonim elnevezések), a Sonneveld és mts. (2001; 2003) által természetű cseresznyefajtából azonosított összesen 13 *S*-*RN*-áz (S_1 - S_7 , S_9 - S_{10} , S_{12} - S_{14} és S_{16}) allél közül csak az S_{16} -os allélt nem mutattuk ki. Az S_{16} -os allél a szicíliai fajtákban fordult elő a legnagyobb relatív gyakorisággal (Marchese és mts., 2007a). A legtöbb vizsgált területen, így az angol fajtákban és vadcsesznyékben (Tobutt és mts., 2004; Vaughan és mts., 2008), a belga vadcsesznyében (De Cuyper és mts., 2005), a litván (Stanys és mts., 2008) és magyar tájfajtákban (Békefi és mts., 2010) is rendkívül ritka volt, míg Horvátországban (Ercisli és mts., 2012) egyáltalán nem volt kimutatható. Eredményeinket megerősíti Ipek és mts. (2011) adatai is, akik szintén török cseresznyefajtákat vizsgáltak, és ezt az allélt nem mutatták ki. Az allél egyenlőtlen területi eloszlásában nem látható egyértelmű tendencia: észak- és dél-európai, illetve nyugati és kelet-európai területeken is megtalálható. Valószínűbbnek tartjuk, hogy Törökországban a 47 minta közül azért nem találtuk meg ezt az allélt, mert ebben a növényanyagban sokkal több allél volt kimutatható az *S*-lókuszban, mint más területeken. Feltételezzük, hogy az S_{16} jelen lehet a géncentrumban, de ha így is van, bizonyára kisebb gyakorisággal, mint pl. a belga vadcsesznyék vagy a szicíliai tájfajták között.

A török cseresznyékben a leggyakrabban előforduló allélok az S_3 - és S_4 -allélok voltak, hasonlóan az USA-beli, német fajtákhoz és magyar tájfajtákhoz (Békefi és mts., 2010; Schuster és mts., 2007; Tobutt és mts., 2004), de más területeken (pl. Lettország, Litvánia és Anglia) is jelentős volt ezen allélok gyakorisága (Lacis és mts., 2008; Stanys és mts., 2008; Tobutt és mts., 2005). Érdekes eltérés mutatkozott az S_1 -allél gyakoriságában, Törökországban sokkal ritkábban fordul elő ez az allél, mint Németországban, az USA-ban és Angliában. Ez a különbség adódhat a nem reprezentatív mintavételből (a 47 török genotípus feltehetően nem reprezentálja tökéletesen a Törökország területén nagy genetikai variabilitást mutató faj allélkészletét), ugyanakkor az is elképzelhető, hogy az allél gyakorisága a nemesítési programok hatására növekedett meg, ahol gyakran használtak S_1 -allélt hordozó perspektivikus fajtákat (pl. a 'Van' vagy a 'Windsor').

A vadcsereznyékből azonosított allélok közül néhányat, pl. S_{17} - S_{19} (De Cuyper és mts., 2005), $S_{21/25}$ (Wünsch és Hormaza, 2004) és S_{31} (Vaughan és mts., 2008) szintén kimutattunk a vizsgált török csereznyékben. Az S_{18} -, S_{19} - és $S_{21/25}$ -allélok nemcsak a vadon növény csereznyeállományokból szelektált klónokban, de a tájfajtákban is megtalálhatók voltak. A vadcsereznye S -allélok közül az S_{17} -allél jelenlétét magyar és olasz fajtákban is igazolták (Békefi és mts., 2003; Marchese és mts., 2007a), az S_{19} -allélt német fajtákban mutatták ki, az $S_{21/25}$ -allélt egy olasz fajtában, az S_{22} -allélt német és olasz fajtákban egyaránt (Marchese és mts., 2007a; Schuster és mts., 2007). Az S_{18} -allél jelenlétét termesztett csereznyében azonban első ízben sikerült igazolnunk. Az allél a szelektált vadcsereznye klónok és a tájfajták lokuszában egyaránt előfordult, ami arra utal, hogy az Izmir és Amasya környékén szelektált tájfajták közeli kapcsolatban állnak az ezekben a régiókban vadon növény vadcsereznyékkal (Ercisli, 2004).

Ezenkívül olyan allélokat is sikerült kimutatnunk, melyeket korábban sem vadcsereznyében, sem termesztett csereznyében nem azonosítottak. Ezek közé tartozik az S_{34} , illetve az általunk S_{37} -nek és S_{7m} -nek elnevezett allélok. Ezek részletes elemzése a 6.3. fejezetben található.

Összesen 26 különböző S -genotípust határoztunk meg a 47 törökországi csereznye vizsgálatával. A leggyakoribb S -genotípus az S_3S_4 volt, ezáltal ezek a fajták (klónok) az amúgy is sok fajtát magába foglaló III. inkompatibilitási csoportot tovább bővítik. A IV. csoportba (S_2S_3) négy fajta tartozott, ahogyan a XXIX. csoportba (S_4S_7) is. Ez utóbbi azért érdekes, mert korábban mindössze három német fajtát ismertünk ezzel a genotípussal (Schuster és mts., 2007). Egy új inkompatibilitási csoportot (S_2S_{18}) találtunk, melyet a nemzetközi nomenklatúra figyelembe vételével XLV. csoportnak javasoltuk elnevezni. A csoportban két török tájfajta 'Tezce 0912' és 'Yakacık' található, továbbá egy szelektált klón (Coll. 16). Ez utóbbi információ elsősorban a török csereznyenemesítési programokban lehet fontos. Érdekes, hogy a 'Tezce 0912' és Coll. 16 ugyanazon törökországi régióból (Amasya) származik, sőt az S_{18} -allélt négy mintában mutattuk ki, ezek közül három ebből a régióból származott. Mindez arra utal, hogy a helyi tájfajták szoros genetikai kapcsolatban állnak a területen élő vadcsereznyékkal, és ezen a területen a vadcsereznye populációkban az S_{18} -allél viszonylag gyakori előfordulást mutathat.

6.2. A korábbi *S*-genotípusok javítása és módszertani fejlesztés

A közelmúltban Ipek és mts. (2011) 40 török cseresznyefajta *S*-genotípusát határozták meg a Sonneveld és mts. (2001; 2003) által kidolgozott konszenzus és allélspecifikus PCR technikával. Az Ipek és mts. (2011) által vizsgált fajták közül 22 a mi kísérleteinkben is szerepelt. Ezek közül 19 esetben ('Abdullah', 'Acı Bursa', 'Bademli 0898', 'Cemal', 'Demir 0903', 'Elifli', 'Halil Efendi', 'Kadı 0878', 'Kara 0908', 'Kara Kiraz', 'Kazancioğlu', 'Kirdar', 'Mustafa Kemalpaşa', 'Niğde', 'Sarı', 'Sultan', 'Sultan Hisar', 'Turfanda' és 'Zeyidali 0906') az *S*-genotípusokat sikerült megerősítenünk.

Három fajta esetében azonban a korább javasolt *S*-genotípusoktól eltérő allél-összetételt határoztunk meg. Ipek és mts. (2011) az 'Aydın Siyahı' fajta esetében S_2S_3 genotípust írtak le, de vizsgálatunkban az S_3 -allélspecifikus primer negatív eredményt adott. Érdekes módon azonban az S_{10} -allélspecifikus primer pozitív eredményt mutatott (6. táblázat). Ráadásul az S_2 -*RN-áz* allélra jellemző intronrégió-méreteken kívül az első intronrégió amplifikálásakor egy 440 bp méretű (az S_3 jellemző mérete 303 bp), a második intronrégió vizsgálatokor egy 730 bp méretű (az S_3 jellemző mérete 898 bp) fragmentumot mutattunk ki. Ezek a méretek az S_{10} -*RN-áz* intronméreteivel mutattak egyezést (Sonneveld és mts., 2003), de a kérdés megnyugtató tisztázása érdekében a fragmentumokat klónoztuk, és DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. A BLASTN analízis 99 % azonosságot (E érték = 0,0) tárt fel az S_{10} -*RN-áz* alléllal.

Ipek és mts. (2011) a 'Kara Gevrek' fajta esetében egy triploid *S*-genotípust javasoltak ($S_3S_5S_6$), eredményeink azonban csak két allél (S_3S_5) jelenlétét igazolták; harmadik fragmentum nem amplifikálódott egyik konszenzus primerpárral sem, illetve az S_6 -allélspecifikus primer is negatív eredményt adott. A triploid genotípust a szerzők elképzelhetőnek tartották, és a belga vadcsesznye populációkban leírt hasonló jelenséggel (De Cuyper és mts., 2005) támasztották alá eredményüket. A ploidia szintet azonban sem mikroszatellit analízissel, sem flow citométerrel nem erősítették meg, szemben De Cuyper és mts. (2005) vizsgálatával, ahol mindkét analízist elvégezték. A triploid cseresznye növekedési intenzitása általában nagyobb, ami erdészeti szempontból kedvező, ugyanakkor a homológ kromoszómák egyenlőtlen eloszlása miatt a meiózis során kialakuló aneuploid ivarsejtek miatt a triploid cseresznyék gyakorlatilag sterilek (Darlington, 1930). Ennek alapján az általunk megállapított diploid genotípus valószínűbb egy tájfajta esetében, melynek szelekciója során a termésbiztonság és a hozam nyilvánvalóan fontos szempontok voltak.

A ‘Tabanlı’ fajta esetében az Ipek és mts. (2011) által javasolt S_2 - és S_{10} -allélok egyikét sem sikerült megerősíteni. Jóllehet a második intronrégió fragmentumainak elkülönítése az agarózgélben nem megbízható (~200 bp eltérés), az első intronrégió esetében a mért értékek jelentősebb mértékben (10–80 bp) tértek el az S_2 - és S_{10} -allélok jellemző méreteitől. További megerősítést jelentett azonban az a tény, hogy Ipek és mts. (2011) eredményeivel ellentétben mind az S_2 -, mind az S_{10} -allélspecifikus PCR negatív eredményt adott (6. táblázat). A klónozható méretű fragmentumok DNS-szekvenciáját meghatároztuk, ami igazolta, hogy a fajta az S_{19} - és $S_{21/25}$ -allélokot hordozza. Feltéve, hogy a vizsgált minták mindkét analízisben fajtaazonosak voltak, ez a jelenség arra hívja fel a figyelmet, hogy a termesztett cseresznyefajták korlátozott számú S -alléljainak kimutatására tervezett konszenzus és allélspecifikus PCR nem megbízható olyan mintakörök esetében, amikor más (pl. vadcsesznye) allélok jelenléte sem kizárható.

Az ‘Aydın Siyahı’ és ‘Tabanlı’ fajták általunk illetve Ipek és mts. (2011) által meghatározott eltérő S -genotípusának háttérében az is állhat, hogy a két kísérletben ugyanazon a fajtanéven nyilvántartott, de eltérő genotípusokat használtunk. A cseresznyemintákat mindkét tanulmányhoz az Atatürk Központi Kutatóintézet yalovai génbankja biztosította, ugyanakkor elképzelhető, hogy a mintákat nem ugyanarról az egyedről gyűjtötték. Tájfajták esetében előfordulhat, hogy a különböző területeken megtalálható egyedek nem klónok, hanem genetikailag valamilyen mértékben különböznek egymástól (Halász és mts., 2010a).

A ‘Tabanlı’ fajta 451 bp méretű első intronrégiójú allélját először S_{25} -allélként azonosítottuk, mert a BLASTN analízis 100 %-os egyezést mutatott a spanyol ‘Taleguera Brillante’ S_{25} -alléllal (Wünsch és Hormaza, 2004). Meg kell azonban említeni, hogy az S_{25} -allél második és harmadik exonjának nagy része megegyezik az S_{21} -allél DNS-szekvenciájával (Vaughan és mts., 2008). Ennek alapján feltételezhető, hogy az S_{21} és S_{25} funkcionálisan azonos allélokot jelölnek, és így a két jelölés szinonim. Ezért a dolgozatban a feltételezhető azonos funkciót kifejező $S_{21/25}$ jelölést alkalmaztuk. Az NCBI adatbázisban az S_{21} -allél első intronrégiójának DNS-szekvenciája nem található meg. Az $S_{21/25}$ -allélspecifikus primert az adatbázisban megtalálható S_{25} -*RN-áz* második intronrégiójának szekvenciája (Wünsch és Hormaza, 2004) alapján terveztük meg, mert a ‘Tabanlı’ kb. 2000 bp méretű fragmentumának klónozása nem volt sikeres. A primer a ‘Tabanlı’ fajta esetében pozitív eredményt adott (12. ábra), ami további bizonyíték az allél jelenlétére. Érdekes azonban, hogy amíg az S_{25} és a német vadcsesznyében kimutatott S_{21} (Schueler és mts., 2006) mindössze néhány nukleotidos eltérést mutatott, a belga vadcsesznye S_{21} -allélja (De Cuyper és mts., 2005) ezektől jelentős mértékben különbözött: számos mutáció (indel és SNP) mutatkozott a

második intron jelentős szakaszán. Tekintettel arra, hogy az $S_{21/25}$ -allélspecifikus primert is olyan intronrégió alapján terveztük, mely a belga és német allél esetében nagyon eltérő (számos SNP és egy négy nukleotidos indel is található ezen a szakaszon), az általunk tervezett primer feltehetően csak az S_{25} -allélt és a német S_{21} -allélt mutatja ki, a belga S_{21} -allél kimutatására azonban nem lesz használható. Ehhez új primer tervezése javasolható.

A konszenzus és allélspecifikus primerekkel elvégzett vizsgálat alapján 12 fajta esetében a teljes S -genotípus nem volt meghatározható. Feltételeztük, hogy ezek a fajták cseresznyében eddig nem azonosított, új allélok, vagy olyan vadcsereznye allélok hordoznak, melyek megbízható kimutatására korábban nem dolgoztak ki módszert. Eredményeink megerősítése illetve a további vizsgálatok idő- és költségigényének mérséklése céljából fontosnak tartottuk allélspecifikus primerek tervezését az S_{17} , S_{18} , S_{19} , $S_{21/25}$, S_{34} és S_{37} allélok megbízható kimutatása érdekében. Valamennyi új primer megbízhatóan működött.

Eredményeink fontos aspektusa, hogy jól mutatják a konszenzus primerek kizárólagos használatának korlátait. A funkcionálisan különböző, ugyanakkor hasonló vagy azonos intronméretű S - RN -áz allélok előfordulásának valószínűsége sokkal nagyobb olyan területeken, ahol az adott fajt nagymértékű genetikai variabilitás jellemzi. Erre a jelenségre jó példa a kelet-európai mandulafajtákban azonosított S_{31H} - RN -áz allél, amelynek intronméretei alig különböznek az S_9 - RN -áz alléltól (Halász és mts., 2008). A csonthéjas fajok géncentrumában vagy annak közelében megtalálható egyedek S -genotípusának meghatározására kétlépcsős vizsgálatot javasolunk, melynek célja egyfelől a megbízhatóság biztosítása, másfelől a fölösleges költségek elkerülése. Az első lépésben előzetes szkrínelést végzünk az intronrégiókat amplifikáló két konszenzus primerpárral, majd a második lépésben a feltételezhető allélok megerősítésére elvégezzük a megfelelő allélspecifikus PCR-t. További vizsgálatokra (újabb allélspecifikus PCR vagy szekvenálás) csak akkor van szükség, ha az elvégzett vizsgálatok hiányos vagy ellentmondásos eredményre vezetnek.

6.3. Az S - RN -áz allélok evolúciós kapcsolatai

A transz-specifikus evolúció jelenségét (két különböző faj bizonyos S -alléljainak szekvenciája nagyobb mértékben hasonlíthat egymáshoz, mint amennyire egy faj két különböző funkciójú S -allélja) a *Solanaceae* családban és a *Maloideae* és *Prunoideae* alcsaládokban egyaránt kimutatták (Ioerger és mts., 1990; Sassa és mts., 1996; Sutherland és mts., 2008). Vizsgálataink során két transz-specifikus S - RN -áz allélt azonosítottunk.

Az egyik az újonnan kimutatott S_{37} cseresznye allél, amelynek genomi DNS-szekvenciája 99 %-os egyezést mutatott a *P. speciosa* S_{13} -RN-ázzal. Ilyen nagymértékű egyezés az allélok között kétféleképpen alakulhat ki: az allélok közös eredetével, vagy az allél introgresszióval történő átkerülésével egyik fajtól a másikba (Sutherland és mts., 2008). A *P. speciosa* S_{13} -RN-áz allélt eddig mindössze két, a Japánhoz tartozó Kouzu szigetén élő egyed genotípusában mutatták ki (Kato és mts., 2007). Az S_{37} -allélt egy Törökország Artvin régiójában szelektált egyed hordozta, így a földrajzi izoláció az introgresszió lehetőségét kizárja. A két allél között kimutatható molekuláris eltérések ugyanakkor alátámasztják, hogy feltehetően mindkét faj közös őstől örökölte ezt az allélt, és a különbségek a fajkeletkezést követő divergens evolúció során jöttek létre. Ennek alapján a mutációk a *Pseudocerasus* (*P. speciosa*) és *Eurocerasus* (*P. avium*) szekciók (Bailey, 1927; Rehder, 1958) szétválását követően alakulhattak ki.

A mutációk többsége a természetes szelekció szempontjából feltehetően semleges hatású, egyetlen aminosavcsere következett be az RHV régióban. Mivel ez a régió jelentős mértékben hozzájárul az allélspecifitás kialakulásához (Matton és mts., 1997), ez a jelenség a transz-specifikus allélok különböző fajokban bekövetkező funkcionális elkülönülésének első lépéseként is értelmezhető. A haplotípus működőképes, hiszen mind a *P. speciosa* (Kato és Mukai, 2004), mind az 'Artvin-5' cseresznyefajta önmeddő (A. Doğan, szóbeli közlés). Érdekes lenne a haplotípusok *SFB* génjének DNS-szekvenciáját összehasonlítani, hogy kiderüljön, a funkció megőrzéséhez szükség volt-e mutációra az *SFB* génben is. Több *SFB*-génváltozat esetében igazolták, hogy képes ugyanazt az *S*-RN-áz szekvenciát sajátként felismerni (Surbanovski és mts., 2007), ami fordítva – a szerzők feltételezése szerint – nem igaz. Ennek igazolására az általunk vizsgált minta és a *P. speciosa* *SFB* génjének illesztése adhat támpontot, de a *Pspec SFB*₁₃-allél DNS-szekvenciája sajnos nem hozzáférhető.

A transz-specifikus evolúció jelensége a Coll. 59 szelektált klónban azonosított vadcsesznye S_{31} -RN-áz allél esetében is kimutatható volt. Ez az allél 95 %-ot meghaladó azonosságot mutatott más *Prunus* *S*-RN-áz allélokkal, például egy *P. speciosa* alléllal, a *P. armeniaca* S_{36} , *P. armeniaca* S_{20} és *P. mume* S_{32} -allélokkal. Az S_{31} - és a 'Ceglédi Piroska' kajszai S_{20} -RN-áz intronrégiók mérete minimális különbséget mutatott: az első intronban a kajszai S_{20} -allél egy AAT ismétlődést hordozott, míg a második intronban három darab egynukleotidos inszerciót. A maximális parszimónia módszer alapján készített filogenetikai analízis a *P. avium* és *P. speciosa* (*Cerasus* alnemzetség) allélokot külön kládba rendezte 100 %-os bootstrap értékkel. Minden más, a *Prunophora* alnemzetségbe tartozó faj (*P. armeniaca* és *P. mume*) allélja a *Cerasus* szekvenciák által alkotott kládon kívül található meg.

Valamennyi mutáció szelekciós szempontból feltehetően semleges hatású (az intronrégióban található, vagy nem okoznak aminosavcserét), és ennek megfelelően az *S*-RN-áz aktivitását nem gátolják. A ‘Ceglédi Piroska’ (S_8S_{20}) kajszifajta önmeddő, így az S_{20} -allél funkciója valóban sértetlen (Halász, 2007). A DNS-szekvenciák közti eltérés mértéke megfeleltethető az allélok hordozó fajok evolúciós szétválása óta eltelt idővel. A *Rosaceae* családon belüli fajkeletkezések relatív ideje ma még nem ismert (<http://paleodb.org>), így ilyen típusú vizsgálatokra is hasznosítható lehet az *S*-RN-áz allélok általunk kimutatott szekvencia-polimorfizmusa (ha a változás sebességét az egyes filogenetikai ágakon azonosnak tekintjük).

A *Prunus* *S*-RN-áz allélok evolúciós változása más allélok (S_1 , S_3 , S_4 , S_6 és S_{10}) szekvencia-polimorfizmusában is tetten érhető volt. A törökországi tájfajták illetve szelektált vadcserezsnye klónok összevetése a nemzetközi adatbázisban található (elsősorban régi európai fajtákból származó) allélszekvenciákkal számos SNP kimutatását tette lehetővé.

Az *S*-RN-áz allélok jelentősebb evolúciós megváltozása leginkább az S_{7m} -allél esetében volt megfigyelhető. A konszenzus PCR vizsgálatok illetve az első intron DNS-szekvenciája új *S*-RN-áz allélnak mutatták. A C3 és C5 régiók közötti exonszakasza azonban megegyezett az S_7 -allél szekvenciájával. A második intron feltehetően szintén jelentős mértékben különbözik az *S*-RN-áz második intronjától, mivel az S_{7m} -allél második intronrégiójának mérete közel 3 kb, szemben az S_7 -alléllal jellemző 2385 bp mérettel (Sonneveld és mts., 2003). Ráadásul az S_7 -allélspecifikus primer is negatív eredményt adott. Jóllehet az *S*-RN-áz gén C1 és C2 régiói között számos aminosavcserét okozó, nem szinonim mutációt azonosítottunk, mindeztidáig nincs kísérletes eredmény arra vonatkozóan, hogy ez a régió szerepet játszik az allélspecificitás kialakításában. A *Pyrus pyrifolia* S_3 -RN-áz enzim négy régiójában (PS1-PS4) mutatták ki a pozitív szelekció hatását (Ishimizu és mts., 1998b), melyek egyike sem felel meg a C1 és C2 régiók közti szakasznak. A pozitív szelekció a fehérjekódoló gének azon szakaszán jelentkezik, ahol a nem szinonim mutációk száma meghaladja a szinonim mutációk számát, vagyis ahol a fehérje aminosav-sorrendjének változása feltehetően evolúciós, adaptív előnyt jelent az élőlény számára. A *Prunus* *S*-RN-áz génben azonban ez a régió sokkal variábilisabb, mint a *Maloideae* gének esetében (Vilanova és mts., 2005; Ortega és mts., 2006; Halász, nem közölt adat), így további vizsgálatok szükségesek az S_7 - és S_{7m} -allélok funkciójának tisztázása érdekében. Az S_{7m} -allél a későbbiekben ahhoz is felhasználható lehet, hogy jellemezni tudjuk a *Prunus* *S*-RN-áz gén C1-C2 régiójának hozzájárulását az allélspecificitás kialakításához.

6.4. Géncentrum és kultúrevolúció az *S*-lókusz tükrében

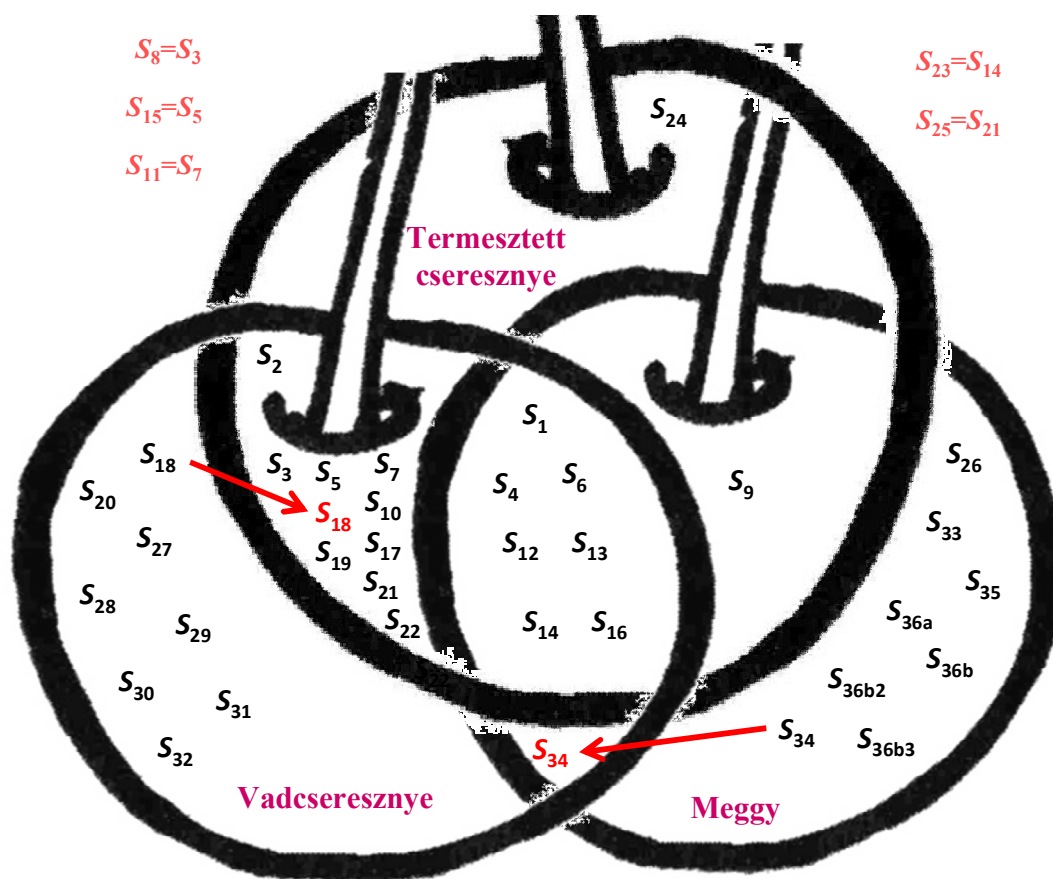
Törökország fekete-tenger-melléki partvidékét csapadékos éghajlat jellemzi. A keleti régió éves csapadékmennyisége átlagosan 2200 mm (Sensoy, 2003). Török kutatók és cseresznyenemesítők a japán *National Agricultural Research Organization* szakértőivel (Hiroshi Yakushiji és Makoto Ishiguro) közösen 2003-ban expedíciót szerveztek a területre, hogy a gyümölcsrepedéssel szemben ellenálló genotípusokat találjanak. Munkájuk során mintegy negyven vadcsereznye egyedet szaporítottak le, és helyeztek ültetvénybe további vizsgálatok céljával. Ezek közül emelték ki a Coll. sorozattal jelölt klónokat, melyeket nemesítési alapanyagként a leginkább perspektivikusnak tartottak. A genotípusok gyümölcsmérete és minősége megközelíti az árufajták értékeit, ugyanakkor nagyfokú repedéssel szembeni rezisztenciát mutatnak.

Tekintettel arra, hogy a klónokat vadcsereznye állományokból szelektálták, nem meglepő, hogy számos olyan allélt (S_{17} , S_{18} és S_{31}) hordoztak, melyet korábban elsősorban vadcsereznyéből mutattak ki (De Cuyper és mts., 2005; Vaughan és mts., 2008). Ugyanakkor vadcsereznye allélokat (S_{18} , S_{19} és $S_{21/25}$) a török tájfajtákban is kimutattunk. Az S_{18} -allél jelenlétét első ízben igazoltuk termesztett cseresznyében ('Tezce 0912' és 'Yakacık'), ami sok egyéb tényező között önmagában is arra utal, hogy a török cseresznyét sokkal szélesebb genetikai háttér jellemzi, mint a fő árufajtákat. Az észak-amerikai nemesítési programok során leggyakrabban mindössze öt genotípust használtak a keresztezésekhez (Choi és Kappel, 2004). A vadcsereznyére jellemző SSR allélok mintegy 40 %-a nem található meg a modern fajtákban, ami arra utal, hogy a nemesítés igen jelentős palacknyak effektust idézett elő (Mariette és mts., 2010). Kajszi és mandula esetében hasonló következtetésre jutottunk (Halász és mts., 2010b; Szikriszt és mts., 2012), ami azt mutatja, hogy Törökország fontos terület lehet a csonthéjas gyümölcsfajok genetikai változékonyságának megőrzésében és e variabilitás nemesítésbeli kiaknázásában.

Érdekes megemlíteni ugyanakkor, hogy korábbi molekuláris markerezési eredmények felvetették, bizonyos török cseresznyefajták közeli genetikai rokonságban állnak ismert nemzetközi árufajtákkal. Kacar és mts. (2005) SSR analízisük alapján a 'Mustafa Kemalpaşa' és a francia 'Noir de Guben' elnevezéseket szinonimnak vélték. Eredményeink ezt nem cáfolják, hiszen a 'Mustafa Kemalpaşa' *S*-genotípusát S_1S_5 -nek határoztuk meg a 'Noir de Guben' fajtával egyező módon (Tobutt és mts., 2005). Gulen és mts. (2010) azonban találtak molekuláris különbséget a két fajta között. Ennek ellenére, ha a két genotípus nem is azonos, közeli rokonságuk bizonyított. Hasonló közelséget írtak le az 'Elifli' és a 'Bigarreau Gaucher'

fajták között, melyek *S*-genotípusa szeminkompatibilis. Ezek alapján a magonc-szülőnövény kapcsolat is feltételezhető lehet a két genotípus között, ennek igazolásához azonban további vizsgálatok szükségesek. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy néhány Törökországban nagyra értékelt tájfajta eljutott Nyugat-Európába, ahol a nemesítési programokban felhasználták azokat. Iezzoni és mts. (1990) véleménye szerint a legtöbb modern cseresznyefajta alig néhány generációs távolságra lehet a régi tájfajtáktól.

Vizsgálataink fényt derítettek a cseresznye és a meggy közötti genetikai kapcsolat egy részére is. Kimutattuk, hogy a Coll. 38 jelű szelektált cseresznyeklón hordozza az *S*₃₄-*RN*-áz allélt, melyet korábban kizárólag meggyfajtákból azonosítottak. Tsukamoto és mts. (2008) hipotézise szerint ez az allél, együtt a meggyben azonosított két másik (*S*₃₃ és *S*₃₅) alléllal a csepleszmeggyből (*P. fruticosa*) származhatott. A termesztett meggyet ugyanis a vadcsesznye és a csepleszmeggy spontán hibridjének tartják (Iezzoni és Hancock, 1996; Tavaud és mts., 2004). Érdekes, hogy Tsukamoto és mts. (2008) maguk is említést tettek egy tanulmányról, melyben a Michigan Állami Egyetem meggy génbankjában megtalálható *P. cerasus* egyedek *S*-genotípusát meghatározták, és az *S*₃₃- és *S*₃₅-allélokot számos egyedben megtalálták, míg az *S*₃₄-allélt egyetlen egyedben sem sikerült kimutatniuk. Igazoltuk, hogy az *S*₃₄-allél megtalálható a vadcsesznyében (13. ábra), így eredményünk megnyugtató módon lezárta ezt a kérdést, és bizonyította, hogy Tsukamoto és mts. (2008) hipotézise nem felel meg a valóságnak. Ráadásul a Coll. 38 a Kastamonu régióból származik, ahol a meggy is gyakori eleme a természetes erdőknek, így a cseresznye és meggy közötti hibridizációnak semmi akadálya nincs.



13. ábra. A teresztett és a vadcsereznye, illetve a vadcsereznye és a meggy átfedő allélkészletét az S_{18} - és S_{34} -allélokkal bővítettük. A szinonim elnevezések pirossal láthatók.

A meggyből azonosított S_{34} -RN-áz (Tsukamoto és mts., 2008) és a cseresznye S_{34} -RN-áz allél között számos SNP-t mutattunk ki, melyek zöme szelekciós szempontból semleges hatású. A három nem szinonim mutáció konzervatív aminosavcserét idéz elő (Patthy, 2007) az RHV régióban és az RC4-C5 régiók közötti szakaszon. Mindkét régióknak fontos szerepe lehet az allélspecificitás kialakításában (Matton és mts., 1997; Ortega és mts., 2006), ami ismét a funkcionális elkülönülés felé mutat. Érdekes megfigyelni, hogy a meggy és cseresznye allél között sokkal nagyobb mértékű szekvencia-eltérés volt kimutatható, mint akár a *Cerasus* és *Prunophora* alnemzetségekbe tartozó egyedek által hordozott S_{31} transzspecifikus testvérallélok között, amelyek független evolúciós múltja bizonyosan hosszabb időt ölel fel. Mindez összefügg a meggy tetraploid genomjával. Az öntermékenyülő fenotípus kialakulásához meggy esetében nem elégséges egyetlen allél funkcióvesztése, mert az öntermékenyülés csak abban az esetben alakul ki, ha a diploid pollenszem által hordozott

mindkét *S*-allél funkcióképtelen (Hauck és mts., 2006). Ennek alapján a meggy bármely *S*-allélját érő mutáció szelekciós szempontból semleges, az allél funkcióvesztése sem okozza az önmeddőség megszűnését. A meggy *S*-*RN-áz* alléljai tehát a tetraploid genomnak köszönhetően a paralóg génekhez hasonlóan mentesek lesznek a mutációk fixációját gátló funkcionális megkötéstől, ezáltal molekuláris megváltozásuk rövidebb idő alatt bekövetkezhet, mint ugyanazon allél megváltozása egy diploid fajban. Ugyanez magyarázza, hogy miért alakulhatott ki sokkal több funkcióképtelen *S*-allél a meggyben, mint a többi diploid csonthéjas gyümölcsfajban (Hegedűs és Halász, 2009).

A cseresznye *S*₁₃-*RN-áz* mindkét intronjában található egy rövid ismétlődő motívumokat tartalmazó, mikroszatellit régió. Marchese és mts. (2010) a közelmúltban kimutatta, hogy mindkét mikroszatellit régió fajspecifikus, intraallélikus méretpolimorfizmust idéz elő. Más és más méretek jellemzők a termesztett cseresznye, vadcsesznye és meggy által hordozott *S*₁₃-allél-variánsokra, amit azok elkülönítésére is fel lehet használni. A termesztett és vadcsesznye *S*₁₃-*RN-áz* alléljának első intronrégióját jellemző SSR méretek 263-273 bp között változtak, a második intronrégió méretei pedig 316-322 bp között.

Az általunk vizsgált minták közül mindössze a Coll. 43 hordozta az *S*₁₃-allélt. Az első intronrégió SSR mérete 251 bp, a második intronban található SSR mérete 310 bp. Ezeket a méretváltozatokat Marchese és mts. (2010) kizárólag meggyben mutatták ki. Ez az eredmény újabb bizonyítékot ad arra, hogy a cseresznye és a meggy allélkészlete átfedő a fekete-tenger-melléki régióban, és a fajok elkülönítésére javasolt, az *S*₁₃-*RN-áz* SSR polimorfizmusán alapuló rendszer félrevezető lehet, ha a géncentrumhoz közeli területeken használjuk.

Az első intronrégió 251 bp-os SSR variánsát mindössze két meggyfajta hordozta, ezek egyike volt a 'Favorit' magyar fajta (Marchese és mts., 2010). A fajta pedigréjében ('Pándy' × 'Montreuilli') szereplő 'Pándy' meggy eredetével kapcsolatosan számos hipotézis született, ezek egyike szerint a fajta őseit egy török katona hozta Magyarországra a török hódoltság idején (Faust és Surányi, 1997). Ez az eredet magyarázatot adhat a rendkívül ritka SSR változat együttes jelenlétére egy magyar meggyfajtában és egy török vadcsesznyében. A magyarázat azonban további vizsgálatot igényel, mert a Michigan Állami Egyetem génbankjában nyilvántartott 'Pándy' klónok (*S*₁*S*₄*S*₃₅*S*_{36b2}) nem hordozzák az *S*₁₃-allélt. Ha a 'Favorit' nemesítése során használt 'Pándy' *S*-genotípusa ettől nem tér el, úgy a 'Favorit' az *S*₁₃-allélt a 'Montreuilli' fajtától örökölhette, amelynek eredete nem ismert. A török és magyar cseresznye és meggy részletesebb vizsgálatával azonban kimutatható lehet a két terület között fennálló történeti kapcsolat, ahogyan azt kajszi esetében is sikerült molekuláris bizonyítékokkal alátámasztani (Halász és mts., 2010b).

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Meghatároztuk 47 török cseresznye tájfajta illetve szelektált klón ivari összeférhetőségét jellemző *S*-genotípusát, az eredmények a repedésre nem hajlamos fajták nemesítése során világszerte felhasználhatók.
- 2) Azonosítottunk egy cseresznyében eddig ismeretlen, új *S-RN-áz* allélt (S_{37}) és egy új inkompatibilitási csoportot (XLV. csoport, S_2S_{18}).
- 3) Bizonyítottuk, hogy a meggyben azonosított S_{34} -*RN-áz* allél a korábbi feltételezésekkel szemben nem a *Prunus fruticosa* fajból, hanem a *Prunus avium* fajból származik.
- 4) A cseresznye géncentrumban jellemző, eredményeink által is igazoltan nagy genetikai változékonysághoz jelentős mértékben hozzájárul a vadcsesznyével és meggyel történő hibridizáció.
- 5) Új allélspecifikus PCR primereket terveztünk több allél kimutatására, melyek növelik az *S*-genotípus meghatározásának megbízhatóságát a nagyobb genetikai variabilitású mintakörök esetében.
- 6) A transz-specifikus *S-RN-áz* allélokban kimutatható, szelekciós szempontból semleges mutációk előfordulása jól korrelált a *Prunoideae* alcsalád fajainak ismert evolúciós kapcsolataival. Az ilyen mutációk ezért filogenetikai elemzésekhez is jól használhatók.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A géncentrum felé közelítve egyre jelentősebb genetikai variabilitás jellemzi a fajokat. A gyümölcsfák *S*-lókuszára vonatkozó információkat elsősorban a termesztett árufajták vizsgálata szolgáltatta, ugyanakkor a legtöbb önmeddő csonthéjas és almatermésű faj esetében napjainkig sem került sor az *S*-lókusz variabilitásának jellemzésére az illető fajok géncentrumában. Az ilyen vizsgálatok nemesítési szempontból, a molekuláris módszerek fejlesztése érdekében, az önmeddőséget meghatározó genetikai háttér megismerése céljából és a faj kultúrevolúciós történetére vonatkozóan egyaránt értékes információkkal szolgálhatnak.

A kísérleteink során 30 Törökországból származó őshonos cseresznyefajtát, valamint 17, a Fekete-tenger mellékén élő vad populációból szelektált klónt vizsgáltunk. Munkánk során tisztázni kívántuk a cseresznye törökországi géncentrumában megtalálható, termesztési és/vagy nemesítési szempontból értékes cseresznyefajták illetve szelektált klónok termékenyülési viszonyait meghatározó *S*-genotípusát. Különös figyelmet fordítottunk esetleges új cseresznye *S-RN-áz* allélok azonosítására és molekuláris vizsgálatára. Fontos célunk volt jellemezni a cseresznye *S*-lókuszának variabilitását a géncentrum területén. Képet kívántunk alkotni, milyen folyamatok állnak a géncentrumra jellemző genetikai változékonyság kialakulásának hátterében. Az *S*-genotípus meghatározására használható molekuláris vizsgálati eljárások fejlesztése gyakorlati, az *S-RN-áz* génben bekövetkezett mutációk feltárása, evolúciós / filogenetikai elemzése elméleti szempontból volt fontos célkitűzés.

A vizsgálatokhoz konszenzus és allélspecifikus PCR-t használtunk, továbbá az amplifikált fragmentumok klónozását, DNS-szekvenciájának meghatározását végeztük el.

A 47 vizsgált török cseresznyéből tizenkét ismert, termesztett cseresznyefajtából leírt *S-RN-áz* allélt (S_1 - S_7 , S_9 , S_{10} és S_{12} - S_{14}) továbbá öt vadcsesznye allélt (S_{17} - S_{19} , $S_{21/25}$ és S_{31}) mutattunk ki. Az S_{18} -allél jelenlétét termesztett cseresznyében első ízben sikerült igazolnunk. Ezenkívül azonosítottunk egy cseresznyében eddig nem ismert, új allélt (S_{37}), egy bizonytalan funkciójú allélt (S_{7m}) és a korábban *P. fruticosa* allélnak gondolt S_{34} -et.

Egy új inkompatibilitási csoportot (S_2S_{18}) alkottunk meg, melyet a nemzetközi nomenklatúra figyelembe vételével XLV. csoportnak javasoltunk elnevezni. A csoportban két török tájfajta 'Tezce 0912' és 'Yakacık' található, továbbá egy szelektált klón (Coll. 16). Ez utóbbi információ elsősorban a cseresznyenemesítési programokban lehet fontos. Három fajta korábban közölt *S*-genotípusát javítottuk, és allélspecifikus PCR-t dolgoztunk ki az S_{17} , S_{18} , S_{19} , $S_{21/25}$, S_{34} és S_{37} allélok azonosítására, mely a nagy genetikai diverzitású mintakör vizsgálatokor is megbízhatóan működött.

Eredményeink alapján az *S-RN-áz* génben bekövetkező, szelekciós szempontból semleges hatású mutációk pontosan tükrözték a *Prunoideae* alcsalád fajainak feltételezett filogenetikai kapcsolatait. Az új *S₃₇-RN-áz* és transz-specifikus alléljai között kimutatott mutációk a *Pseudocerasus* (*P. speciosa*) és *Eurocerasus* (*P. avium*) szekciók szétválása óta eltelt idő alatt halmozódtak fel. Az *S₃₁-RN-áz* allél és transz-specifikus alléljai a *Cerasus* és *Prunophora* alnemzetség szétválását követően, illetve a *Cerasus* alnemzetségen belüli fajkeletkezésig eltelt relatív időtartamokkal arányos mennyiségű mutációt gyűjtöttek.

Az egyetlen kivételt a felhalmozott mutációk mennyisége és a divergenciát követően eltelt időtartam összefüggése alól a cseresznye és meggy által is hordozott *S₃₄*-allél képezte, ahol a meggy tetraploid genomja következtében az allélt sokkal nagyobb mértékű és gyorsabb változás jellemzi. Mindez igazolja a meggy öntermékenyülésének kialakulását leíró, a funkcióképtelen haplotípusok felhalmozódását feltételező molekuláris modell helytállóságát.

A cseresznye *S₁₃-RN-áz* mindkét intronjában található egy rövid ismétlődő motívumokat tartalmazó, mikroszatellit régió, mely fajspecifikus intraallélikus méretpolimorfizmust idéz elő. Az általunk vizsgált Coll. 43 szelektált klón által hordozott *S₁₃*-allél SSR régióinak mérete a korábban kizárólag meggyben kimutatott méretekkal egyezett meg. Ez az eredmény valószínűsíti, hogy a cseresznye és a meggy allélkészlete átfedő a fekete-tenger-melléki régióban.

Eredményeink igazolták, hogy a cseresznye anatóliai régióban feltételezett géncentrumában a faj genetikai változékonysága messze meghaladja az áruajtákra jellemző genetikai változékonyságot. Ez a variabilitás részben az ivaros úton reprodukálódó populációk jelenlétének köszönhető, részben annak, hogy a meggy és a cseresznye hibridizációja is megtörténhet ezeken a területeken.

Ezzel szemben a szűk körű genetikai alapanyagra épülő nemesítési programokból kibocsájtott fajták genetikai változékonysága korlátozott. A géncentrumban jelenlévő variabilitás számos lehetőséget kínál a cseresznyenemesítőknek, melynek kiaknázását a repedéssel szemben ellenálló gyümölcsöt termő fajták nemesítése érdekében meg is kezdték. Eredményeinket ezekben a nemesítési programokban Törökország és más országok kutatói egyaránt felhasználhatják.

9. SUMMARY

Genetic variability generally increases towards the gene centre of a species. Knowledge regarding the *S*-locus variability was mainly provided by analysing commercially grown cultivars, while no data regarding the *S*-locus variability are available from the centre of origin of the most stone fruit or pome fruit species. However, such an analysis should give valuable information for breeding programs, developing new molecular diagnostic tools and clarifying the genetic background of fruit self-incompatibility. In addition, studies may shed light on some aspects of the evolutionary history of the crop.

A total of forty seven Turkish sweet cherry accessions were used for the experiments; those include 30 landrace cultivars and 17 local genotypes selected from populations growing wild at the Black Sea coast.

This study was carried out to determine the *S*-genotype of old Turkish landrace sweet cherry cultivars and some local genotypes that can be used as perspective breeding material. New *S-RNase* alleles were expected to be identified and characterized. We wanted to characterize the level of variability at the *S*-locus in a germplasm growing in the gene centre of sweet cherry. Factors contributing to the formation of the great genetic diversity were also considered. As a practical goal, new allele-specific PCR assays were elaborated to ensure reliable allele assignment in a germplasm of great genetic diversity. Many *S-RNase* alleles were chosen for determining partial DNA sequence and data were analysed from the aspects of *S*-allele evolution and phylogenetic relationships within the *Prunus* genus.

Consensus and allele-specific PCR, cloning of the amplicons and sequencing were used to answer the questions.

Twelve *S-RNase* alleles (S_1 - S_7 , S_9 - S_{10} and S_{12} - S_{14}) and five wild cherry alleles (S_{17} - S_{19} , $S_{21/25}$ and S_{31}) were found in the 47 Turkish sweet cherry accessions. This is the first study to report the S_{18} -allele in cultivated sweet cherry. A new (S_{37}), a functionally doubtful allele (provisionally labelled as S_{7m}) as well as S_{34} -allele previously supposed to be a *P. fruticosa* allele were identified in sweet cherry.

A new cross-incompatibility group, XLV (S_2S_{18}) was established between the cultivars, ‘Tezce 0912’ and ‘Yakacık’ (the selection, Coll. 16 is also included in this group, which might be important during designing parental combinations in a breeding program). Three of the formerly reported *S*-genotypes of Turkish cultivars were improved. We developed allele-specific primers for S_{17} , S_{18} , S_{19} , $S_{21/25}$, S_{34} and S_{37} , all of which worked reliably.

The variations among the DNA sequences not exposed to natural selection of the trans-specific alleles could be correlated with putative phylogenetic relationships within the

Prunoideae subfamily. The variations between the new sweet cherry *S*₃₇-*RNase* and its trans-specific sister alleles might have been accumulated after the divergence of the *Pseudocerasus* (*P. speciosa*) and *Eurocerasus* (*P. avium*) sections. The amounts of fixed mutations in the *S*₃₁-*RNase* allele and its sister alleles reflected the relative length of time periods between the divergence of the *Cerasus* and *Prunophora* subgenera and species formation within the *Cerasus* subgenus.

One notable exception to the correspondences between the number of the fixed mutations and the length of the independent evolutionary histories of DNA sequences was the *S*₃₄-*RNase* in sweet and sour cherry. The allele experienced an accelerated evolution due to the tetraploid genome of sour cherry. The molecular model of self-compatibility in sour cherry includes the accumulation of non-functional *S*-haplotypes, which can be traced back to the same effect.

Microsatellites are associated with both introns of the *S*₁₃-*RNase*, which result in a species-specific intra-allelic length variation. The sizes of the SSR regions in the first and second introns of Coll. 43 *S*₁₃-*RNase* were formerly exclusively found in sour cherry. These data confirm that allele pools of sweet and sour cherry in the Black Sea region are overlapping.

Our results confirmed that sweet cherry displays greater genetic variability in the Anatolian region (the supposed centre of origin of this species) compared with currently grown international cultivars. This variability is partly due to the sexually reproducing populations and partly to the hybridization of sweet and sour cherries.

Cultivars issued from the breeding programs using only a limited number of parental genotypes display more restricted variability. The variability in the Turkish germplasm is available for breeders. Breeding programs using such material were initiated to establish new cultivars with resistance to fruit cracking. Our results might be used in such programs in Turkey and other countries.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőim, **Dr. Halász Júlia** egyetemi docens, valamint **Dr. Hegedűs Attila** egyetemi docens doktori munkám során nyújtott segítségét, és a rengeteg szakmai tanácsot, messzemenő támogatást, melyet doktori éveim alatt nyújtottak. Nélkülük ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Pedryc Andrzej** egyetemi tanárnak, aki a Genetika és Növénynevelés Tanszék tanszékvezetőjeként a doktori munkám megvalósulásához hozzájárult, és lehetőséget nyújtott kísérleteim elvégzéséhez.

A Genetika és Növénynevelés Tanszék összes munkatársának és doktorandusz hallgatójának köszönetemet szeretném kifejezni:

Köszönöm **Benyóné Dr. György Zsuzsanna** egyetemi adjunktusnak a laboratóriumi munkákban felmerült problémáim során adott hasznos tanácsait, ötleteit. Köszönettel tartozom **Lendvay Bertalan** PhD-hallgatónak, aki sok segítséget nyújtott laboratóriumi munkáim során. Köszönöm mindennemű segítségüket **Tóth Veronika** és **Zaheri-A. Sabouran** laboráns kollégáknak.

Köszönöm sok szakmai segítségét és messzemenő támogatását **Dr. Palkovics László** egyetemi tanárnak, a Növénykórtani Tanszék vezetőjének, akinek tanácsaira mindig számíthattam.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni külföldi kollégáinknak:

Köszönöm **Dr. Adnan Doğan**, **Dr. Sezai Ercişli**, valamint **Dr. Ossama Kodad** kollégáknak a közös munkánk során nyújtott számos szakmai segítségét és tanácsait. Nagy megtiszteltetés számomra velük dolgozni. Köszönöm a kísérletek elvégzéséhez a növényanyag biztosítását az Atatürk Központi Kertészeti Kutatóintézetnek.

Végezetül köszönöm **családomnak**, **vőlegényemnek** és **barátaimnak** a rengeteg támogatást, ösztönzést, s hogy doktori éveim és dolgozatom elkészítése alatt mindvégig mellettem álltak.

A kutatásokat az OTKA PD 78124, OTKA K84290, a TÁMOP 4.2.1./B-09/01-KMR-2010-0005 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023 pályázatok, valamint az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja támogatták.

MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

1. Albertini A., Strada G. D. (2001): Monografia di cultivar di Ciliegio dolce e acido (Sweet and sour cherries monography). Roma: Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, 349 p.
2. Anderson, M.A., Cornish, E.C., Mau, S.-L., Williams, E.G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P.J., Haley, J.D., Penschow, J.D., Niall, H.D., Tregear, G.W., Coghlan, J.P., Crawford, R.J., Clarke, A.E. (1986): Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, 321: 38–44.
3. Anderson, M.A., McFadden, G.I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernley, R., Clarke, A.E. (1989): Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. *Plant Cell*, 1: 483–491.
4. Apostol J. (2003): A fontosabb cseresznyefajták ismertetése. In: Hrotkó K.(szerk.) Cseresznye és meggy. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 43–73.
5. Apostol, J. (2005): New sweet cherry varieties and selections in Hungary. *Acta Hort.*, 667: 59–64.
6. Apostol J.-né (1994): Cseresznyefajták és -hibridek értékelése. Budapest: MTA, Kandidátusi értekezés.
7. Apostol, J., Brózik, S. (1998): Cseresznye. In: Soltész M. (szerk.) Gyümölcsfajtaismeret és -használat. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 309–328.
8. Arzani K., Khalighi A. (1998): Pre-season pollen collection and outdoor hybridization for pollinizer determination in sweet cherry cv. Siah Mashad. *Acta Hort.*, 468: 575–579.
9. Bailey LH (1927) The standard cyclopedia of horticulture. Macmillan, London.
10. Bargioni G. (1996): Sweet cherry scions: characteristics of the principal commercial cultivars, breeding objectives and methods. 73–112. p. In: Webster A.D., Looney N.E. (Eds.): Cherries: Crop physiology, production and uses. Cambridge: CAB International, 513 p.
11. Békefi, Zs., Halász, J. (2005): Pollen tube growth in sweet cherry (*Prunus avium* L.) styles in compatible, half compatible and incompatible pollinations. *Int. J. Hort. Sci.*, 11: 63–68.

12. Békefi, Zs., Tobutt, K.R., Sonneveld, T. (2003): Determination of (in)compatibility genotypes of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions by PCR based methods. *Int. J. Hort. Sci.*, 9: 37–42.
13. Békefi, Z., Vaughan, S., Tobutt, K. (2010): Determination of incompatibility (*S*) genotypes of sweet cherries in the Hungarian gene-bank by a PCR-based method. *Acta Agron. Hung.*, 58: 377–384.
14. Bošković, R., Tobutt, K.R. (1996): Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica*, 90: 245–250.
15. Bošković, R., Tobutt, K.R. (2001): Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 475–485.
16. Bošković R., Russell K., Tobutt K.R. (1997): Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphytica*, 95: 221–228.
17. Bošković, R., Russell, K., Tobutt, K.R., Ridout, M.S. (2000): An isoenzyme marker linked to the incompatibility locus in cherry. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 512–518.
18. Bošković, R., Wolfram, B., Tobutt, K.R., Cerović, R., Sonneveld, T. (2006): Inheritance and interactions of incompatibility alleles in the tetraploid sour cherry. *Theor. Appl. Genet.*, 112: 315–326.
19. Brace, J., King, G.J., Ockendon, D.J. (1993): Development of a method for the identification of *S*-alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR amplified DNA with restriction endonucleases. *Sex. Plant Reprod.*, 6:133–138.
20. Bradbury, D. (1929): A comparative study of the developing and aborting fruits of *Prunus cerasus*. *Amer. Journ. Bot.*, 16: 226–242.
21. Broothaerts W. (2003): New findings in apple *S*-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some *S*-alleles. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 703–714.
22. Broothaerts W., Janssens G.A., Proost P., Broekaert W.F. (1995): cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.*, 27: 499–511.
23. Brózik S. (1962): A Germersdorfi óriás cseresznyefajta termékenyülési viszonyai. *Kísérletügyi Közlemények*, 2: 111–144.
24. Brózik S. (1971): Fontosabb cseresznyefajták termékenyülési viszonyai. *MÉM. 1970. évi főbb kutatási eredményei*, p. 132–143.

25. Brózik S., Apostol J., (2000): Cseresznye. In: Brózik, S. Kállay, T-né. (szerk.) Csonthéjas gyümölcsfajták. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
26. Burgos, L., Berenguer, T., Egea, J. (1993): Self- and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience*, 28: 148–150.
27. Castric, V., Vekemans, X. (2004): Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Mol. Ecol.*, 13: 2873–2889.
28. Charlesworth, D. (1985): Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. In: Greenwood, P.J., Harvey, P.H., Slatkin, M. (Eds.) *Essays in Honour of John Maynard Smith*. Cambridge University Press, Cambridge pp. 237–268.
29. Choi, C., Kappel, F. (2004): Inbreeding, coancestry and founding clones of sweet cherries from North America. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 129: 535–543.
30. Clarke, A.E., Newbigin, E. (1993): Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annu. Rev. Genet.*, 27: 257–279.
31. Crane, M.B., Brown, A.G. (1937): Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *J. Pomol. Hort. Sci.*, 15: 86–116.
32. Crane, M.B., Lawrence, W.J.C. (1929): Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *J. Pomol. Hort. Sci.*, 7: 276–301.
33. Cresti, M., Went, van J.L. (1976): Callose deposition and plug formation in *Petunia* pollen tubes *in situ*. *Planta*, 133: 35–40.
34. Cruz-Garcia F., Hancock, C.N., McClure, B. (2003): *S*-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.*, 54: 123–130.
35. Darlington, C.D. (1930): Studies in *Prunus* III. *J. Genet.*, 22: 65–93.
36. Darwin, C. (1877): *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray, London.
37. De Candolle, A. (1894): *Termesztett növényeink eredete*. K.M. Természettudományi Társulat, Budapest.
38. De Cuyper, B., Sonneveld, T., Tobutt, K.R. (2005): Determining selfincompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol. Ecol.*, 14: 945–955.
39. de Nettancourt, D. (2001): *Incompatibility in angiosperms*. Springer-Verlag, New York.
40. de Nettancourt, D., Devreux, M., Bozzini, A., Cresti, M., Pacini, E., Sarfatti, G. (1973): Ultrastructural aspects of the self-incompatibility mechanism in *Lycopersicon peruvianum* Mill. *J. Cell Sci.*, 12: 403–419.

41. Díaz-Mula, H.M., Valero, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Serrano, M. (2009): The functional properties of sweet cherry as a new criterion in a breeding program. *Acta Hort.*, 839: 275–280.
42. Dodds, P.N., Ferguson, C., Clarke, A.E., Newbigin, E. (1999): Pollen-expressed *S*-RNases are not involved in self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Sex. Plant Reprod.*, 12: 76–87.
43. East, E.M., Mangelsdorf, A.J. (1925): A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11:166–171.
44. Ebert P.R., Anderson M.A., Bernatzky R., Altschuler M., Clarke A.E. (1989): Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Cell*, 56: 255–262.
45. Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, S.F., Isogai, A., Takayama, S. (2003): Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic-diversity. *Genes Cells*, 8: 203–213.
46. Ercisli, S. (2004): A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genet. Res. Crop Evol.*, 51: 419–435.
47. Ercizli, S., Radunic, M., Gadze, J., Ipek, A., Skaljac, M., Cmelik, Z. (2012): *S*-RNase based *S*-genotyping of Croatian sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes. *Sci. Hort.-Amsterdam*, Volume 139, 18 May 2012, Pages 21–24
48. Faluba Z. (1982): A fajtahasználat és várható alakulása. *Cseresznye*. 56–73. In: Pór J., Faluba Z. (Szerk.): *Cseresznye és meggy*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
49. Faostat (2010): Agriculture data. [http://apps.fao.org/page/collections?subset = agriculture](http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture)
50. Farkas, Á., Orosz-Kovács, Zs. (2003): Nectar secretion dynamics of Hungarian local pear cultivars. *Plant Syst. Evol.*, 238: 57–67.
51. Faust, M., Surányi, D. (1997): Origin and dissemination of cherry. *Hort. Rev.*, 19: 263–317.
52. Franklin-Tong, V.E. (1999): Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell*, 11: 727–738.
53. Franklin-Tong, V.E. (2002): The difficult question of sex: the mating game. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 14–18.
54. Franklin-Tong, V.E. (2008): *Self-incompatibility in flowering plants*. Springer, Berlin-Heidelberg.
55. Gardner V.R. (1914): A preliminary report on the pollination of the sweet cherry. Oregon Agricultural College Press, Corvallis. 37 p.

56. Gisbert, A.D., Badenes, M.L., Tobutt, K.R., Llacer, G., Romero, C. (2008): Determination of the *S*-allele composition of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in the southeast of Spain by PCR analysis. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 83: 246–252
57. Godini A., Palasciano M., Cozzi G., Petruzzi G. (1998): Role of self-pollination and horticultural importance of self-compatibility in cherry. *Acta Hort.*, 468: 567–571.
58. Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C.B., Hancock, C.N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S, Kim, S, Phillips, T.E, Cruz-Garcia, F, McClure, B. (2006): Compartmentalization of *S*-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, 439: 805–810.
59. Goldway, M., Shai, O., Yehuda, H., Matityahu, A., Stern, R.A. (1999): ‘Jonathan’ apple is a lower potency pollenizer of ‘Topred’ than ‘Golden Delicious’ due to partial *S*-allele incompatibility. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 74: 381–385.
60. Gulen, H., Ipek, A., Ergin, S., Akcay, M.E. (2010): Assessment of genetic relationships among 29 introduced and 49 local sweet cherry accessions in Turkey using AFLP and SSR markers. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 85: 427–431.
61. Halász, J. (2007): A kajszai önmeddőségét meghatározó *S*-allél-rendszer molekuláris háttere. Doktori Értekezés, BCE KTK, Budapest (Kézirat).
62. Halász, J., Hegedűs, A. (2006): A critical evaluation of methods used for *S*-genotyping: from trees to the DNA level. Review. *Int. J. Hort. Sci.*, 12: 19–29.
63. Halász, J., Fodor, Á., Hegedűs, A., Pedryc, A. (2008): Identification of a new self-incompatibility allele (*S*₃₁) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Sci. Hortic.-Amsterdam*, 116: 448–451.
64. Halász J., Fodor A., Pedryc A., Hegedűs A. (2010a): *S*-genotyping of Eastern European almond cultivars: identification and characterization of new (*S*₃₆-*S*₃₉) self-incompatibility ribonuclease alleles. *Plant Breeding*, 129: 227–232.
65. Halász, J., Pedryc, A., Ercisli, S., Yilmaz, K.U., Hegedűs, A. (2010b): *S*-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 135: 410–417.
66. Hauck, N.R., Yamane, H., Tao, R., Iezzoni, A.F. (2006): Accumulation of non-functional *S*-haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics*, 172: 1191–1198.
67. Hedrick, U.P. (1915): The cherries of New York. New York Agr. Exp. Sta., Geneva.
68. Hegedűs, A., Halász, J. (2009): Molecular evolution and breeding consequences of self-(in)compatibility in *Prunus* fruit trees (Chapter 5). In: Huttunen, N., Sinisalo, T.

- (szerk.): Plant Breeding, Agronomy Research and Developments Series, NovaScience Publishers, New York, pp. 181–210.
69. Hegedűs, A., Halász, J., Pedryc, A. (2008): The pistil component: a ribonuclease enzyme. In: Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (Eds.): Morphology of flowers, floral biology, regularities of fertilisation and fertility in fruit species. Akadémiai Kiadó, Budapest.
 70. Hegedűs, A., Lénárt, J., Halász, J. (2012): Review of sexual incompatibility in tree fruit species: molecular interactions and evolutionary dynamics. *Biol. Plantarum*, 56: 201–209.
 71. Herrero, M. (2000): Changes in the ovary related to pollen tube guidance. *Ann. Bot.*, 85:79–85.
 72. Hershko, A., Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 425–479.
 73. Hogg, R. (1860): The fruit manual: containing the descriptions and synonymes of the fruits and fruit trees commonly met with in the gardens & orchards of Great Britain, with selected lists of those most worthy of cultivation. Cottage Gardener Office, London.
 74. Huang, S., Lee, H.S., Karunanandaa, B., Kao, T-h. (1994): Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S-proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*, 6: 1021–1028.
 75. Hugard, J. (1978): Origine du pollen et varietes pollinisatrices. *Fruit Belge*, 46: 11–32.
 76. Iezzoni, A., Schmidt, H., Albertini, A. (1990): Cherries (*Prunus*). In: Genetic resources of temperate fruit and nut crops (Szerk.: Moore, J.N., Ballington, J.R. Jr.). ISHS, Wageningen, pp. 111–173.
 77. Iezzoni, A.F., Hancock, A.M. (1996): Chloroplast DNA variation in sour cherry. *Acta Hort.*, 410: 115–120.
 78. Igic, B., Kohn, J.R. (2001): Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 13167–13171.
 79. Ikeda, K., Igic, B., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N.R., Nakano, R., Sassa, H., Iezzoni, A.F., Kohn, J.R., Tao, R. (2004a): Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.*, 16: 235–243.
 80. Ikeda, K., Watari, A., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N.R., Iezzoni, A.F., Tao, R. (2004b): Molecular markers for the self-compatible S₄'-haplotype, a pollen-part mutant in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 129: 724–728.

81. Ioerger, T.R., Clark, A.G., Kao, T.H. (1990): Polymorphism at the self-incompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9732–9735.
82. Ioerger, T.R., Gohlke, J.R., Xu, B., Kao, T.H. (1991): Primary structural features of the self-incompatibility protein in *Solanaceae*. *Sex. Plant Reprod.*, 4: 81–87.
83. Ipek, A., Gulen, H., Akcay, M.E., Ipek, M., Ergin, S., Eris, A. (2011): Determination of self-incompatibility groups of sweet cherry genotypes from Turkey. *Gen. Mol. Res.*, 10: 253–260.
84. Ishimizu, T., Endo, T., Yamaguchi-Kabata, Y., Nakamura, K.T., Sakiyama, F., Norioka, S. (1998a): Identification of regions in which positive selection may operate in *S*-RNase of *Rosaceae*: Implication for *S*-allele-specific recognition sites in *S*-RNase. *FEBS Lett.*, 440: 337–342.
85. Ishimizu, T., Shinkawa, T., Sakiyama, F., Nakanishi, T. (1998b): Primary structural features of rosaceous *S*-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.*, 37: 931–941.
86. Ishimizu, T., Inoue, K., Shimonaka, M., Saito, T., Terai, O., Norioka, S. (1999): PCR-based method for identifying the *S*-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 961–967.
87. Janssens, G.A., Goderis, I.J., Broekaert, W.F., Broothaerts, W. (1995): A molecular method for *S*-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 691–698.
88. Kacar, A.Y., Iezzoni, A., Cetiner, S. (2005): Sweet cherry cultivar identification by using SSR markers. *J. Biol. Sci.*, 5: 616–619.
89. Kakui, H., Kato, M., Ushijima, K., Kitaguchi, M., Kato, S., Sassa, H. (2011): Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of *S* locus *F*-box brothers genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant J.*, 68: 1028–1038.
90. Kállay Tné (2003): A cseresznye és meggy gazdasági jelentősége, a termesztés jelenlegi helyzete. In: Hrotkó K. (Szerk.): Cseresznye és meggy. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 12–26 p.
91. Kao, T.H., McCubbin, A.G. (1996): How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12059–12065.
92. Kao, T.H., Tsukamoto, T. (2004): The molecular and genetic bases of *S*-RNase based self-incompatibility. *Plant Cell*, 16: S72–S83.

93. Karunanandaa, B., Huang, S., Kao, T.H. (1994): Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S_3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell*, 6: 1933–1940.
94. Kato, S., Mukai, Y. (2004): Allelic diversity of *S*-RNase at the self-incompatibility locus in natural flowering cherry populations (*Prunus lannesiana* var. *speciosa*). *Heredity*, 92: 249–256.
95. Kato S, Iwata H, Tsumura Y, Mukai Y (2007): Distribution of *S*-alleles in island populations of flowering cherry, *Prunus lannesiana* var. *speciosa*. *Genes Genet Syst* 82: 65–75.
96. Kawata, Y., Sakiyama, F., Tamaoki, H. (1988): Amino-acid sequence of ribonuclease T_2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.*, 176: 683–697.
97. Kim, H.-T., Hirata, Y., Shin, Y.-U., Hwang, H.-S., Hwang, J.-H., Shin, I.-S., Kim, D.-I., Kang, S.J., Kim, H.-J., Shin, D.-Y., Nou, I.-S. (2004): A molecular technique for selection of self-compatible varieties of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Euphytica*, 138: 73–80.
98. Kitahara, K., Matsumoto, S. (2002a): Sequence of the S_{10} cDNA from ‘McIntosh’ apple and a PCR-digestion identification method. *HortScience*, 37: 187–190.
99. Kitahara, K., Matsumoto, S. (2002b): Cloning of the S_{25} cDNA from ‘McIntosh’ apple and an S_{25} -allele identification method. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 77: 724–728.
100. Kobel, F.P., Steinegger, P. (1933): Die Befruchtungsverhältnisse Schweizerischer Kirscharten. *Landwirtschaftlichen Jahrbuch der Schweiz*, 47: 973–1018.
101. Kollár, G. (2003) A cseresznye és a meggy tárolása és feldolgozása. In: Hrotkó, K. (szerk.) *Cseresznye és meggy*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 365–370.
102. Kubo, K.I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A.M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S.I., Ando, T., Isogai, A., Kao, T.H., Takayama, S. (2010): Collaborative non-self recognition system in *S*-RNase-based self-incompatibility. *Science*, 330: 796–799.
103. Lacis, G., Kaufmane, E., Rashal, I., Trajkovski, V., Iezzoni, A. (2008): Identification of self-incompatibility alleles in Latvian and Swedish sweet cherry genetic resources collections by PCR based typing. *Euphytica*, 160: 155–163.
104. Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y. (2002): An F-box gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.*, 50: 29–42.
105. Lane, W.D., Schmidt, H. (1984): Lapins and ‘Sunburst’ sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.*, 64: 211–214.

106. Lang, G., Ophardt, D., Olmstead, J. (1998): Sweet cherry breeding at Washington State University. *Acta Hort.*, 468: 97–104.
107. Lapins, K.O. (1971): ‘Stella’, a self-fruitful sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.*, 51: 252–253.
108. Larsen, K. (1977). Self-incompatibility in *Beta vulgaris* L. *Hereditas*, 85: 227–248.
109. Lechner, E, Achard, P, Vansiri, A, Potuschak, T, Genschik, P (2006): F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol.*, 9:631–638.
110. Lewis, D. (1949): Structure of the incompatibility gene. II. Induced mutation rate. *Heredity*, 3: 339–355.
111. Lewis, D. (1954): Comparative incompatibility in Angiosperms and Fungi. *Adv. Genet.*, 6: 235–281.
112. Lewis, D. (1960): Genetic control of specificity and activity of the *S*-antigen in plants. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 151: 468–477.
113. Lewis, D., Crowe, L.K. (1954): Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutations in *Prunus avium* L. *Heredity*, 8: 357–363.
114. Lippay, J (1667): „Pozoni kert”, harmadik kötet: Gyümölcsös kert (Bécs).
115. Lundqvist, A. (1956): Self-incompatibility in rye. *Hereditas*, 42: 293–348.
116. Luu, D.-T., Qin, X., Morse, D., Cappadocia, M. (2000): *S*-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, 407: 649–651.
117. Maliga P. (1952): Badacsonyi és Germersdorfi cseresznye termékenyülési adatai. *Agrár Egy. Kert. és Szőlőgazdasági Kar Évkönyve*, p. 27–49.
118. Marchese, A., Tobutt, K.R. Raimondo, A., Motisi, A., Boškovic, R.I., Clarke, J., Caruso, T. (2007a): Morphological characteristics, microsatellite fingerprinting and determination of incompatibility genotypes of Sicilian sweet cherry cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 82: 41–48.
119. Marchese, A., Boškovic, R.I., Caruso, I., Raimondo, A., Cutuli, M., Tobutt, K.R. (2007b): A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry ‘Kronio’, S_5^1 , attributable to a pollen-part mutation in the *SFB* gene. *J. Exp. Bot.*, 58: 4347–4356.
120. Marchese, A., Bošković, R., Caruso, T., Tobutt, K. (2010): Intra-allelic variation in introns of the *S₁₃-RNase* allele distinguishes sweet, wild and sour cherries. *Tree Genet. Genomes*, 6: 963–972.
121. Mariette, S., Tavaud, M., Arunyawat, U., Capdeville, G., Millan, M., Salin, F. (2010): Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*, 11: 77.

122. Martin, F.W. (1959): Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain. Technol.*, 34: 125–128.
123. Matsumoto, S., Kitahara, K. (2000): Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. *HortScience*, 35: 1329–1332.
124. Matsumoto, S., Komori, S., Kitahara, K., Imazu, S., Soejima, J. (1999): *S* genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of ‘Megumi’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 68: 236–241.
125. Matsumoto, S., Kitahara, K., Furusawa, Y., Soejima, J., Komatsu, H., Fukui, H. (2003): *S*-allele genotype of apple cultivars and selections. *Acta Hort.*, 622: 389–396.
126. Matthews, P. (1970): Genetics and exploration of self-fertility in the sweet cherry. *Proc. Angers Fruit Breeding Symp.*, 307–316 p.
127. Matthews, P., Dow, K.P. (1969): Incompatibility groups: sweet cherry (*Prunus avium*). In: R.L. Knight (Ed.) *Abstract Bibliography of Fruit Breeding & Genetics to 1965, Prunus*, pp. 540–544. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal.
128. Matton, D.P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., Cappadocia, M. (1997): Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell*, 9: 1757–1766.
129. Mau, S.-L., Raff, J., Clarke, A.E. (1982): Isolation and partial characterization of components of *Prunus avium* L. styles, including an antigenic glycoprotein associated with a self-incompatibility genotype. *Planta*, 156: 505–516.
130. McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J., Sakiyama, F., Clarke, A.E. (1989): Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, 342: 955–957.
131. McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A., Clarke, A.E. (1990): Self incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen RNA. *Nature*, 347: 757–760.
132. McCubbin, A.G., Kao, T.H. (2000): Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16: 333–364.
133. Meng, X, Hua, Z, Sun, P, Kao, TH. (2011): The amino terminal F-box domain of *Petunia inflata* *S*-locus F-box protein is involved in the *S*-RNase-based self-incompatibility mechanism. *AoB Plants*, plr016.
134. Milatović, D., Nikolić, D. (2007): Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 82: 170–174.
135. Mohácsy, M., Maliga, P. (1956): *Cseresznye és meggytermesztés*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

136. Nunes, M.D.S, Santos, R.A.M., Ferreira, S.M., Vieira, J., Vieira, P. (2006): Variability patterns and positively selected sites at the gametophytic selfincompatibility pollen SFB gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) population. *New Phytol.*, 172: 577–587.
137. Nyéki J. (1974): Meggyfajták virágzása és termékenyülése. Budapest: Kandidátusi értekezés.
138. Nyéki, J. (1989): Csonthéjas gyümölcsűek virágzása és termékenyülése. Budapest: MTA Doktori értekezés.
139. Nyéki, J., Szabó, Z. (1995): Cross-incompatibility in stone fruits. *Hortic. Sci.*, 28: 23–31.
140. Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (2002): Fajtatársítás a gyümölcstetvényekben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
141. Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z., Benedek, P. (2003): Megoldásra váró kutatási feladatok a gyümölcsfajok virágzásbiológiájában. L.O.V. Tud. Ülésszak Összefoglalók, Kertészettudomány, Budapest. p. 338–339.
142. Nyujtó, F., Brózik Jr., S., Brózik, S., Nyéki, J. (1985): Fruit set in apricot varieties. *Acta Agron. Acad. Sci. Hung.*, 34: 65–72.
143. O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H. (1977): High resolution twodimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12:1133–1141.
144. Olmstead, J.W., Whiting, M.D., Lang, G.A. (2005): New sweet cherry cultivars and selections from Washington State University. *Acta Horticulturae*.
145. Ortega, E., Bošković, R.I., Sargent, D.J., Tobutt, K.R. (2006): Analysis of *S-RNase* alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Mol. Genet. Genomics*, 276: 413–426.
146. Patthy, L. (2007): Protein evolution, 2. kiadás. Blackwell, Oxford.
147. Paydaş S, Eti S, Derin K, Yaşa E (1998). Investigations on the finding of effective pollinator(s) for Taurus sweet cherries. In: Ystaas J (Ed.). Third Int. Cherry Symp., *Acta Hort.* 468: 583–590.
148. Pór J., Faluba Z. (1982): Cseresznye és meggy. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, p. 49–56.
149. Ravid, T., Hochstrasser, M. (2008): Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9: 679–90.

150. Rehder A (1958) Manuel of cultivated trees and shrubs hardy in North America. Macmillan, New York.
151. Richman, A.D., Kao, T.H., Schaeffer, S.W., Uyenoyama, M.K. (1995): *S*-allele sequence diversity in natural populations of *Solanum carolinense* (Horsenettle). *Heredity*, 75: 405–415.
152. Ryan, C.A., Farmer, E.E. (1991): Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 651–674.
153. Sassa, H., Hirano, H., Ikehashi, H. (1992): Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) *Plant Cell Physiol.*, 33:811–814.
154. Sassa, H., Hirano, H., Ikehashi, H. (1993): Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Mol. Gen. Genet.*, 241: 17–25.
155. Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T., Ikehashi, H. (1996): Self-incompatibility (*S*) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.*, 250: 547–557.
156. Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada, T., Ushijima, K., Kusaba, M., Hirano, H., Koba, T. (2007): *S* locus *F-Box* brothers: Multiple and pollen-specific *F-box* genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics*, 175: 1869–1881.
157. Sassa, H., Kakui, H., Minamikawa, M. (2010): Pollen-expressed *F-box* gene family and mechanism of *S-RNase*-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in *Rosaceae*. *Sex Plant Reprod.*, 23: 39–43.
158. Schmidt, H., Timmann, E. M. (1997): On the genetics of incompatibility in sweet cherries 1. Identification of *S* alleles in self incompatible cultivars. *Gartenbauwissenschaft*, 62: 102–105.
159. Schmidt, H., Wolfram, B., Bošković, R. (1999): Befruchtungsverhältnisse bei Süßkirschen. *Erwerbsobstbau*, 41: 42–45.
160. Schneider, D., Stern, R.A., Eisikowitch, D., Goldway, M. (2001): Analysis of *S* alleles by PCR for determination of compatibility in the ‘Red Delicious’ apple orchard. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 76: 596–600.
161. Schrauwen, J., Linskens, H.F. (1972): Ribonuclease in styles. *Planta*, 102: 277–285.
162. Schueler, S., Tusch, A., Scholz, F. (2006): Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Mol. Ecol.*, 15: 3231–3243.

163. Schuster, M., Flachowsky, H., Köhler, D. (2007): Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions and cultivars of the German Fruit Gene Bank and from private collections. *Plant Breeding*, 126: 533–540.
164. Sensoy, S. (2003): Climate of Turkey. Turkish State Meteorological Service. <http://213.139.210.130/2003eng/general/climate/climateofturkey.htm>.
165. Soltész M. (1998): A fajták megválasztása. In: Soltész, M. (szerk.) Gyümölcsfajtaismeret és -használat. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 59–73.
166. Soltész M. (2000): Gyümölcsfajok virágzási ideje. L.O.V. Tud. Ülészak, Budapest, Összefoglalók, Kertészettudomány, 288–289.
167. Sonneveld, T., Robbins, T.P., Bošković, R., Tobutt, K.R. (2001): Cloning of six sweet cherry self-incompatibility alleles and development of allelespecific PCR detection. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 1046–1055.
168. Sonneveld, T., Tobutt, K.R., Robbins, T.P. (2003): Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles S_1 to S_{16} using consensus and allele-specific primers. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1059–1070.
169. Sonneveld, T., Tobutt, K.R., Vaughan, S.P., Robbins, T.P. (2005): Loss of pollen-*S* function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an *S* haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell*, 17: 37–51.
170. Sonneveld, T., Robbins, T.P., Tobutt, K.R. (2006): Improved discrimination of self incompatibility *S*-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding*, 125: 305–307.
171. Stancevic, A.S. (1971): Fertility examinations in some important sweet cherry cultivars (in Serbian). *Jugoslovensko Vocarstvo*, 17–18: 149–162.
172. Stanys, V., Stanyté, R., Staniené, G., Vinskiené, J. (2008): *S*-allele identification by PCR analysis in Lithuanian sweet cherries. *Biologija*. Vol. 54. Nr. 1. P. 22–26.
173. Stevens, P.F. (2012): Angiosperm Phylogeny Website, version 12. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
174. Stösser, R. (1980): Über das Wachstum von Pollenschläuchen bei *Prunus*, dargestellt anhand von Schnittpräparaten. *Angewandte Botanik*, 54: 319–327.
175. Stösser, R., Anvari, S. F. (1981): Das Wachstum der Pollenschläuche im Fruchtknotengewebe von Kirschen. *Gartenbauwissenschaft*, 46:154–158.
176. Surbanovski, N., Tobutt, K.R., Konstantinović, M., Maksimović, V., Sargent, D.J., Stevanović, V., Bošković, R. (2007): Self-incompatibility of *Prunus tenella* and

- evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different *SFB* alleles coupled with an identical *S-RNase* allele. *Plant J.*, 50: 723–734.
177. Sutherland, B.G., Robbins, T.P., Tobutt, K.R. (2004): Primers amplifying a range of *Prunus* *S*-alleles. *Plant Breeding*, 123: 582–584.
 178. Sutherland, B.G., Tobutt, K.R., Robbins, T.P. (2008): Trans-specific *S-RNase* and *SFB* alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Mol. Genet. Genomics*, 279: 95–106.
 179. Szabó, Z., Nyéki, J., Soltész, M. (2002): Cseresznye. 177–192. p. In: Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (Szerk.): Fajtatársítás a gyümölcsültetvényekben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
 180. Szabó, Z., Balmer, M., Fieszl, Cs., Farkas, J. (2011): Fajtahasználat. In: Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (szerk). Intenzív cseresznyetermesztés. Debreceni Egyetem, AGTC Kutatási és Fejlesztési Intézet, Kecskeméti Főiskola, Kertészeti Főiskolai Kar, p. 9–28.
 181. Szikriszt, B., Papp, N., Halász, J., Nyéki, J., Szabó, Z., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2011a): Preliminary evaluation of breeding perspectives of Ukrainian sweet cherry cultivars: nutraceutical properties and self-incompatibility. *Int. J. Hort. Sci.*, 17: 7–11.
 182. Szikriszt, B., Hegedűs, A., Halász, J. (2011b): Review of genetic diversity studies in almond (*Prunus dulcis*). *Acta Agron. Hung.*, 59: 379–395.
 183. Szikriszt, B., Ercisli, S., Hegedűs, A., Halász, J. (2012): Self-incompatibility alleles in Eastern European and Asian almond (*Prunus dulcis*) genotypes: a preliminary study. *Int. J. Hort. Sci.*, 18: 23–26.
 184. Takasaki, T., Moriya, Y., Okada, K., Yamamoto, K., Iwanami, H., Bessho, H., Nakanishi, T. (2006): cDNA cloning of nine *S* alleles and establishment of a PCR-RFLP system for genotyping European pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 112: 1543–1552.
 185. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.
 186. Tao, R., Iezzoni, A. (2010): The *S-RNase*-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hortic.-Amsterdam*, 134: 423–433.

187. Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A. Murayama, H., Sassa, H., Mori, H. (1999): Molecular typing of *S*-alleles through identification, chracterization and cDNA cloning for *SRNases* in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124:224–233.
188. Tavaud, M., Zanetto, A., David, J.L., Laigret, F., Dirlewanger, E. (2004): Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus x gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity*, 93: 631–638.
189. Terpó, A. (1974): Gyümölcsstermő növényeink rendszertana és földrajza. In: Gyúró, F. (szerk.) A gyümölcsstermesztés alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 4: 103–131.
190. 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. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673–4680.
191. Thompson, M. (1996): Flowering, pollination and fruit set. 223–242. p. In: Webster, A.D., Looney, N.E. (Eds.): *Cherries: Crop physiology, production and uses*. Cambridge: CAB International. 513 p.
192. Thompson, R.D., Kirch, H.-H. (1992): The *S* locus of flowering plants: when self rejection is self-interest. *Trends Genet.*, 8: 381–387.
193. Tobutt, K.R., Sonneveld, T., Bošković R. (2001): Cherry (in)compatibility genotypes - harmonization of recent results from UK, Canada, Germany, Japan and USA. *Eucarpia Fruit Breeding Section Newsletter*, 5: 41–46.
194. Tobutt, K.R., Bošković, R., Cerović, R., Sonneveld, T., Ružić, D. (2004): Identification of incompatibility alleles in the tetraploid species sour cherry. *Theor. Appl. Genet.*, 108: 775–785.
195. Tobutt, K.R., Sonneveld, T., Bekefi, Z., Bošković, R. (2005): Cherry (in)compatibility genotypes - an updated cultivar table. *Acta Hort.*, 663: 667–671.
196. Tomcsányi, P. (1979): Gyümölcsfajtáink. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
197. Tóth, M., Simon, G., (2009): Cseresznye. In: Tóth, M. (szerk.) Gyümölcsfaj- és fajtaismeret. Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcsstermő Növények Tanszék, Budapest, p. 85–102.
198. Tsai, D.-S., Lee, H.-S., Post, L.C., Kreiling, K.M., Kao, T.H. (1992): Sequence of an *S*-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous *S*-proteins. *Sex. Plant Reprod.*, 5: 256–263.
199. Tsukamoto, T., Potter, D., Tao, R., Vieira, C.P., Vieira, J., Iezzoni, A.F. (2008): Genetic and molecular characterization of three novel *S*-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *J. Exp. Bot.*, 59: 3169–3185.

200. Tukey, H.B. (1933): Embryo abortion in early-ripening varieties of *Prunus avium*. Bot. Gaz., 94: 433–468.
201. Tukey, H.B. (1934): Growth of the embryo, seed and pericarp of the sour cherry (*Prunus cerasus*) in relation to season of fruit ripening. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 31: 125–144.
202. Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Hirano, H. (1998): Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in *Rosaceae*. Mol. Gen. Genet., 260:261–268.
203. Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Tao, R., Hirano, H. (2003): Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. Plant Cell, 15: 771–781.
204. Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N.R., Iezzoni, A.F., Tao, R. (2004): The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. Plant J., 39: 573–586.
205. Uyenoyama, M.K. (1995): A generalized least squares estimate for the origin of sporophytic self-incompatibility. Genetics, 139: 975–992.
206. Van Nerum, I., Geerts, M., Van Haute, A., Keulemans, J., Broothaerts, W. (2001): Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative “new” S-alleles. Theor. Appl. Genet., 103: 584–591.
207. Vaughan, S.P., Russel, K., Sargent, D.J., Tobutt, K.R. (2006): Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. Theor. Appl. Genet., 112: 856–866.
208. Vaughan S, Bošković R, Gisbert-Climent A, Russell K, Tobutt K (2008) Characterisation of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). Tree Genet. Genomes 4: 531–541.
209. Vavilov, N.I. (1926): The mountainous districts as the home of agriculture. Studies on the origin of cultivated plants. Bul. Appl. Bot. in: Plant Breeding, 16:218–220.
210. Verdoodt, L., Van Haute, A., Goderis, I.J., De Witte, K., Keulemans, J., Broothaerts, W. (1998): Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. Theor. Appl. Genet., 96: 294–300.
211. Vieira, C.P., Charlesworth, D., Vieira, D. (2003): Evidence for rare recombination at the gametophytic self-incompatibility locus. Heredity, 91: 262–267.

212. Vierstra, R.D. (2003): The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.*, 8: 135–142.
213. Vilanova, S., Romero, C., Llácer, G. Badenes, M.L., Burgos, L. (2005): Identification of self-(in)-compatibility alleles in apricot by PCR and sequence analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130: 893–898.
214. Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999): The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:1015–1068.
215. Waite, M.B. (1894): The pollination of pear flowers. *U.S.D. Agr. Div. Veget. Pathol. Bull.*, 5: 3–86.
216. Wassarman, P.M. (1990): Profile of a mammalian sperm receptor. *Development*, 108: 1–17.
217. Weaver, R.F., Hedrick, P.W. (2000): *Genetika. Panem Könyvkiadó, Budapest.*
218. Wheeler, M.J., de Graaf, B.H.J., Hadjiosif, N., Perry, R.M., Poulter, N.S., Osman, K., Vatovec, S., Harper, A., Franklin, F.C.H., Franklin-Tong, V.E. (2009): Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature*, 459: 992–995.
219. Wiersma, P.A., Wu, Z., Zhou, L., Hampson, C., Kappel, F. (2001): Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 700–708.
220. Williams, E.G., Ramm-Anderson, S., Dumas, C., Mau, S.L., Clarke, A.E. (1982): The effect of isolated components of *Prunus avium* L. styles on *in vitro* growth of pollen tubes. *Planta*, 156: 517–519.
221. Wilson, C.M. (1975): Plant nucleases. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26: 187–208.
222. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2004): Genetic and molecular analysis in ‘Cristobalina’ sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sex. Plant Reprod.*, 17: 203–210.
223. Wünsch, A., Tao, R., Hormaza, J.I. (2010): Self-compatibility in Cristobalina sweet cherry is not associated with duplications or modified transcription levels of *S*-locus genes. *Plant Cell Rep.*, 29: 715–721.
224. Wyen, N.V., Erdei, S., Udvardy, J., Bagi, G., Farkas, G.L. (1972): Hormonal control of nuclease level in excised *Avena* leaf tissues. *J. Exp. Bot.*, 23:37–44.
225. Yamane, H., Tao, R., Sugiura, A., Hauck, N.R., Iezzoni, A.F. (2001): Identification and characterization of *S-RNases* in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126: 661–667.

226. Yamane, H., Ikeda, K., Hauck, N.R., Iezzoni, A.F., Tao, R. (2003a): Self incompatibility (*S*) locus region of the mutated *S*₆-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen *S* allele and a nonfunctional pistil *S* allele. *J. Exp. Bot.*, 54: 2431–2437.
227. Yamane, H., Ikeda, K., Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R. (2003b): A pollen expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for *S*-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol.*, 44: 764–769.
228. Zhang, L., Chen, X., Chen, X., Zhang C., Liu, X., Ci, Z., Zhang, H., Wu, C., Liu, C. (2008): Identification of self-incompatibility (*S*-) genotypes of Chinese apricot cultivars, *Euphytica*, 160: 241–248.
229. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, 7: 203–214.
230. Zhu, M., Zhang, X., Zhang, K., Jiang, L., Zhang, L. (2004): Development of a simple molecular marker specific for detecting the self-compatible *S*₄' haplotype. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 387–398.
231. Zisovich, A.H., Stern, R.A., Shafir, S., Goldway, M. (2004a): Identification of seven *S*-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 79: 101–106.
232. Zisovich, A.H., Stern, R.A., Shafir, S., Goldway, M. (2004b): The RHV region of *S*-RNase in European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sex. Plant Reprod.*, 17: 151–156.
233. Zuccherelli, S., Tassinari, P., Broothaerts, W., Tartarini, S., Dondini, L., Sansavini, S. (2002): *S*-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sex. Plant Reprod.*, 15: 153–158.