

Doktori (PhD) értekezés

**A KAJSZI ÖNMEDDŐSÉGÉT MEGHATÁROZÓ
S-ALLÉL-RENDSZER MOLEKULÁRIS HÁTTERE**

Halász Júlia

Témavezető: Dr. Pedryc Andrzej, CSc
egyetemi docens

Budapesti Corvinus Egyetem
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest
2007

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológiai tudományok

vezetője: Dr. Papp János, DSc
egyetemi tanár
BCE, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Pedryc Andrzej, CSc
egyetemi docens
BCE, 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 vitára bocsátható.

.....
Dr. Papp János

Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Pedryc Andrzej

A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2007. február 13-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Tóth Magdolna, CSc

Tagjai

Jenes Barnabás, CSc

Palkovics László, DSc

Szegedi Ernő, DSc

Opponensek

Janda Tibor, CSc

Kiss Erzsébet, CSc

Titkár

Kocsisné Molnár Gitta, PhD

„A gyümölcsfák életének legérdekesebb részei azok a jelenségek, amelyek ivaros szaporodásával vannak egybekapcsolva. Nagyon sok gyönyörűséget nyújt e jelenségek megfigyelése és tanulmányozása azoknak, akik szakszerűen és lelkiismeretesen foglalkoznak vele. Viszont nagy tévedés lenne azt hinni, hogy a virágbiológiai jelenségek ismerete csak tudományos értékű, mert ellenkezőleg, éppen ezek az ismeretek nyújtják nekünk a legértékesebb útmutatásokat a gyakorlati termesztésben.”

(Mohácsy Máttyás, 1954)



Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	6
2. Célkitűzés	8
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. Inkompatibilitás a növényvilágban	9
3.2. A <i>Prunus</i> fajok önmeddőségét meghatározó molekuláris rendszer	10
3.2.1. <i>S</i> -ribonukleáz enzim: a termékenyülést irányító rendszer bibekomponense	12
3.2.2. F-box fehérje: a termékenyülést irányító rendszer pollenkomponense	16
3.2.3. Az <i>S</i> -RN-áz alapú inkompatibilitási rendszer működésének molekuláris modellje	18
3.2.4. A gyümölcsfák öntermékenyülési képességének molekuláris háttere	20
3.3. Az <i>S</i> -lókus az evolúció és kultúrevolúció tükrében	22
3.4. Az <i>S</i> -genotípus vizsgálati módszereinek áttekintése	24
3.4.1. Szabadföldi termékenyülésvizsgálatok	24
3.4.2. A pollentömlő növekedésének vizsgálata	25
3.4.3. Fehérje-szintű analízis: izoelektromos fókuszálás	26
3.4.4. DNS-alapú vizsgálatok	28
3.5. A gyümölcsfák <i>S</i> -allél-rendszere	32
3.5.1. Mandula	32
3.5.2. Cseresznye	33
3.5.3. Alma	33
3.5.4. Körte	34
3.5.5. Meggy	34
3.5.6. Szilva	35
3.5.7. Ószibarack	36
3.5.8. Japánkajszi	36
3.5.9. Európai kajszi	37
3.5.9.1. Kajszifajták csoportosítása, termékenyülése	37
3.5.9.2. Az inkompatibilitás öröklődése	38

3.5.9.3. Gyümölcskötődés és pollentömlő-analízis: a kezdeti vizsgálatok	39
3.5.9.4. Fehérje- és DNS-alapú technikák: nagy hatékonyságú molekuláris vizsgálatok	40
3.5.9.5. A kajszi <i>S</i> -lókuszának szerkezete	41
4. Anyag és módszer	44
4.1. Növényanyag	44
4.2. Szabadföldi tesztkereszteзések	44
4.2.1. Öntermékenyülés-vizsgálat	44
4.2.2. Kompatibilitási vizsgálat	48
4.3. Pollentömlő növekedésének vizsgálata	48
4.4. Az <i>S</i> -ribonukleáz izoenzimek vizsgálata	49
4.4.1. <i>S</i> -ribonukleáz-aktivitás vizsgálata agaróz diffúziós plate-en	49
4.4.2. A ribonukleáz-aktivitás spektrofotometriás meghatározása	49
4.4.3. Minta-előkészítés az izoelektromos fókuszáláshoz	50
4.4.4. Izelektromos fókuszálás (IEF) és nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE)	50
4.4.5. <i>S</i> -ribonukleáz izoenzimek kimutatása specifikus festéssel	50
4.5. DNS-alapú vizsgálatok	51
4.5.1. DNS-kivonás	51
4.5.2. <i>S</i> -PCR-analízis	51
4.5.2.1. Az <i>S</i> -RN-áz gén PCR-vizsgálata	51
4.5.2.2. Az F-box gén PCR-vizsgálata	51
4.5.3. RT-PCR	52
4.5.4. A PCR-termékek fragmentumhossz-analízise, klónoзása, szekvenálása és a szekvenciák vizsgálata	53
4.6. Statisztikai analízis	54
5. Eredmények	55
5.1. <i>S</i> -genotípus meghatározása ribonukleáz izoenzimek kimutatásával	55
5.2. <i>S</i> -RN-áz gén alapú, DNS-szintű genotípus-meghatározás	59
5.3. Az öntermékenyülés molekuláris háttere	67
5.3.1. Az <i>S</i> _C - és <i>S</i> ₈ -RN-áz allélok molekuláris analízise	67
5.3.2. Az SFB _C - és SFB ₈ -allélok molekuláris analízise	71
5.4. F-box gén alapú <i>S</i> -genotípus-meghatározás	76

5.5. Az <i>S</i> -allélok szerkezete és filogenetikai vizsgálata	79
6. Eredmények megvitatása	82
6.1. <i>S</i> -genotípus meghatározása izoelektromos fókuszálással	82
6.2. <i>S</i> -RN-áz gén alapú, DNS-szintű genotípus-meghatározás	85
6.3. Az öntermékenyülés molekuláris háttere	91
6.4. Az F-box gén alapú <i>S</i> -genotípus-meghatározás	96
6.5. Az <i>S</i> -RN-áz allélok szerkezete és filogenetikai vizsgálata	98
6.5.1. Az <i>S</i> -RN-áz allélok szerkezete	98
6.5.2. Az <i>S</i> -allélok filogenetikai vizsgálata	99
6.5.3. Az <i>S</i> -genotípusok és a kajszii kultúrevolúciója	101
6.6. Új tudományos eredmények	106
7. Összefoglalás	108
8. Summary	110
9. Melléklet	112
M1. Irodalomjegyzék	112
M2. Az NCBI nemzetközi adatbázisba benyújtott szekvenciák	128
Köszönetnyilvánítás	156

Rövidítések jegyzéke

bp	bázispár
C1–3 és C5	Az <i>S</i> -RN-áz gén 1–3. és 5. konzervatív régiója
cDNS	komplementer DNS
D	dalton, relatív molekulatömeg
DEPC	dietilpirokarbamát
DNS	dezoxiribonukleinsav
GSI	gametofitikus inkompatibilitás (gametophytic self-incompatibility)
HVa, HVb	A <i>Solanaceae</i> <i>S</i> -RN-ázokra és valamennyi SFB-re jellemző variábilis régiók
IEF	izoelektromos fókuszálás
kbp	kilobázispár
NEpHGE	nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (non-equilibrium pH gradient electrofocusing)
ÖM	önmeddő
ÖT	öntermékenyülő
PCR	polimeráz láncreakció
pI	izoelektromos pont
RC4	A <i>Rosaceae</i> <i>S</i> -RN-ázokra jellemző 4. konzervatív régió
RHV	A <i>Rosaceae</i> <i>S</i> -RN-ázokra jellemző hipervariábilis régió
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
SFB	<i>S</i> -haplotípus-specifikus F-box protein
SLF	<i>S</i> -lókusz F-box protein
SNP	pontmutáció
SP	szignálpeptid
<i>S</i> -RN-áz	<i>S</i> -ribonukleáz
SSR	mikroszatellit régió

1. BEVEZETÉS

A növényvilágban az idegenmegporzás (allogámia) által kialakult genetikai variabilitás szelekciós előnyt biztosít a növények számára. A zárvatermő növények nagy részénél a kétivarú virágokban különféle mechanizmusok alakultak ki az önmegporzás (autogámia) megakadályozására. Ide tartozik a bibe és a porzók térbeni elkülönülése, a szaporítószervek érésének időbeli eltolódása, illetve a leghatékonyabb megoldás, a pollen csírázásának vagy a pollentömlő fejlődésének gátlása, az ún. inkompatibilitás. A jelenséget első ízben, 1877-ben leíró Darwin a virágos növények törzsfejlődésében központi jelentőséget tulajdonított e mechanizmusnak. Az autoinkompatibilitás tehát azt jelenti, hogy a bibe adott növényegyed saját pollenjével történő megporzása nem vezet megtermékenyítéshez. Az összeférhetetlenség genetikailag meghatározott mechanizmusokon alapul.

A növények számára evolúciós léptékekben hasznos idegentermékenyülés a sajátos gazdasági célokkal rendelkező szakemberek szempontjából kétélű fegyvernek tekinthető. A természetben nem kívánatos, gazdasági szempontból hátrányos fiziológiai jelenségként tartják számon, hiszen az önmeddő fajtákból létesített ültetvényekben elengedhetetlen a megfelelő pollenadó fák telepítése. E probléma jelentősége jól látható a cseresznye példáján, ahol az öntermékenyülő fajták előállítására mára az egyik legfontosabb nemesítési követelménnyé vált. A növénynemesítők számára ugyanakkor az önmeddőség jelentős segítséget nyújthat a tervszerűen megalapozott keresztezések kivitelezéséhez, mert a virágok kasztrálása nem szükséges. Sajnos azokban az esetekben, ahol az önmeddőség az *S*-allél-rendszeren alapszik, az önmeddő anyanövény használata azt is jelenti, hogy az utódok között önmeddő genotípusok jelenhetnek meg. Ráadásul az azonos *S*-allélokot hordozó önmeddő fajták egymást kölcsönösen sem képesek megtermékenyíteni, így közös ültetvénybe telepítve nem adnak elfogadható termésmennyiséget.

Az inkompatibilitás biokémiai és molekuláris háttere növény családonként igen eltérő. Az egyik leginkább tanulmányozott mechanizmus a ribonukleáz enzimek részvételével kialakult gametofitikus önmeddőség. Ilyen típusú rendszer jellemzi a *Rosaceae* családot, mely számos gyümölcsstermő növényt (alma, körte, cseresznye, kajszli, mandula, szilva stb.) foglal magába. Mivel a csonthéjas fajok körében parthenokarp gyümölcskötődés nem fordul elő, a sikeres megtermékenyülés elengedhetetlen feltétele a gazdasági értéket képviselő gyümölcs létrejöttének.

Az európai kajszlifajták túlnyomó része öntermékenyülő, míg az ázsiai és észak-amerikai fajták többsége önmeddő. Az utóbbi évek során a fagyűrűs és a vírusrezisztencia

elérése érdekében az ázsiai és észak-amerikai genotípusokat felhasználó keresztezéses nemesítés útján egyre több, széles körben elterjedt, önmeddő fajtát hoztak létre. A fajtatársítás szempontjából az *S*-genotípusok ismerete elengedhetetlenné vált. A fajták termékenyülését meghatározó szabadföldi terméskötődési vizsgálatokat számos bizonytalanság terheli, hiszen ezeket a környezeti, időjárási körülmények jelentősen befolyásolhatják, továbbá ezen vizsgálatokra csak a termőkorú fák alkalmasak. A DNS-alapú vizsgálatok, amelyekkel a sterilitást okozó allélok a genomban detektálhatóak, igen nagymértékben segíthetik és gyorsíthatják a nemesítők munkáját azáltal, hogy alkalmazásukkal a növények korai egyedfejlődési állapotában meghatározhatók azok termékenyülési viszonyai. Az öntermékenyülést kimutató markerek által a kívánt tulajdonságot hordozó magoncok kiválogathatók.

Azon túlmenően, hogy a fajták *S*-genotípusának ismerete a kertészeti gyakorlatban az optimális fajtatársításhoz közvetlenül felhasználható információt szolgáltat, a termékenyülést irányító molekuláris rendszer működésének feltárása alapkutatói szempontból is igen jelentős. A múlt században a 80-as évek végén áttörő felfedezések születtek az önmeddőség molekuláris hátterének megismerése terén. Az almatermésűekkel kapcsolatos molekuláris vizsgálatok első eredményei a következő évtized elején jelentek meg, míg a csonthéjasok esetében ugyanerre a 90-es évek második feléig kellett várni. A nemzetközi tudományos érdeklődést jól mutatja, hogy az utóbbi időszakban egyre több, évente mintegy félszáz közlemény jelenik meg e témakörben a kertészettudomány és növénybiológia legnívósabb, nemzetközi folyóirataiban. A gyümölcsfák ez irányú vizsgálatában angliai (cseresznye, meggy, szilva), spanyol (kajszi, cseresznye, mandula), amerikai–japán (mandula, cseresznye, meggy, japánszilva, japánkajszi) és belga (alma) kutatócsoportok járnak élen, de a portugál, izraeli, kínai, ausztrál és kanadai kutatók is jelentős eredményekkel gazdagították ismereteinket.

Ehhez a körhöz csatlakozott 2003-ban az egyetemünkön alakult kis kutatócsoport több gyümölcsfaj több aspektusból történő vizsgálata céljával. Magyarországon ezt megelőzően nem folyt ilyen irányú kutatás, magyar fajtákat ugyanakkor angol és amerikai laboratóriumokban is vizsgáltak. Mivel a Kárpát-medence valamennyi *Rosaceae* családba tartozó gyümölcsfa kultúrevolúciójában fontos összekötő láncszemet képez a géncentrum és a tőlünk nyugatabbra fekvő termőterületek között, különösen fontosnak tartottuk és tartjuk a birtokunkban lévő génvagyon minél alaposabb megismerését, jellemzését. A dolgozatomban bemutatott, kajszi önmeddőségét irányító *S*-lókusz vizsgálata ezen munkánk első lépéseiről ad számot.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A más *Prunus* fajok termékenyülési viszonyainak jellemzésére használatos molekuláris technikák (NEpHGE, IEF, PCR) használhatóságának értékelése kajszai esetében, a módszerek továbbfejlesztése.
2. A fajták termékenyülési viszonyait irányító *S*-lókusz minél több allélváltozatának azonosítása, jellemzése különböző származású fajták vizsgálatával.
3. Meghatározni minél több gazdaságilag jelentős fajta és értékes nemesítési alapanyag *S*-genotípusát, különös tekintettel a magyar kajszifajtákra. Tisztázni a vitatott termékenyülési fenotípusú fajták *S*-allél-összetételét.
4. Az eddig leírt és újonnan megállapított *S*-genotípusok alapján elkészíteni a kajszifajták kölcsönös termékenyülési viszonyait bemutató táblázatot, mely közvetlenül alkalmazható az ültetvénytársítás és/vagy keresztezéses nemesítés szülővonalainak genetikai információs adatbázisaként.
5. Kideríteni a kajszai öntermékenyülő fenotípusának háttérben álló molekuláris okokat, azonosítani az öntermékenyülésért felelős haplotípus eredeti, funkcióképes változatát.
6. A nemesítési gyakorlat számára könnyen és gyorsan alkalmazható, ugyanakkor megbízható rutineljárást kidolgozni az öntermékenyülő hibridek korai szelekciójára.
7. Fölmérni, mennyiben segítheti a kajszai *S*-lókuszáról gyűjtött molekuláris információ a gyümölcsfaj kultúrevolúciós történetének ismeretét.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Inkompatibilitás a növényvilágban

A hímnős virágú növények esetében kialakult inkompatibilitási rendszerek alapvetően két csoportra oszthatók: heteromorfikus és homomorfikus típusúak. A heteromorfikus inkompatibilitás során az ivarszervek morfológiailag elkülönültek, tehát az öntermékenyülésnek fizikai akadályja van. A homomorfikus fajok esetében a reproduktív szervek egymás közelében helyezkednek el, az önmegporzást semmiféle morfológiai korlát nem gátolja, de az öntermékenyülés mégsem lehetséges, mert azt genetikailag meghatározott mechanizmusok akadályozzák. A tulajdonságot általában egy lókuszt kódolja, amit a sterilitás szóról *S*-lókusznak neveztek el. Más növény családkban, például a fűféléknél kettő, a *Beta* fajoknál pedig négy lókuszt részvételét igazolták (Lundqvist, 1956; Larsen, 1977). Ez a széles körben elterjedt genetikai inkompatibilitás további két nagy csoportot foglal magába: a sporofitikus és a gametofitikus önmeddőséget (Clarke és Newbigin, 1993).

A zárvatermő növények 383 családja közül 81 családban írtak le homomorfikus inkompatibilitást mutató fajokat (Clarke és Newbigin, 1993). Közülük 15 családban bizonyítottan gametofitikus önmeddőség fordul elő, 6 családban sporofitikus. További 39 családban igazolták az inkompatibilitást, de annak típusa ismeretlen, míg a fennmaradó 21 családban az inkompatibilitás megléte sem kellően tisztázott (Charlesworth, 1985). A genetikai inkompatibilitás feltehetően a zárvatermők egy nagyon korai ősnél jelent meg először, így jelentős mértékű elterjedését is ez eredményezhette.

A gametofitikus inkompatibilitást (GSI) szabályozó mechanizmus többféle is lehet, mindezidáig közülük csak néhányat vizsgáltak molekuláris szinten. A *Papaveraceae* családban a bibekomponens egy kb. 15 kD molekulatömegű, extracelluláris fehérje; a pollenkomponens még nem ismert, de feltételezések szerint egy, a pollen plazmamembránban lokalizált receptorfehérje (Franklin-Tong és Franklin, 2003). E receptor és a bibe *S*-protein közötti allélspecifikus kapcsolat eredményeként az inkompatibilis pollentömlőben a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció hirtelen megnövekszik, ami számos, egymással is összefüggő jelátviteli folyamatot indukál. A magas intracelluláris Ca^{2+} -szint hatására aktin depolimerizáció következik be, ami azonnali növekedésgátláshoz vezet: a citoszkeleton degradációjával ugyanis lehetetlenné válik a vezikulumok apikális irányú szállítása. Gátlódik a pollenben található p26 citoplazmatikus pirofoszfataz aktivitása, melynek következtében csökken a csúcsnövekedéshez elengedhetetlen fehérjék és hosszúszézláncú szénhidrátok mennyisége. A növekedésgátlást

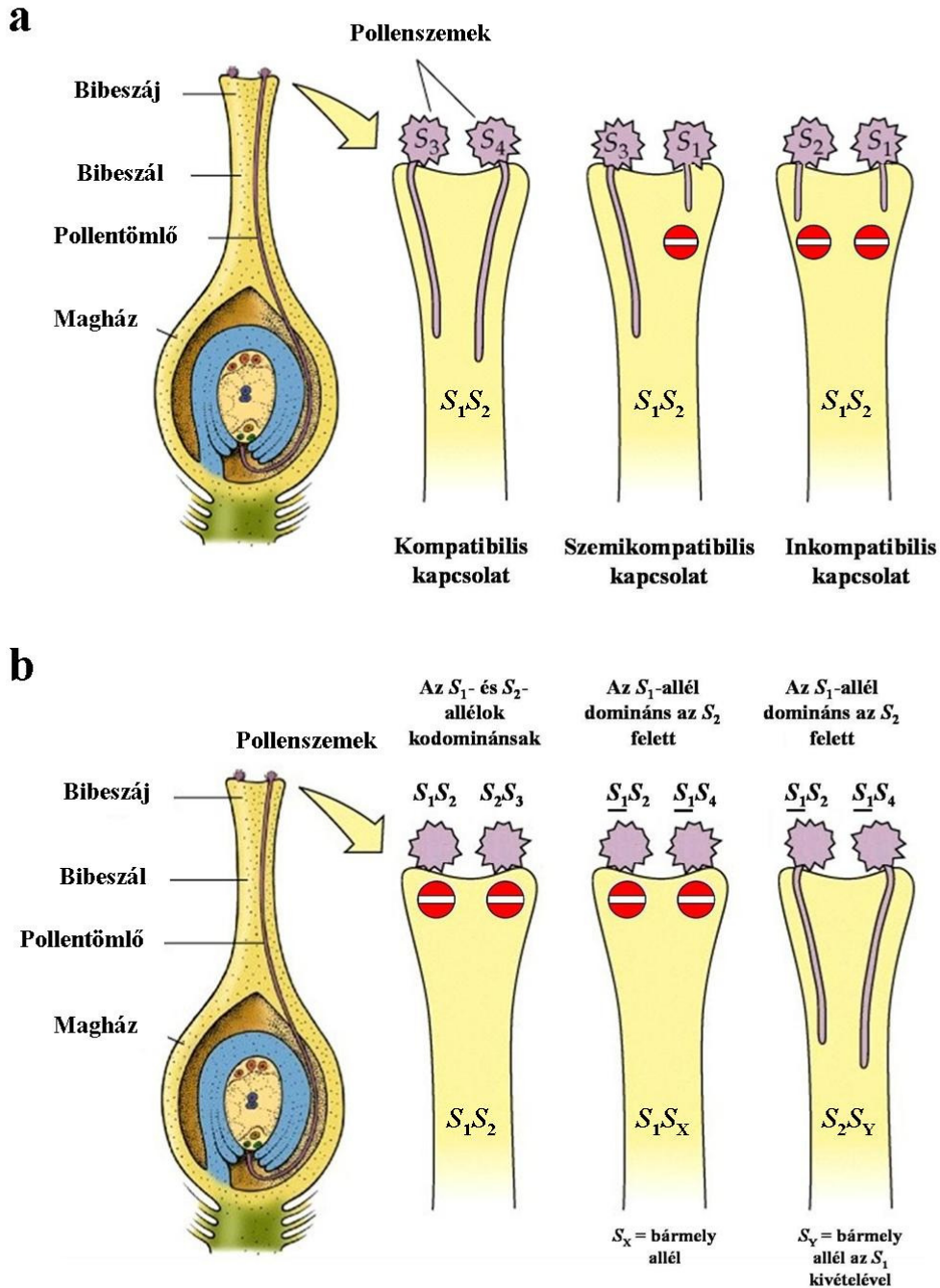
követően néhány perccel aktiválódik egy 56 kD méretű MAP-kináz (mitogen-activated protein kinase), amiről igazolták, hogy szerepe van a programozott sejthalál (apoptózis) kialakulásában. Kimutatták, hogy inkompatibilis pollentömlőkben a bibe *S*-proteinek a dezoxiribonukleinsav (DNS) feldarabolódását okozzák, ami kompatibilis kombináció esetén nem figyelhető meg (Jordan és mts., 1999). Franklin-Tong és kutatócsoportja néhány éve sikeresen igazolták régi hipotézisüket, mely szerint az inkompatibilitási reakció során kialakuló jelátviteli folyamatok végső állomása a programozott sejthalál (Thomas és Franklin-Tong, 2004).

A leginkább tanulmányozott és legrégebb óta ismert GSI rendszer az *S*-ribonukleáz enzimek (*S*-RN-ázok) részvételén alapul, és négy növény családban fordul elő: a *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Campanulaceae* és a *Prunus* fajokat is magába foglaló *Rosaceae* családokban (de Nettancourt, 2001; Franklin-Tong és Franklin, 2003). E négy növény család közös őstől származik az összes kétszikű növény család 75 %-a, ami arra utal, hogy az RN-áz alapú önmeddőség jelenlegi ismereteinknél vélhetőleg sokkal elterjedtebb a növényvilágban (Igic és Kohn, 2001).

3.2. A *Prunus* fajok önmeddőségét meghatározó molekuláris rendszer

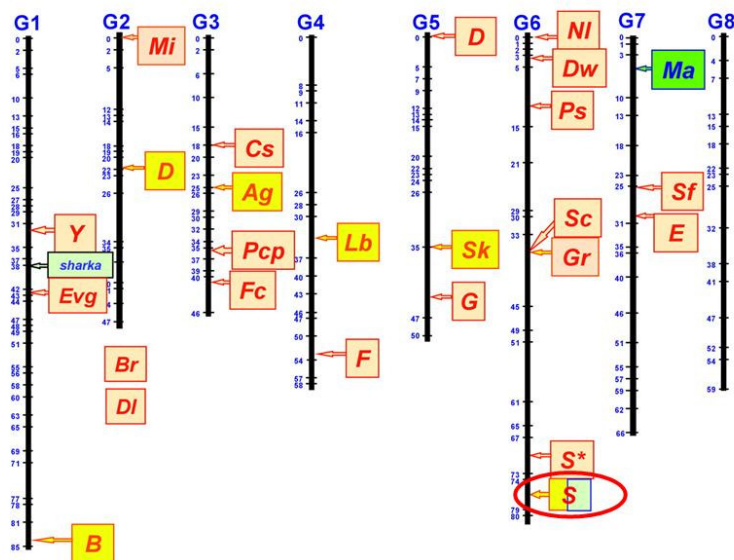
A *Prunoideae* alcsaládba tartozó valamennyi csonthéjas gyümölcsfaj önmeddősége gametofita típusú, a termékenyülési viszonyokat egy multiallélikus lókus, az *S*-lókus szabályozza (de Nettancourt, 2001).

A GSI során a pollen fenotípusát saját haploid genotípusa határozza meg (1a. ábra), ellenben a sporofitikus önmeddőséggel, ahol a pollen fenotípusát a pollent adó növény genotípusa határozza meg, mint például a mogyoró esetében (1b. ábra). A gametofitikus inkompatibilitási kapcsolat akkor alakul ki, ha a haploid pollenszem *S*-allélja megegyezik a bibe két *S*-alléljának bármelyikével. Az ugyanarról vagy azonos *S*-genotípusú növényről származó pollenszemek a bibe felületén kicsíráznak, de pollentömlő-növekedésük a bibeszál felső harmadában megtorpan, így az embriózsákot nem érik el, nem okoznak termékenyülést. Az *S*-lókus a bibében kifejeződő ribonukleáz enzimet kódolja (*S*-RN-áz) (McClure és mts., 1989), illetve a pollentömlőben expresszáldó, négy éve azonosított *S*-haplotípus-specifikus F-box (SFB) fehérjét (Lai és mts., 2002; Entani és mts., 2003; Ushijima és mts., 2003). A saját-idegen felismerési reakció tehát e két molekula részvételével, az *S*-RN-áz és az F-box fehérjék között zajlik le (McCubbin és Kao, 2000).



1. ábra. A magasabbrendű növények gametofita típusú (a) önmeddőségének genetikai szabályozása. A pollenszem fenotípusát saját haploid genomja határozza meg. Amennyiben a pollenben kifejeződő S -allél azonos a diploid bibében kifejeződő bármely S -alléllal, a pollentömlő növekedése a bibeszál felső harmadában leáll. A sporofita önmeddőségnél (b) a pollen fenotípusát a pollent adó növény genotípusa határozza meg. Az S -allélok dominanciaviszonyai különbözőképpen alakulhatnak: ha a két allél kodomináns, a megtermékenyítés elmarad, amennyiben a pollenszem két S -allélja közül bármelyik vagy mindkettő megegyezik a bibeszálban kifejeződő S -allélokkal. Ha a pollenadó növény S -alléljainak egyike a másik alléllal szemben domináns, a megtermékenyítés csak akkor lesz sikertelen, ha a domináns allél a megporzandó növény bibeszövetében is jelen van. A pollenszemek csírázása a bibe felületén gátlódik. Thompson és Kirch (1992) alapján módosítva.

A diploid *Prunus* fajok ($2n=16$) genetikai térképezése során eddig 28, a természetes érték szempontjából jelentősnek tartott gén pozícióját határozták meg őszibarack [*Prunus persica* (L.) Batsch], kajszli (*P. armeniaca* L.), mandula [*P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] és cseresznyeszilva (*P. cerasifera* Ehrh.) utódpopulációk vizsgálatával (Dirlewanger és mts., 2004). Az *S*-lókusz a mandula és a kajszli esetében is a 6. kapcsoltsági csoportba térképezték (2. ábra).



2. ábra. A *Prunus* fajok genetikai térképe a jelenleg ismert 27 jelentősebb gén pozíciójával, köztük a 6. csoportban található *S*-lókusszal (*S*). Az egyes színek a különböző vizsgált növényfajokat jelzik (narancssárga: őszibarack, sárga: mandula és mandula × őszibarack hibrid, kék: kajszli, zöld: cseresznyeszilva). Az egyéb vizsgált tulajdonságokat kódoló gének jelölése: *Ag* porzók színe; *B* szíromlevél színe; *Br* bokros növekedési típus; *Cs* a mag körüli hússzín; *D* őszibarack savtartalom és mandula héjkeményesség; *DI* teltvirágúság; *Dw* törpenövés; *E* levélmirigy alakja; *Evg* folytonnövő habitus; *F* maghozkötöttség; *Fc* virágszín; *G* a gyümölcshéj szőrözöttsége; *Gr* levélszín; *Lb* virágzási idő; *Mi* és *Ma* nematóderezisztencia; *Nl* levélalak; *Pcp* több termőlevelűség; *Ps* hímsterilitás; *S** gyümölcshalak; *Sc* gyümölcshéj színe; *Sf* lisztharman-rezisztencia; *sharka* plum pox vírusrezisztencia; *Sk* keserű mag; *Y* gyümölcshús színe, (Dirlewanger és mts., 2004)

3.2.1. *S*-ribonukleáz enzim: a termékenyülést irányító rendszer bibekomponense

Az RNS-molekulát hasító ribonukleáz enzimek számos élettani folyamatban szerepet játszanak, például a mag fejlődésében, különböző stresszfolyamatokban, növekedésszabályozásban, kórokozók elleni védekezésben vagy az öregedésben (Wyen és mts., 1972; Wilson, 1975). Schrauwen és Linskens (1972) vizsgálták első ízben a bibeszál

ribonukleáz aktivitását, eredményeik szerint a különböző növényfajok bibeszövetében igen eltérő RN-áz aktivitás volt mérhető. A termékenyülési folyamatok háttérében álló molekuláris mechanizmusok tisztázása terén a Melbourne-i Egyetem Adrienne E. Clark által vezetett kutatócsoportja igen jelentős aktivitást fejtett ki az 1980-as évek kezdetétől. Cseresznyebibeszálból izoláltak egy 37–39 kD tömegű, 10,6 izoelektromos pontú, „Antigen S”-nek elnevezett glikoproteint (Mau és mts., 1982), melyről igazolták, hogy *in vitro* körülmények között akadályozza a saját pollentömlő növekedését (Williams és mts., 1982). Kísérleteiket *Nicotiana alata* növényen folytatták, meghatározták az S_2 - (Anderson és mts., 1986), S_3 - és S_6 -allélok (Anderson és mts., 1989) bibében kifejeződő fehérjetermékének cDNS szekvenciáját. Ezek az allélok jelentős mértékű homológiát mutattak egymással és a *Lycopersicon peruvianum* S-glikoproteinjeivel. Anderson és mts. (1989) az immunglobulinoknál használt terminológia átvételével a gén változékony szakaszait „hipervariábilis” régióként nevezték el.

A kutatócsoport következő, jelentős felfedezése volt, hogy a *Nicotiana alata* bibéjében termelődő, az önmeddőség kialakításában résztvevő fehérjék ribonukleáz enzimaktivitással rendelkeznek (McClure és mts., 1989). Egy évvel később kimutatták, hogy e ribonukleáz (S-RN-áz) enzimek bejuthatnak a fejlődő pollentömlőbe, ahol a fehérjeszintézis folyamatában alapvető fontosságú riboszómális RNS (rRNS) molekulákat hasítják (McClure és mts., 1990). ^{32}P izotóp jelenlétében nevelt növények pollenjét izotópmentes körülmények közt nevelt növények bibéjére juttatva, az izotóppal megjelölt RNS sorsa követhető volt. Az inkompatibilis és kompatibilis pollentömlőket tartalmazó bibékből az RNS-molekulákat kivonták, melyek közül a [^{32}P]RNS biztosan a pollentömlőkből származott. Az agaróz gélelektroforézissel, oligo(dT)-cellulóz oszlop és LiCl-oldat használatával végzett frakcionálás igazolta, hogy a kompatibilis kombinációkban az rRNS sértetlen marad, míg az inkompatibilis kombinációkban degradálódik. Ez esetben tehát a pollentömlő nem képes saját fehérjéinek előállítására, vagyis fejlődése, növekedése leáll. Ezek szerint az inkompatibilitás kialakulásához szükséges szelektív toxicitás az rRNS-ek és nem a transzfer vagy hírvivő RNS-ek felé irányul, ahogyan az néhány bakteriális citotoxin esetében is ismert (McClure és mts., 1990). Az RN-áz enzimek inkompatibilitási reakcióban betöltött központi jelentőségét tovább erősítette a Huang és mts. (1994) által elvégzett kísérlet. A ribonukleáz aktivitásért felelős katalitikus hely módosításával nyert, inaktív S_3 -RN-ázt expresszáló transzgénikus, S_1S_2 genotípusú *Petunia inflata* növényben az S_3 -genotípusú pollentömlő növekedése akadálytalan volt.

Szerológiai vizsgálatokkal, Concanavalin-A használatával több tanulmányban

igazolták, hogy a *Rosaceae* családra jellemző *S*-RN-ázok is glikoproteinek (Sassa és mts., 1994; Tao és mts., 1999). Ennek különös jelentőségét az adja, hogy az állati–humán immunrendszer specifikus felismerési reakcióiban meghatározó szerep jut a glikoproteinek cukorrészének (Wassarman, 1990; Ryan és Farmer, 1991), így lehetségesnek tűnt, hogy az önmeddőség is hasonló mechanizmus alapján működik. Karunanandaa és mts. (1994) azonban kimutatták, hogy a deglikozilált S_3 -RN-áz ugyanúgy képes az S_3 -genotípusú pollentömlő növekedésének megakadályozására, vagyis az *S*-haplotípus specificitásáért nem a cukorrész, hanem maga a fehérje felelős. Az állati immunrendszer és a növényi inkompatibilitás közötti további lényeges különbség az, hogy az immunválasz az idegen, míg a növényi inkompatibilitási reakció a saját genotípus elutasítását eredményezi (Nasrallah, 2005).

Az *S*-glikoproteinek extracelluláris enzimek, amelyek szekréciónak egy szignálszekvencia irányítja. Így az *S*-RN-ázok a pollentömlő növekedésének helyszínére, a bibeszál elnyálkásodott, sejtközötti állományába, a bibeszál ún. stigmatoid vagy transzmissziós szövetébe kerülnek (Anderson és mts., 1989).

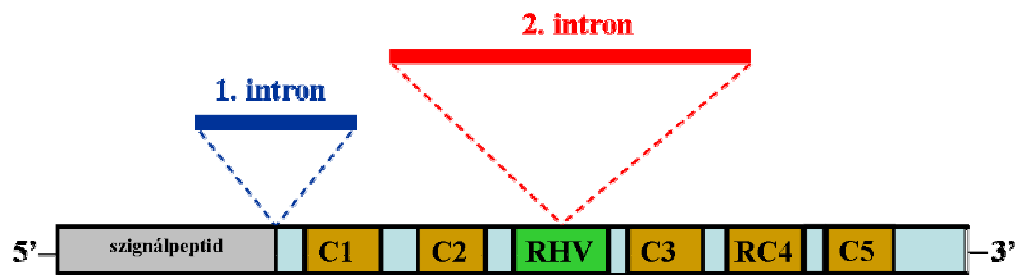
A *Solanaceae* családból származó, 12 különböző DNS-szekvencia összehasonlításával kiderült, hogy az *S*-RN-áz gén öt konzervatív (C1–C5) és két hipervariábilis (HVa, HVb) régiót tartalmaz (Ioerger és mts., 1991; Tsai és mts., 1992). Transzgenikus *Solanum chacoense* növényen bizonyították, hogy a HV régió felelős az allélspecifikus felismerésért (Matton és mts., 1997). A GSI mechanizmus alapjait többnyire genetikai transzformáció segítségével ismerték meg, ezért az első vizsgálatokhoz a *Solanaceae* családba tartozó növényeket használták, melyek genetikai módosítása könnyen kivitelezhető. Ezen ismeretek azonban jó kiindulási alapot adtak a *Rosaceae* családban előforduló *S*-RN-ázok megismeréséhez is.

A *Rosaceae* családba tartozó fajok közül elsőként az alma esetében közöltek *S*-RN-áz szekvenciákat (Broothaerts és mts., 1995). A 'Golden Delicious' S_2 - és S_3 -RN-ázok cDNS-ét klónozták, majd szekvenciájukat meghatározva kiderült, hogy ezek C2 és C3 konzervatív régiói az *Aspergillus oryzae* ún. T_2 -RN-ázában is megtalálhatók (Kawata és mts., 1988). Ez alapján sikerült az *S*-ribonukleázok filogenetikai kapcsolatait (Sassa és mts., 1996), enzimkatalógusbeli besorolását és az enzim által katalizált reakció jellemzőit azonosítani. A termékenyülési folyamatokban meghatározó szerepű *S*-RN-áz enzimeket a gomba T_2 -RN-ázokkal azonos enzimosztálybeli besorolás jellemzi (E.C. 3.1.27.1), vagyis endonukleázok, és az általuk katalizált reakció végeredményeként nukleozid-3'-foszfátok keletkeznek 2',3'-ciklikus foszfát és 3'-foszfooligonukleotid köztitermékekkel.

Ushijima és mts. (1998) három mandula *S*-RN-áz cDNS-szekvenciáját hasonlították

össze más gyümölcsfajok *S*-RN-áz szekvenciáival, és megállapították, hogy a C1, C2, C3 és a C5 régiók homológok a *Solanaceae* családban leírt, azonos jelölésű régiókkal, de a *Solanaceae* fajok *S*-RN-ázainak C4 régiója különbözik a *Rosaceae* család *S*-RN-ázainak megfelelő régiójától, melyet ezért RC4-ként neveztek el. Továbbá a *Rosaceae* családban csak egy hipervariábilis régiót azonosítottak (RHV) a C2 és a C3 szakaszok között, amely a HVa-val mutat homológiát. A C1, RC4 és a C5 régiók több hidrofób aminosavat tartalmaznak (közel 60 %), amelyek az enzim szerkezetének stabilitását adják (Ioerger és mts., 1991; Ushijima és mts., 1998). A C2 és a C3 régiók a gomba T₂-RN-ázokban is megtalálható, igen konzervatív szekvenciamotívumok, melyek az RN-áz fehérje aktív centrumait alkotva részt vesznek az RNS-lánc hidrolízisében (Broothaerts és mts., 1995). A hipervariábilis régió többségben hidrophil aminosavakból áll, ez a szakasz a fehérje helyes térszerkezetének felvételét követően a kialakult globuláris struktúra felszínén helyezkedik el, ami előfeltétele annak, hogy szerepe legyen a bibe–pollen közötti allélspecifikus felismerési reakcióban. Az *S*-allélok specifikus felismeréséért felelős régiók azonosításához ún. „window-analízist” végeztek. Ennek alapján négy olyan régiót találtak, ahol a nem szinoním nukleotidszubsztitúciók száma (d_N) felülmúlta a szinoním nukleotidszubsztitúciók számát (d_S), vagyis ahol a specifikus megkülönböztetésnek, az ún. pozitív szelekció bekövetkezésének a legnagyobb az esélye (Ishimizu és mts., 1998a; Ushijima és mts., 1998). Az RHV régió kivül az RN-áz fehérje más szakaszairól is igazolták, hogy részt vehetnek az allélspecifikus felismerési reakciókban. Az európai körte *S*_i- és *S*_n-RN-ázok RHV régiójának DNS-szekvenciája azonos volt, de az *S*_n-RN-áz nem gátolta az *S*_i-allélt hordozó pollen termékenyítő képességét (Zisovich és mts., 2004b). Ortega és mts. (2006) 23 mandula *S*-RN-áz allél window-analízisével igazolta, hogy az RC4 és C5 régiók közötti szakasznak fontos szerepe lehet a mandula RN-ázok allélspecificitásának kialakításában, ugyanakkor a *Maloideae* *S*-RN-ázokban fontos C3 és RC4 régiók közti szakasznak a mandula allélokban nincs ilyen szerepe.

Az *S*-RN-áz gén két intront tartalmaz, melyek hossza allélspecifikusan változik. Az 1. intron a szignálpeptid és a C1 régió között helyezkedik el, a 2. intron a hipervariábilis régióba ékelődik (3. ábra). A *Prunoideae* alcsalád *S*-RN-áz génszerkezetére általánosan jellemző, hogy a 2. intron mérete majdnem minden esetben (olykor jelentős mértékben) meghaladja az 1. intron méretét.



3. ábra. A *Rosaceae* *S*-RN-áz gén öt konzervatív (C1–3, RC4, C5) és egy hipervariábilis (RHV) régiót, illetve két intront tartalmaz, melyek hossza allélspecifikusan változik Sonneveld és mts. (2003) adatai alapján.

3.2.2. F-box fehérje: a termékenyülést irányító rendszer pollenkomponense

Régóta ismert volt, hogy a termékenyülést szabályozó lókusznak a bibeszálakban kifejeződő termékén túlmenően kell legyen egy, a pollentömlőben kifejeződő fehérjetermék is, hiszen a felismerési reakció e szervek között játszódik le. Ahhoz, hogy a kétkomponensű rendszer működhessen, a pollenkomponenst kódoló gén az RN-áz génhez közel, szorosan kapcsolt módon kell elhelyezkedjen a lókuszbán, mivel a rekombináció lehetetlenné tenné az allélspecifikus felismerést (Kao és Tsukamoto, 2004). Ilyen rekombináns genotípusokat soha nem is írtak le (de Nettancourt, 1997). Továbbá a szekvenciának ugyanolyan változékonynak kell lennie, mint az RN-áz esetében, hiszen minden *S*-RN-áz allélnak kell legyen egy vele azonos genotípusú pollenkomponens allélpárja. Dodds és mts. (1999) kísérletükkel cáfolták az egyik első hipotézist, miszerint a pollenkomponens is RN-áz enzim lenne. *Lycopersicon peruvianum* növényeket transzformáltak pollen-specifikus promoterhez kapcsolt *S*₃-RN-áz szensz és antiszensz konstrukciókkal, és egyetlen transzgénikus növény sem mutatott módosult inkompatibilitási fenotípust, bizonyítva ezzel, hogy az *S*₃-allél pollenkomponense nem lehet az *S*-RN-áz enzim.

A molekuláris technikák fejlődésével lehetővé vált az ún. „kromoszómaséta” (chromosome walking), amely során egy génkönyvtárban az adott szekvenciából kiindulva meghatározzák egy egész régió bázissorrendjét (Weaver és Hedrick, 2000). Így az *S*-RN-áz szekvenciától indulva *Petunia* és *Antirrhinum* növényekben azonosítottak egy *SLF* nevű gént (*S*-lókuszs F-box), melynek F-box fehérjetermék a pollenben fejeződik ki (Lai és mts., 2002). Az F-box fehérjék az ubikvitin-ligáz enzimkomplex részét képezik, melyek a 26S proteaszóma rendszer részvételével működő fehérjelebontó mechanizmusban játszanak szerepet (Hershko és Ciechanover, 1998; Vierstra, 2003). Az izolált F-box fehérje tulajdonságai alapján mindenben megfelelt a pollenkomponenssel szemben

támasztott követelményeknek. Az *S*-lókusz tehát egy multigén komplex, ez alapján a „haplotípus” kifejezés a lókusz valamennyi génváltozatára együttesen értendő, míg az „allél” csak az egyik gén változataira használandó (McCubbin és Kao, 2000).

Elsőként Entani és mts. (2003) írtak le F-box gént a *Scrophulariaceae* családon kívül, a japánkajszai (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) esetében. Szinte ezzel egy időben Ushijima és mts. (2003) is F-box fehérjeszekvenciát azonosítottak mandulában, melyet SFB-nek (*S*-haplotípus-specifikus F-box fehérje) nevezték el. A gén az *S*-RN-ázhoz képest fordított orientációban helyezkedik el, és egy intront tartalmaz. Cseresznye (*Prunus avium* L.) F-box motívumokat vizsgálva Ikeda és mts. (2004a) két variábilis (V1, V2) és két hipervariábilis (HVa, HVb) régiót találtak. Ezek a régiók nagyobb részt hidrofil aminosavakból állnak, így a fehérje felületén helyezkednek el, és valószínűleg az allélspecifikus felismerésért felelősek (4. ábra). Nunes és mts. (2006) 21 kökény SFB szekvenálásával és az adatbázisban elérhető összes *Prunus* SFB szekvencia összevetésével azonosítottak egy újabb variábilis régiót (Vn). A közelmúltban a kökényen kívül japánszilvából (Zhang és mts., 2007) és almából (Cheng és mts., 2006) is izoláltak SFB allélokat.

Kajsziban először 2004-ben azonosítottak *S*-haplotípus-specifikus F-box fehérjét, a gén orientációja megegyezett az *S*-RN-áz gén transzkripció orientációjával (Romero és mts., 2004), szemben a mandula, japánkajszai és cseresznye esetében jellemző ellentétes orientációval (Entani és mts., 2003; Ushijima és mts., 2003; Yamane és mts., 2003b). Vilanova és mts. (2006) egy új típusú, az *S*-lókuszon kívül található F-box gént (ParFB: *Prunus armeniaca* F-box gén) is izoláltak, melynek három változata nagyon kismértékű polimorfizmust mutatott (szekvenciájuk 99 %-ban azonos). Feltételezésük szerint azonban ez a gén nem játszik szerepet az inkompatibilitási reakcióban, ráadásul mindhárom változatban funkcióvesztést okozó mutáció nyomait találták.



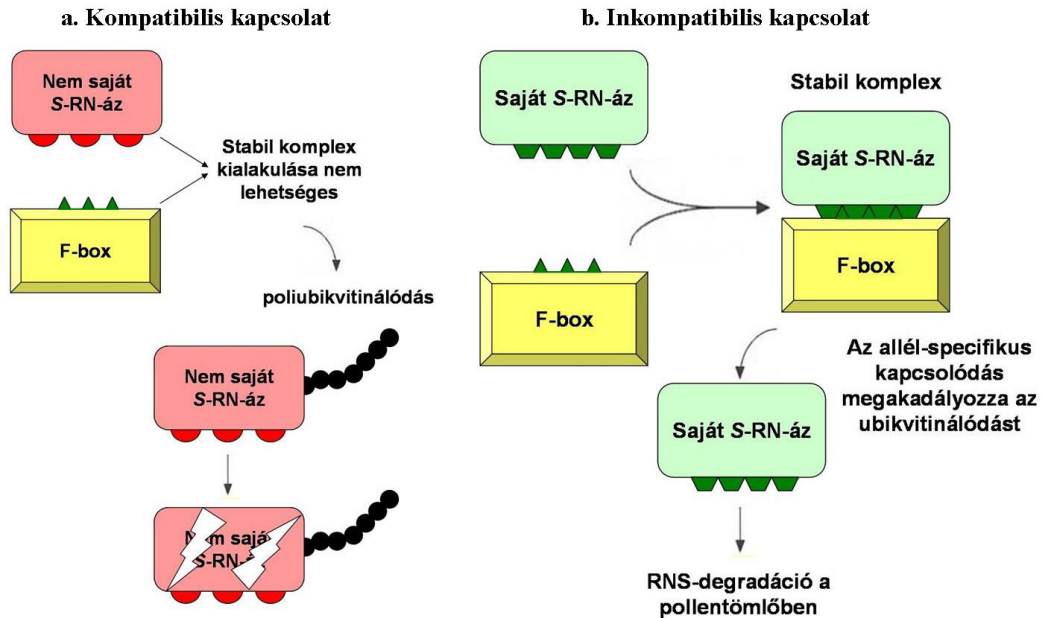
4. ábra. Az F-box gén egy intront, egy F-box motívumot, három variábilis régiót (V1, V2 és Vn) és két hipervariábilis régiót (HVa és HVb) tartalmaz. Ikeda és mts. (2004a) és Nunes és mts. (2006) adatai alapján.

3.2.3. Az *S*-RN-áz alapú inkompatibilitási rendszer működésének molekuláris modellje

Amíg a rendszer pollenkomponensét nem azonosították, többféle feltevés is napvilágot látott az önmeddőség háttérében álló molekuláris folyamatokkal kapcsolatban. Lewis (1960) úgy vélte, hogy e modell háromkomponensű: tartalmaz egy bibében és egy pollenben kifejeződő részt, a harmadik egység pedig az allélspecifikus felismerést kódolja. Thompson és Kirch (1992) szerint az *S*-lókuszban az RN-áz gén mellett megtalálható egy, a pollenben kifejeződő gén, mely membránreceptort vagy az RN-ázt inaktíváló molekulát kódol. Az inkompatibilitási reakció lefolyására ezek alapján kétféle modellt állítottak fel: az ún. receptor („gatekeeper”) és az inhibitor modellt (Thompson és Kirch, 1992; Kao és McCubbin, 1996). Az első szerint a pollen *S*-gén terméke egy transzmembrán receptorfehérje, melyen keresztül csak az azonos allél által kódolt *S*-RN-ázok juthatnak be a pollentömlőbe így akadályozva annak növekedését. Ez a modell azonban a poliploid fajok esetében, például egy diploid heterozigóta pollennél nem lenne működőképes, hiszen ismert volt, hogy ezek a pollenek képesek öntermékenyítésre. Az inhibitor modellben a pollen *S*-gén terméke egy RN-áz-inhibitor fehérje, amely a növekvő pollentömlő citoplazmájában van jelen. E szerint minden *S*-RN-áz bejut a pollentömlőbe és az inhibitor fehérje minden *S*-RN-áz aktivitását gátolja, kivéve a vele megegyező, azonos allél által kódolt enzimekét.

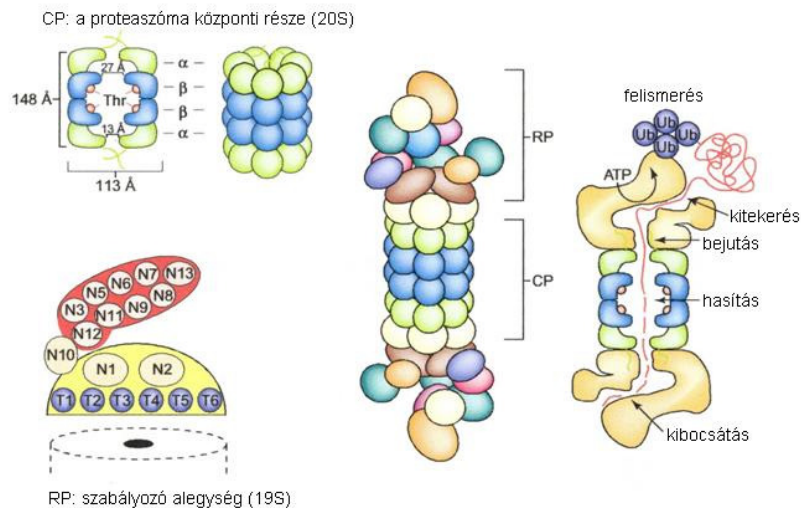
Luu és mts. (2000) kimutatták, hogy a bibe *S*-alléljaival egyező és azoktól eltérő allélt hordozó pollennel végzett megporzást követően egyaránt igen nagymértékű RN-áz-akkumuláció figyelhető meg a pollentömlőkben, ami az inhibitor modell helyességének kísérletes bizonyítékát adta. Az F-box fehérje pollenkomponensként történő azonosítása alátámasztotta az inkompatibilitási reakció saját/idegen felismerési rendszerének inhibitor modelljét. A modell továbbfejlesztésével, az ún. módosított inhibitor modell szerint nem inaktíválás, hanem degradáció történik: a pollen F-box fehérjéje az összes nem saját *S*-RN-áz molekulát lebontja az ubikvitin / 26S proteaszóma rendszer részvételével (Ushijima és mts., 2004). Ezzel ellentétben Sonneveld és mts. (2005) szerint az SFB nem az idegen *S*-RN-ázok degradációjáért felelős, hanem létezik egy általános lebontó mechanizmus, ami a pollentömlőbe belépő valamennyi *S*-RN-ázt lebontja. Ezen általános degradációs folyamat az ubikvitin / 26S proteaszóma rendszer részvételével megy végbe. A pollen F-box fehérjéi azonban az azonos allél által kódolt *S*-RN-áz molekulák stabilitását képesek megőrizni egy allélspecifikus, molekuláris szintű kapcsolatnak köszönhetően. Vagyis mind a kompatibilis (idegentermékenyülés), mind az inkompatibilis (önmeddőség) kapcsolatnál a bibében termelődő *S*-ribonukleázok bejutnak a pollentömlőbe. Az előbbi esetben az RN-áz enzimek

lebomlanak a pollentömlőben, így a pollentömlő rRNS-e nem sérül, fejlődése nem gátlódik, a megtermékenyítés sikeres. Inkompatibilis kapcsolatnál azonban az *S*-RN-ázok és a pollentömlőben lévő, azonos allél által kódolt F-box fehérjék szoros kapcsolódása nem teszi lehetővé az enzimek lebontását, melyek így képesek a pollentömlő rRNS-ét degradálni, annak fejlődését és magát a termékenyülést is megakadályozni (5. ábra).



5. ábra. Az önmeddő *Prunus* fajok termékenyülését irányító *S*-lókuszt által kódolt, bibeszálban expresszálandó ribonukleáz enzim (*S*-RN-áz) és a pollentömlőben kifejeződő F-box fehérje közötti molekuláris felismerési reakció kompatibilis kapcsolat (a) és inkompatibilis (b) kapcsolat esetében.

A sejtmagban és a citoplazmában található 2,5 MD méretű 26S proteaszóma rendszer (6. ábra) egy szabályozó (19S) és egy központi alegységből (20S) áll (Voges és mts., 1999). A szabályozó alegység a poliubikvitinált fehérjék felismerését és kitekerését irányítja, melyek ezután egy keskeny csatornán keresztül jutnak be a központi részbe, ahol lebontásuk megtörténik. A degradálás során több termék is keletkezik: peptidok; rövid, 7-9 aminosavból álló, ubikvitinhez kapcsolt peptidok; illetve poliubikvitin-láncok. Az utóbbi két termék hidrolázok és izopeptidázok segítségével újra felhasználható ubikvitinekké alakul. A 19S komplex szintén tartalmaz izopeptidázokat, melyek a szubsztrát fehérjéhez kapcsolódó ubikvitint távolítják el. A kisebb peptidok később a citoplazmatikus peptidázok hatására tovább bomlanak. A proteaszóma aktív része egy cső alakú struktúrában foglal helyet (Hershko és Ciechanover, 1998).



6. ábra. A 26S proteaszóma rendszer szerkezete: a szabályozó alegység (19S) a szubsztrát fehérjék felismeréséért és kitekeredéséért felelős, a központi rész (20S) a fehérjék degradálását irányítja (Vierstra, 2003).

Amennyiben a pollen SFB szerepe az eltérő allélok által kódolt *S*-RN-ázok degradálása lenne, az SFB hiánya teljes körű inkompatibilitáshoz vezetne. A cseresznye SFB₃-allél deléciója azonban öntermékenyülést idézett elő, ami a Sonneveld és mts. (2005) által feltételezett modell helyességét valószínűsíti. Ezek alapján viszont az SFB F-box doménjének szerepe válik kérdésessé. Az F-box fehérjék az ubiquitin-ligáz enzimkomplex részét képezik, de a *Prunus* SFB-k ubiquitin-ligáz aktivitását mind a mai napig nem sikerült igazolni, így az sem kizárható, hogy az eredetileg feltételezett funkciójuktól jelentősen eltérő szerepük van.

3.2.4. A gyümölcsfák öntermékenyülési képességének molekuláris háttere

Az önmeddő jelleg evolúciós léptékben előnyös az adott növényfaj számára, hiszen az öntermékenyülés hosszú távon a genetikai variabilitás csökkenéséhez, és a sérült allélok populációszintű felhalmozódásához, ún. beltenyésztéshez vezethet. A termesztett fajok esetében azonban a tudatos emberi tevékenység nagymértékben befolyásolta a termékenyülési viszonyokat (Wiersma, 2003).

Jóllehet a *Rosaceae* családba tartozó legtöbb gyümölcsfaj önmeddő, néhány fajta rendelkezik a termesztők által sokra becsült öntermékenyülési képességgel. Ez a tulajdonság lehetővé teszi, hogy pollenadó fajták nélkül is megfelelő termésmennyiséget érjen el a termesztő. A múlt század utolsó évtizedében jelentős előrehaladást értek el a kutatók a gyümölcsfák önmeddőségét irányító genetikai, molekuláris biológiai folyamatok

föltérképezése terén. A vizsgálatokat jelentős mértékben segítette az egyes fajok önmeddő és öntermékenyülő formáinak összehasonlító vizsgálata. Első ízben a japánkörte (*Pyrus serotina* Rehd., szin.: *P. pyrifolia* Nakai) ‘Osa-Nijisseiki’ nevű, öntermékenyülő fajtáját vizsgálták részletesen (Sassa és mts., 1992). A vizsgálatok eredménye szerint az öntermékenyülés az *S*-ribonukleázok csökkent mértékű expressziójának tudható be. A mandula esetében szintén igazolták, hogy az öntermékenyüléshez kapcsolható *S_f*-ribonukleáz aktivitása nem mutatható ki a bibeszálakban (Bošković és mts., 1999).

Az öntermékenyülést azonban nem csak az *S*-RN-áz enzimek funkciószérülése idézheti elő, de a pollenkomponens génként ismert, F-box génszakaszon bekövetkezett mutáció is. Erre jó példa az Egyesült Királyságbeli John Innes Intézetben előállított, JI2420 és JI2434 jelű két cseresznyemagonc. Ezeket a III. inkompatibilitási csoportba (*S₃S₄*) tartozó ‘Emperor Francis’ és ‘Napoleon’ keresztezésével hozták létre úgy, hogy az utóbbi fajta pollenanyasejtjeit előzetesen röntgensugárzással kezelték (Lewis, 1949). Több mint fél évszázad elteltével ma már tudjuk, hogy a JI2434 magonc esetében az öntermékenyülés az *S₃*-haplotípus SFB génszakaszát is magába foglaló deléciónak a következménye (Sonneveld és mts., 2005), míg a JI2420 esetében az *S₄*-haplotípus SFB génszakaszában 4 bázispár kiesésével keletkezett kereteltolódás hatására alakult ki egy korai terminációs szignál. Ennek következtében az F-box fehérje specifikus felismerési reakcióhoz nélkülözhetetlen HVa és HVb hipervariábilis régiói nem transzlálódnak (Ushijima és mts., 2004; Sonneveld és mts., 2005). A fentiekben ismertetett két szelekció felhasználásával állították elő a napjainkban világszerte sokfelé termesztett, öntermékenyülő cseresznyefajták (‘Stella’, ‘Lapins’, ‘Alex’ stb.) sorozatát.

A japánkajszai öntermékenyülő fajtáiban is a pollen SFB gén sérülését mutatták ki, de ezúttal nem bázispárok kiesése volt megfigyelhető, hanem egy idegen DNS-szakasz beékelődése, mely szintúgy megakadályozza a funkcióképes F-box fehérje kialakulását (Ushijima és mts., 2004). További lényeges különbség, hogy a cseresznyével szemben, a japánkajszinál ez a folyamat nem az emberi beavatkozásnak, hanem egy természetes mutációnak volt köszönhető.

Klasszikus és molekuláris genetikai vizsgálatok sokaságával sikerült igazolni, hogy néhány, az *S*-lókuszon kívül elhelyezkedő, úgynevezett modifikáló gén termékének is meghatározó szerepe van a szintén az *S*-ribonukleáz alapú gametofitikus önmeddőséggel rendelkező *Solanaceae* családba tartozó fajok önmeddő fenotípusának kialakításában (Ai és mts., 1991; Kao és Tsukamoto, 2004). A *Rosaceae* család esetében azonban hasonló gének részvétele a termékenyülési folyamatok szabályozásában a mai napig nem ismert,

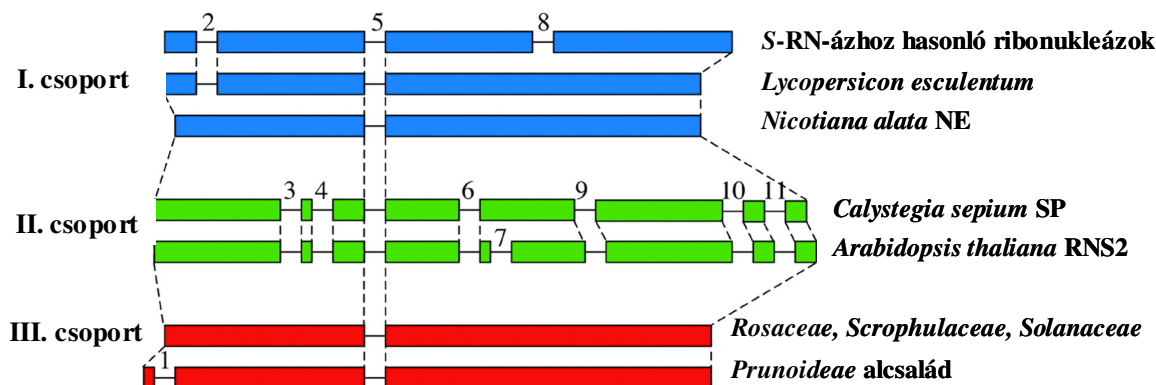
bár több jel utal feltételezhető szerepükre (Zuccherelli és mts., 2002; Wunsch és Hormaza, 2004b; Hegedűs és mts., 2006; Vilanova és mts., 2006).

3.3. Az S-lókuszból az evolúció és kultúrevolúció tükrében

A virágos növények nagy részénél a pollen és a bibe egymás közvetlen közelében fejlődik, öntermékenyülés mégis ritkán következik be, ahogyan arra Darwin már a XIX. század végén felfigyelt: „Nature abhors self-fertilization” (Darwin, 1877), és komoly evolúciós jelentőséget tulajdonított ennek a ténynek. A genetikailag meghatározott inkompatibilitás egymástól függetlenül, legalább 21 alkalommal alakulhatott ki az evolúció során (Steinbachs és Holsinger, 2002). Az egyes családokban előforduló különböző inkompatibilitási rendszerekben az allélok polimorfizmusa igen jelentős mértékű. Uyenoyama (1995) szerint a *Brassicaceae* családban az egyes allélok a rendszer kialakulásakor jöttek létre. Tsai és mts. (1992) szerint a pontmutációk felhalmozódása miatt, és nem a génen belüli (intragénikus) rekombináció hatására jöttek létre a különböző géntípusok. Később azonban néhány *Solanaceae* S-RN-áz allél között igazolták a rekombináció lehetőségét (Vieira és mts., 2003), amit Ortega és mts. (2006) mandula allélok esetében sem tart kizártnak. A kétkomponensű S-lókuszból mindkét gén biztosan azonos evolúciós változásokon ment keresztül (Castric és Vekemans, 2004), ha ugyanis mutáció csak az egyik génben alakul ki, az az inkompatibilitás elvesztését eredményezi (Lewis és Crowe, 1954), mint ahogyan az a japánkajszinál és a cseresznyénél történt (Ushijima és mts., 2004; Sonneveld és mts., 2005). Számos *Solanum*, *Petunia* és *Nicotiana* (Ioerger és mts., 1990), illetve *Malus* és *Pyrus* (Sassa és mts., 1996) S-RN-áz szekvenciák összehasonlításával kiderült, hogy az egyes fajok közötti interspecifikus szekvenciahomológia nagyobb mértékű, mint a fajokon belüli intraspecifikus homológia, ami az ún. transzspecifikus evolúció jelenségét fedi fel (Richman és Kohn, 1996). Ez azt jelenti, hogy az egyes S-allélok kialakulása korábbra tehető, mint az adott fajok szétválása (Sassa és mts., 1996; Ishimizu és mts., 1998b).

Igic és Kohn (2001) széleskörű filogenetikai vizsgálatot végeztek 67 T₂-típusú RN-áz szekvencia bevonásával, továbbá összevetették az RN-ázokban található intronok számát és pozícióját (7. ábra). A szekvenciákból három csoportot képeztek: az I. csoportba a magasabbrendű növényekből izolált, ún. nem S-specifikus RN-ázok (a termékenyülési folyamatokban részt nem vevő, de az S-RN-ázokhoz hasonló ribonukleázok) tartoznak, melyeknek általában 1-3 intronjuk van; a II. csoportba a 7-8 intront tartalmazó ortológ gének tartoznak; míg a III. csoport a *Solanaceae*, *Scrophulariaceae* és *Rosaceae* családokból származó S-RN-ázokat, illetve a *Cucurbitaceae* családból (*Luffa* sp.) izolált

nem *S*-specifikus RN-ázokat foglalja magába. A III. csoport tagjai a T₂-típusú RN-ázokhoz hasonló pozícióban elhelyezkedő, egyetlen intront tartalmaznak, kivéve a *Prunus* fajokat, melyek *S*-RN-áz génjében még egy intron található a szignálpeptid és a C1 régiók között.



7. ábra. A T₂-típusú RN-ázok csoportosítása az intronok száma és pozíciója alapján. A színes téglalapok az exonokat, a vonalak az intronokat ábrázolják, számozásuk 5'-3' irányban történt. A szaggatott vonal a homológ régiókat jelöli, Igic és Kohn (2001) alapján.

A szerzők szerint az RN-áz alapú inkompatibilitással rendelkező *Solanaceae*, *Scrophulariaceae* és *Rosaceae* családok közös őstől származnak. Ez arra utal, hogy az *Asteridae* és *Rosidae* alosztályok közös ősére is az RN-áz alapú GSI volt jellemző. E két alosztály szétválása kb. 110 millió évvel ezelőtt történt meg, vagyis a jelenleg nem ilyen típusú inkompatibilitással rendelkező családok ezen idő alatt veszítették el ezt a képességüket. Steinbachs és Holsinger (2002) további 72 szekvencia összevetésével megerősítették az *S*-RN-ázok közös őstől való eredetét. A *Maloideae* és *Prunoideae* alcsaládok mindegyikében megtalálható az RC4 konzervatív régió, ami azt jelenti, hogy az RC4 a *Rosaceae* család kialakulását követően, de az alcsaládok szétválása előtt alakulhatott ki (Ushijima és mts., 1998).

Ma és Oliveira (2002) 10-20 aminosavnyi deléciókat/inszerciókat azonosítottak mandula és cseresznye *S*-RN-ázok RC4 és C5 régióiban. *Prunus*, illetve *Malus* és *Pyrus* fajok nukleotidszubsztitúciós analízisével megállapították, hogy a *Prunoideae* és *Maloideae* alcsaládok evolúciós léptékben viszonylag későn alakulhattak ki. Cheng és mts. (2006) két alma F-box cDNS szekvenciáját határozták meg (SLF₁ és SLF₂), majd ezekkel és a megfelelő *S*-RN-áz allélokkal filogenetikai elemzést végeztek. Eredményeik szerint az alma F-box és *S*-RN-áz szekvenciák között szorosabb evolúciós kapcsolat mutatható ki a *Scrophulariaceae* és *Solanaceae* családok hasonló alléljaival, mint a *Prunus* fajok alléljaival.

3.4. Az S-genotípus vizsgálati módszereinek áttekintése

3.4.1. Szabadszíves termékenyülésvizsgálatok

Hosszú ideig csak ez a módszer állt rendelkezésre a termékenyülési viszonyok megállapításához. Irányított beporzást követően a gyümölcskötődés mértéke kb. 8 hét elteltével értékelhető. Az öntermékenyülés vizsgálatára két technika ismert: az autogámia során a bimbós állapotú ágakat zacskóval izolálják, majd később megállapítják a kötődés mértékét, de a rovarporozta fák esetében ez kevésbé hatékony a rovarok kizárása miatt, és a kötődés sokkal inkább a virágok morfológiai jellemzőit tükrözi. Az ún. geitonogámia sokkal megbízhatóbb eredményhez vezet, mert a virágokat nyílás előtt kasztrálják, majd az előzőleg begyűjtött saját virágporukkal beporozzák (Nyujtó és mts., 1985; Burgos és mts., 1993; Nyéki és Szabó, 1995). A módszer olcsó, de a környezeti tényezők nagymértékben befolyásolhatják az eredményt, melyet csak 6–8 hét elteltével értékelhetünk.

Az S-genotípusok meghatározása azonban már jóval nehezebb szabadszíves vizsgálatokkal, mert több, különféle kombinációjú, irányított keresztezést kell elvégezni. Két kölcsönösen inkompatibilis fajta összeporzása nem eredményez gyümölcskötődést egyik irányban sem, így a fajták viszonylag könnyen inkompatibilis csoportokba rendezhetők. Két különböző inkompatibilitási csoportba tartozó fajta (például S_1S_2 és S_3S_4) összeporzása mindenképpen gyümölcskötődést eredményez, még akkor is, ha egyik alléljuk közös, tehát szemikompatibilisek (például S_1S_2 és S_2S_3). Ha két teljesen kompatibilis (például S_1S_2 és S_3S_4) fajtát keresztezünk össze, az utódok mindegyike (S_1S_3 , S_1S_4 , S_2S_3 és S_2S_4) kompatibilis kapcsolatot ad mindkét szülőre történő visszakeresztezés alkalmával. Ha azonban a két szülő egy közös alléllal rendelkezik, a létrejött utódpopuláció fele a pollenadó szülőre keresztezve inkompatibilitást mutat (1. táblázat).

1. táblázat. Az S-genotípus meghatározásához használható szabadszíves keresztezések jellemző hasadási aránya szemikompatibilis fajták esetében. K = kompatibilis; IK = inkompatibilis keresztezés

	♂	S_2	S_3
♀			
S_1		–	S_1S_3
S_2		–	S_2S_3

	♂	S_1	S_2
♀			
S_2		S_1S_2	–
S_3		S_1S_3	–

Az utódok szülői formákra történő visszakeresztezése

az anyára	$S_1S_2 \times S_1S_3$	K
az anyára	$S_1S_2 \times S_2S_3$	K
az apára	$S_2S_3 \times S_1S_3$	K
az apára	$S_2S_3 \times S_2S_3$	IK

$S_2S_3 \times S_1S_2$	K
$S_2S_3 \times S_1S_3$	K
$S_1S_2 \times S_1S_2$	IK
$S_1S_2 \times S_1S_3$	K

A módszer megbízhatóan alkalmazható, egyetlen hátránya, hogy a több generáción átívelő vizsgálat közel 10 évig tart a gyümölcsfák hosszú juvenilis életszakasza miatt, továbbá, ha az eredeti körben nem vizsgált, új fajta genotípusára vagyunk kíváncsiak, nagyszámú és gondosan tervezett keresztezés és visszakeresztezés lesz szükséges.

Több faj fajtáinak *S*-genotípusát szabadföldi keresztezések útján állapították meg, legkorábban a klasszikus önmeddő fajoknak számító cseresznyénél (Crane és Lawrence, 1929; Kobel és mts., 1938; Matthews és Dow, 1969), mandulánál (Tufts és Philp, 1922; Kester és mts., 1994) és almánál (Kobel és mts., 1939), később pedig más fajknál, pl. a kajszinál is (Burgos és mts., 1997b).

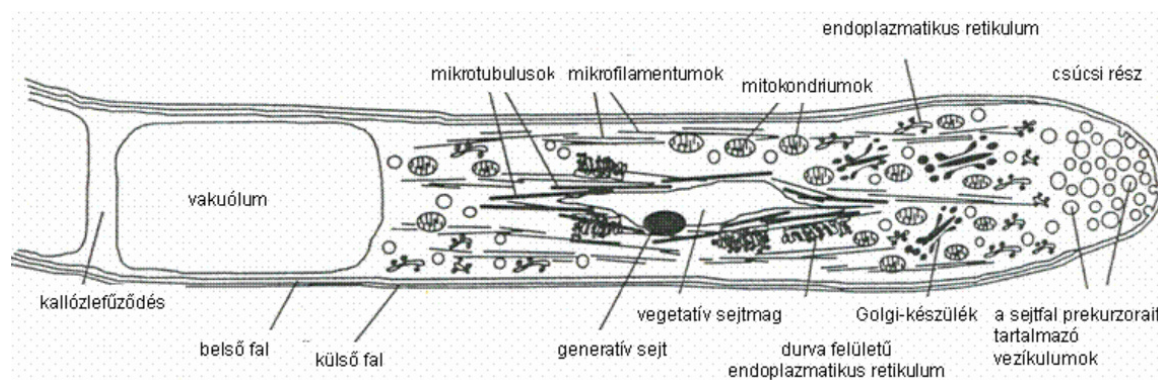
A tesztkereszteзések elvégzése azonban továbbra is nagyon fontos eszköz a molekuláris szinten nyert eredmények ellenőrzésére.

3.4.2. A pollentömlő növekedésének vizsgálata

Ha arra alkalmas pollen jut a bibe felületére, megkezdődik a megtermékenyítés folyamata. A pollenszem a vegetatív sejt magjával a bibeszövetbe hatoló pollentömlőt fejleszt, amely a generatív sejt osztódásából származó két hímivarsejtet szállítja az embriózsákba. A zárvatermőkre jellemző kettős megtermékenyülés során az egyik a petesejttel egyesül, ebből fejlődik az embrió, a másik a központi diploid sejttel összeolvadva alakítja ki az endospermiumot (Franklin-Tong, 2002). A bibeszál stigmatoid szövete tápanyagokat biztosít az intercelluláris, sejtközötti járatokban haladó pollentömlő számára. A tömlőben termelődő pektinázok elnyálkásítják a sejteket, melyek feszségüket elvesztve összeesnek. Ezzel magyarázható, hogy még ha nagyszámú pollentömlő növekszik is a bibeszálban, azok nem okozzák a bibeszál térfogatának megnövekedését. A pollentömlő egyetlen speciális sejt, melynek citoplazmája a sejtorganellumokkal a növekvő csúcsi részre koncentrálódik. A növekvő tömlő kimerült részeit kallóz felhalmozódások fűzik le, amelyek ezután vakuolizálódnak (8. ábra). A kallózlefüződés szabályos szakaszonként fordulnak elő, mintegy „létraszerű” megjelenést kölcsönözve a növekvő pollentömlőnek (Franklin-Tong, 1999). Az inkompatibilis kombináció során a pollentömlőkben jóval nagyobb mértékű kallózfelhalmozódás figyelhető meg (de Nettancourt és mts., 1973; Cresti és Went, 1976).

A kallóz anilinkék festékekkel megfesthető, és UV-fluoreszcens mikroszkóppal megfigyelhető (Currier, 1957; Evans és Hoyne, 1982). A pollentömlő útja a fluoreszkáló kallózlefüződés segítségével nyomon követhető a bibeszálban és az embriózsákban. Az első festési eljárást kidolgozó Martin (1959) technikáját használják ma is kisebb

módosításokkal. A módszer előnye, hogy a termékenyülést laboratóriumi körülmények között, az időjárás hatásától függetlenül vizsgálhatjuk, a fixáló oldatban tárolt bibék bármikor megvizsgálhatók. A módszer hátránya, hogy az anilinkék a szállítószöveteket, illetve az epidermális szőröket is megfesti, ami zavarja a kiértékelést (Martin, 1959). A technikát a termékenyülési viszonyok megállapítására sikeresen alkalmazták mandulánál (Socias i Company és mts., 1976; Ortega és mts., 2002; Ortega és Dicenta, 2004), kajszinál (Burgos és mts., 1993; Andrés és Durán, 1998; Egea és Burgos, 1996; Burgos és mts., 1997b; Viti és mts., 1997), cseresznyénél (Williams és mts., 1982; Békefi és Halász, 2005), meggyénél (Yamane és mts., 2001; 2003a) és körténél (Sanzol és Herrero, 2002).



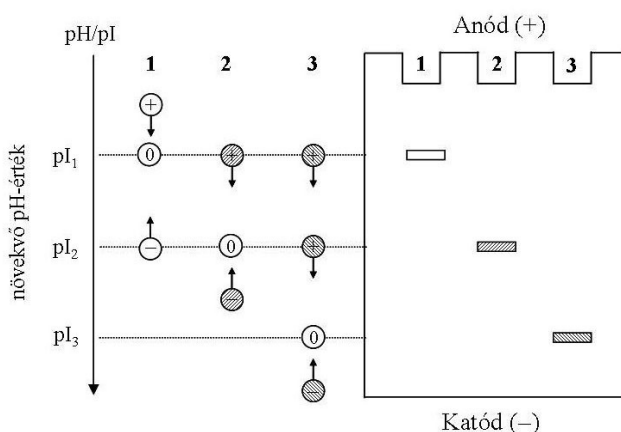
8. ábra. A gyorsan növekvő pollentömlő citoplazmája a sejtorganelumokkal a csúcsi részre koncentrálódik, a kimerült részeket kallózlefüzödések választják el (Franklin-Tong, 1999).

3.4.3. Fehérje-szintű analízis: izoelektromos fókuszálás

Az egyes allélok által kódolt *S*-RN-áz izoenzimek között többnyire nem méretbeli különbség van, hanem az aminosav-szekvenciájuk eltérő, ezért szétválasztásukra a Laemmli (1970) által kidolgozott, méret alapú frakcionálást lehetővé tevő poliakrilamid gélelektroforézis nem használható. Az *S*-RN-ázokat ugyanakkor kisebb-nagyobb aminosav-szekvenciabeli eltérés kell jellemezze, hiszen ezeknek az allélspecifikus felismerési reakcióban fontos szerep jut. Az eltérő aminosav-szekvenciájú fehérjékben a különböző disszociációs tulajdonságú aminosavak aránya más és más lehet, így adott pH-érték mellett más–más töltés jellemzi azokat, ami alapot ad izoelektromos fókuszálással (IEF) történő elkülönítésükre.

A biokémiai analitikában 1967-től ismert izoelektromos fókuszálás a két pólus (katód és anód) között kialakuló pH-gradiens mentén történő, nagy hatékonyságú szétválasztást jelenti (Haglund, 1971). Savas körülmények között az aminocsoportok protonálódnak ($R-NH_2 + H^+ \rightarrow R-NH_3^+$), pozitív töltésűek lesznek, a karboxilcsoportok semlegesek maradnak. Lúgos körülmények között a karboxilcsoportok protont adnak le ($R-COOH +$

$\text{OH}^- \rightarrow \text{R-COO}^- + \text{H}_2\text{O}$), negatív töltésűvé válnak, az aminocsoportok semlegesek maradnak. Az eltérő mennyiségű protonálódó és protont leadó csoportot tartalmazó, különböző fehérjék addig a pontig vándorolnak a gélben, ahol a környező pH azonos az adott komponens izoelektromos pontjával. Izoelektromos pont (pI) az a pH-érték, ahol az amfoter tulajdonságú molekula már nem rendelkezik nettó töltéssel, vagyis az elektromos erőterben mozgékonyágát elveszti (Westermeier, 1993). Mivel az *S*-ribonukleázok izoelektromos pontja a lúgos tartományba esik (Mau és mts., 1982; Sassa és mts., 1992), fókuszálásukat minden esetben az anód felőli oldalról kell kezdeni (9. ábra).



9. ábra. Három eltérő izoelektromos ponttal ($pI_1 < pI_2 < pI_3$) jellemezhető, különböző *S*-RN-áz izoenzim (1, 2 és 3) vertikális lapgélben végzett izoelektromos fókuszálásának vázlatja. Valamennyi enzim a pI értéke fölötti régióban pozitív, az alatt negatív töltésű. A fókuszálás kezdetekor mindegyik pozitív töltéssel rendelkezik, így a pH-gradiens gélben addig mozog, míg eléri az izoelektromos pontjának megfelelő pH-értéket, ahol töltését elveszíti.

Gyümölcsfák *S*-RN-áz vizsgálatára Sassa és mts. (1992) használták első ízben sikerrel e technikát, japánkörtefajták esetében. Később cseresznyénél (Bošković és Tobutt, 1996; 2001; Bošković és mts., 1997a), mandulánál (Tao és mts., 1997; Bošković és mts., 2003), almánál (Bošković és Tobutt, 1999), meggyénél (Tobutt és mts., 2004) is eredményesen alkalmazták, elsősorban az izoelektromos pont meghatározása érdekében, mellyel az allélok fehérjetermékei jól jellemezhetők, elkülöníthetők.

Megfigyelték, hogy adott V_h érték melletti fókuszálás hatására az egyik faj (pl. cseresznye) esetében az izoelektromos fókuszálás sikeresen megtörtént, de egy másik faj (pl. mandula) esetében ugyanolyan feltételek között nem mindegyik izoenzim érte el izoelektromos pontját (Bošković és mts., 1997b), ami tulajdonképpen ún. nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálást (NEpHGE) jelent. E technikát elsőként O'Farrell és mts. (1977)

írták le, és a kétdimenziós elektroforézis első lépéseként alkalmazták. A NEpHGE is a katód irányába történő futtatást jelent, de ebben az esetben a futtatást megszakítjuk, mielőtt a fehérjék elérnék izoelektromos pontjukat. A módszer kidolgozására azért volt szükség, mert a pH-gradiens stabilitása a bázikus pólus végénél hosszabb időn át nem biztosítható, feltehetően a katód oldali elektromigráció miatt, különösen, ha a gélek ureát is tartalmaznak.

O'Farrell és mts. (1977) 1500–2000 Vh-át javasoltak a bázikus izoelektromos pontú fehérjék szétválasztásához, míg az *S*-RN-áz vizsgálatokhoz fajoktól, fajtáktól és alléloktól függően 1350–2450 Vh-t alkalmaztak (Hegedűs és mts., 2007). A nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálást (NEpHGE) a *Prunoideae* alcsaládban több faj esetén is sikeresen alkalmazták, így mandulánál (Bošković és mts., 1997b), cseresznyénél (Bošković és Tobutt, 2001), meggyénél (Tobutt és mts., 2004) és kajszinál (Burgos és mts., 1998; Albuquerque és mts., 2002).

A módszer jelentős előnye, hogy a korábban ismertetett szabadföldi termékenyülés-vizsgálattal (3.4.1.) és pollentömlő-analízissel (3.4.2.) szemben lehetővé teszi az *S*-genotípusok közvetlen meghatározását, ugyanakkor továbbra is virágzó korú fákra van szükség.

3.4.4. DNS-alapú vizsgálatok

Az *S*-allélok első PCR-alapú azonosítása Brace és mts. (1993) nevéhez fűződik, akik a sporofitikus önmeddőséget mutató *Brassica oleracea* vizsgálatára dolgoztak ki módszert. Korábban meghatározott szekvenciák alapján primereket terveztek, az amplifikált fragmentumok allélok szerinti szétválasztásához pedig restrikciós endonukleázokat használtak. A gametofitikus inkompatibilitási rendszerben vizsgált első faj a *Solanum carolinense* volt, melynek bibeszövetéből mRNS-t izoláltak és reverz transzkripcióval *S*-allél szekvenciákat amplifikáltak (Richman és mts., 1995). Az amplifikált termékek hasítása alapján megállapították, hogy a gametofitikus rendszerben minden önmeddő genotípus heterozigóta, homozigótaság csak akkor fordulhat elő, ha az egyik vagy mindkét *S*-allél funkcióját veszítette, illetve ha a magvakat hordozó termés parthenokarp úton jött létre (Verdoodt és mts., 1998).

A *Rosaceae* családban az alma volt az első növény, melynek *S*-alléljait DNS-alapú markerezés útján sikerült azonosítani. Broothaerts és mts. (1995) meghatározták a bibeszövetekből izolált *S*-RN-áz fehérjék N-terminális láncvégi aminosav-szekvenciáját, ami alapján PCR-primereket terveztek. A bibeszálakból izolált mRNS-ből cDNS-t készítettek, és összevetették a genomikus és cDNS szekvenciákat, meghatározva az

almafélékre jellemző egyetlen intron helyzetét (7. ábra), továbbá az S_2 - és S_3 -allélok intronja közti méretkülönbséget.

Mivel az almafélék S -RN-áz génjében elhelyezkedő egyetlen intron allélspecifikus méretbeli polimorfizmusa viszonylag korlátozott, az S -genotípus megbízható meghatározásához allélspecifikus primerek használata vagy a konszenzus primerekkel végzett amplifikációt követő, S -allél-specifikus restriktív enzimekkel végzett emésztés (PCR-RFLP technika) szükséges. Az allélspecifikus primereket alma (Goldway és mts., 1999; Sakurai és mts., 2000; Schneider és mts., 2001; Kitahara és Matsumoto, 2002b; Broothaerts, 2003) és európai körte (Zisovich és mts., 2004a;b) S -genotípusának meghatározására is eredményesen használták. A PCR-RFLP technikát sikerrel alkalmazták japánkörte (Ishimizu és mts., 1999; Kim és mts., 2004; Takasaki és mts., 2004), európai körte (Zuccherelli és mts., 2002; Takasaki és mts., 2006) és alma esetében (Kitahara és Matsumoto, 2002a).

Almafajták S -genotípusának meghatározására olyan molekuláris diagnosztikai eljárást is kidolgoztak, ahol nem konszenzus primerekkel, hanem allélspecifikus primerekkel végeznek amplifikációt, és ezt kombinálják a PCR-fragmentumok restriktív enzimekkel történő hasításával, tovább növelve ezzel az allélok azonosításának megbízhatóságát. E módszerrel számos további alma S -allél volt detektálható (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). Ezzel a megközelítéssel olyan alma S -allélok megkülönböztetése is lehetővé vált, melyek aminosav-szekvenciája 92–93 %-os azonosságot mutat (Kitahara és mts., 2000; Broothaerts, 2003).

A *Maloideae* alcsalád fajaival szemben a *Prunus* nemzetségbe tartozó fajok S -RN-áz alléljai két intront tartalmaznak (7. ábra) (Ushijima és mts., 1998; Iqbal és Kohn, 2001). Az S -RN-áz gén C2 és C3 konzervatív régiói között, a hipervariábilis régióba ékelődő intron (2. intron) jelentős mértékben megkönnyíti a csonthéjas gyümölcsfajok S -genotípusának DNS-alapú azonosítását, miután a 2. intron méretbeli polimorfizmusa messze meghaladja mind az almatermésűek hasonló intronját, mind a csonthéjasok 1. intronját jellemző polimorfizmus mértékét. Így, ha az S -RN-áz gén 2. intronjától upstream és downstream irányban elhelyezkedő konzervatív régiókra primereket tervezünk, agaróz gélen jól értékelhető, allélspecifikus fragmentumokat, S -genotípusra specifikus mintázatot kapunk. Az első konszenzus primerek készítéséhez felhasználták a rendelkezésre álló alma (Sassa és mts., 1996), európai körte (Tomimoto és mts., 1996), japánkörte (Sassa és mts., 1993; 1996), kínai körte (Tomimoto és mts., 1996), mandula (Tao és mts., 1997) és cseresznye (Tao és mts., 1999) aminosav-szekvenciákat. A cseresznye cDNS-szekvenciákból tervezett

Pru-T2, Pru-C2 és PruC4R primereket használták először cseresznye *S*-genotípus PCR-alapú meghatározására (Tao és mts., 1999), majd Wiersma és mts. (2001) és Sonneveld és mts. (2001) újabb konszenzus primereket terveztek. Mandula *S*-genotípusok PCR-analíziséhez Tamura és mts. (2000) terveztek konszenzus primereket, kajszai PCR-vizsgálatához Vilanova és mts. (2005). Több *Prunus* (cseresznye, mandula, japánkajszai, japánszilva és cseresznyeszilva) faj összesen mintegy 27 *S*-RN-áz allél szekvenciája alapján tervezett degenerált, konszenzus primerekkel sikeres amplifikációt értek el a cseresznye, mandula, kajszai S_1 – S_6 allélok és a kajszai S_C -allél esetében (Sutherland és mts., 2004a).

Azokban az esetekben, amikor az intronok mérete között olyan kismértékű eltérés mutatkozik, hogy agaróz gélelektroforézist követően az azonosság–különbözőség megállapítása nem megbízható, a genotípusok meghatározására a hipervariábilis régióba és/vagy az intronrégióhoz kötődő allélspecifikus primerek tervezhetők. Számos allélspecifikus primert tettek közzé almában (Verdoodt és mts., 1998; Van Nerum és mts., 2001; Kitahara és Matsumoto, 2002b); cseresznyében (Sonneveld és mts., 2001; 2003); mandulában (Tamura és mts., 2000; Channuntapipat és mts., 2001; Ma és Oliveira, 2001) és japánszilvában (Sapir és mts., 2004).

Az egyes allélokhoz köthető fragmentumméreték közti csekély mértékű polimorfizmus okozta problémák kiküszöbölésének másik módja, hogy a méretmeghatározás felbontóképességét növeljük. A mikroszatellit markerek kiértékelése során széles körben alkalmazott technikához hasonlóan, fluoreszcens jelölésű (FAM, 6-FAM, JOE, TET stb.) primerek segítségével az 500 bp alatti fragmentumok mérete pontosan meghatározható automata szekvenátorban. Ezt a módszert japánkörte esetében Sawamura és mts. (2002), mandula esetében Ortega és mts. (2005) alkalmazták sikerrel. Utóbbi szerzők e technikával a mandula *S*-genotípusok egyértelmű meghatározását segítő leírták a jelenleg ismert 29 mandula *S*-allél 1. intront tartalmazó PCR-amplifikátumainak pontos méretét. Cseresznyében 13 allél esetében ismertették a 234–460 bp közötti 1. intronrégiók hosszát (Sonneveld és mts., 2006). Két allél (S_2 és S_7) ugyanakkora fragmentumot eredményezett, az S_{13} -allélnál pedig mikroszatellithez hasonló, kismértékben eltérő, különböző fragmentumhosszakat detektáltak.

A *S*-genotípusok meghatározásához a pollenkomponens gént először Yamane és mts. (2003d) használták japánkajszai esetében. A *HindIII*-mal végzett restrikciós hasítást követően szétválasztott fragmentumokhoz jelölt *Pm*-SFB cDNS-t hibridizáltak. Az S_1 – S_7 japánkajszai allélok mindegyike esetén egy sáv mutatkozott, kivéve az S_7 -allélt, ahol kettő. Ezt kezdetben két különböző SFB gén jelenlétével magyarázták, melyek kompetitív hatása

a poliploid növényeknél leírt módon vezethetett a pollen *S*-specifitásának elvesztéséhez (Lewis és Modlibowska, 1942; Lewis, 1947; Tsukamoto és mts., 2005). Később ezt a feltételezést elvetették, mikor az SFB₁-szekvenciában egy olyan beékelődő nukleinsavszakaszt találtak, amely több *Hind*III hasítóhelyet tartalmazott (Ushijima és mts., 2004).

Régóta ismert volt, hogy a cseresznye öntermékenyülését a pollenkomponens gén nagyenergiájú röntgensugárzás hatására bekövetkezett, funkcióvesztéssel járó mutációja idézte elő (Lewis és Crowe, 1954). Miután a cseresznye mutáns SFB₄'-allélját megszekvenálták (Ushijima és mts., 2004), komoly verseny indult olyan egyszerű és olcsó molekuláris markerek kidolgozására, melyek a nemesítési programokban jól használhatók. Ikeda és mts. (2004b) nested PCR-rel szaporították fel az SFB₄- és SFB₄'-allélokat, majd 6 %-os poliakrilamid gélen, illetve az SFB₄'-allélra specifikus restriktív enzimekkel végzett hasítást követően agarózgélben is megkülönböztethető mintázathoz jutottak. Zhu és mts. (2004) olyan primerpárt terveztek, amely specifikusan csak az SFB₄'-allélt amplifikálja, így a detektálás egyszerűbbé és közvetlenül használhatóvá vált a nemesítési programokban. Később Sonneveld és mts. (2005) is SFB₃- és SFB₄-specifikus primereket használtak annak igazolására, hogy az öntermékenyülés nem a heteroallélikus pollennek tudható be. A PaSFB₄ primerpár használatával az S₄- és S₄'-allélok fragmentumai szabad szemmel nem voltak elkülöníthetők az agarózgélben, de a PaSFB₃ primerpár csak az S₃-allélt szaporította fel, az S₃'-t nem, miután ezen allél esetében a mutáció az SFB₃ gén delécióját idézte elő.

A *Prunus* fajok SFB génjének 5' át nem íródó szakaszán található egy intronrégió, melynek mérete 100 bp körüli nagyságrendű (Ushijima és mts., 2003; Yamane és mts., 2003b). Vaughan és mts. (2006) az intronrégiót határoló szekvenciákra tervezett primereket fluoreszcens festékekkel jelölték, és az Ortega és mts. (2005) által az *S*-RN-áz gén 1. intronrégiójának vizsgálatára használt, pontos méretmeghatározáson alapuló módszerhez hasonló, de az SFB gén intronjának allélspecifikus variabilitását kiaknázó módszert dolgoztak ki cseresznyefajták *S*-genotípusának meghatározására. Az S₁-S₇, S₁₀, S₁₂-S₁₃ és S₁₆ allélok esetén az intronméret 81-122 bp között változott. Az amplifikált SFB-fragmentumok mérete több allél esetében azonos volt, de az *S*-RN-áz gén 1. intronrégiójára tervezett primerekkel együttesen használva (multiplex PCR) minden allél egyértelműen azonosíthatóvá vált. A módszer előnye, hogy a nagyobb időigényű allélspecifikus PCR és agaróz gélelektroforetikus vizsgálat alternatívája lehet nagy egyedszámú populációk vizsgálata esetén (Vaughan és mts., 2006).

A DNS-alapú technikák a legköltségesebbek mind a felszerelést, mind a felhasznált

vegyszereket illetően, nagy előnyük azonban, hogy már csírázó magoncok esetében használhatók, nem kell megvárni a fák termőrefordulását (Ortega és Dicenta, 2004). Az *S*-allél-szekvenciák nemzetközi, on-line adatbázisokban (EMBL/GenBank/DDJB) szabadon hozzáférhetők, ami segíti a különböző laboratóriumokban elért eredmények összevetését.

3.5. A gyümölcsfák *S*-allél-rendszere

3.5.1. Mandula

Az első termékenyülési vizsgálatokat szabadföldi keresztezésekkel és pollentömlő-analízissel (Tufts és Philp, 1922; Pimienta és mts., 1983; Ben-Njima és Socias i Company, 1995) végezték. Az első két inkompatibilitási csoportot Tufts és Philp (1922) állapították meg, melyek a 'Nonpareil' (S_cS_d), illetve a 'Mission' és a 'Languedoc' (S_aS_b) fajtákat tartalmazták. Később négy további csoportot írtak le, melyek az előző két csoport közötti keresztezésekből alakultak ki (Kester és mts., 1994). Az amerikai és európai alléljelölési rendszer között Bošković és mts. (1997b) határozták meg az összefüggéseket: $S_a = S_5$, $S_b = S_1$, $S_c = S_7$ és $S_d = S_8$. Bošković és mts. (1997b; 1998; 1999; 2003), valamint Certal és mts. (2002) IEF és NEpHGE alapján további allélokat írtak le (S_6 , S_9 - S_{23}).

Ballester és mts. (1998) egy öntermékenyülő és önmeddő fajták keresztezéséből származó, 58 tagú F_1 hibridnemzedék hasadási arányait vizsgálva meghatározták az *S*-lókusz helyét a mandula kapcsoltsági térképén. Három, különböző mandula *S*-allélokat kódoló cDNS és 12 másik, a *Rosaceae* családból származó szekvencia összevetésével Ushijima és mts. (1998) jellemezték az *S*-RN-áz gén szerkezetét. Tamura és mts. (2000) 4 allélra (S_a - S_d) specifikus primert terveztek, melyekkel 5 fajta genotípusát írták le. Channuntapipat és mts. (2001; 2003) konszenzus és allélspecifikus primereket közöltek, melyek segítségével megadták néhány allél pontos intronhosszát, illetve igazolták, hogy az intronkivágódás a mandula *S*-RN-áz allélokban is a GT/AG intronszekvenciák határán történik. Ortega és mts. (2005) 24 fajta *S*-genotípusát határozták meg a két intront határoló régiókra tervezett primerekkel. Az 1. intronrégió amplifikációjából nyert fragmentumok pontos hosszát elsőként közölték, illetve további 6 új allélt (S_{24} - S_{29}) azonosítottak. A *Rosaceae* családon belül elsőként mandulából izolálták a pollenben kifejeződő F-box gént (Ushijima és mts., 2003).

Jelenleg összesen 20 inkompatibilitási csoport (I-XX) ismert mandulafajták között és egy számos egyedi genotípust felvonultató, általános pollenadóként használható fajtákat tömörítő 0 csoport (Ortega és mts., 2006). López és mts. (2006) 133 mandulafajtát rendeztek szintén húsz inkompatibilitási csoportba, de e rendszer és az Ortega és mts.

(2006) által közölt csoportosítás között számos eltérés található.

3.5.2. Cseresznye

Crane és Lawrence 1929-ben írták le az első inter-inkompatibilis fajtákat szabadföldi keresztezések alapján. Crane és Brown (1937) 45 fajtát 11 inkompatibilitási csoportba soroltak, később Matthews és Dow (1969) 6 *S*-allélt azonosítottak (S_1 – S_6) és mintegy 160 fajta *S*-genotípusát közölték. Az Angliában előállított öntermékenyülő magoncok felhasználásával hozták létre az első öntermékenyülő fajtát, a ‘Stellát’ (Lapins, 1971). Az *S*-ribonukleázok vizsgálatával további új allélok és inkompatibilitási csoportokat írtak le (Bošković és mts., 1997a; Bošković és mts., 2000; Bošković és Tobutt, 1996; 2001). A DNS-alapú vizsgálatok során az *S*-RN-áz gén két intronját határoló konzervatív szekvenciákra tervezett konszenzus primerekkel állapították meg a genotípusokat, illetve 16 allél esetében specifikus primereket terveztek (Tao és mts., 1999; Wiersma és mts., 2001; Sonneveld és mts., 2001; 2003; 2006). Vaughan és mts. (2006) az SFB gén intronját határoló konzervatív szakaszokra tervezett primerpárral, szintén az intronhossz-polimorfizmus alapján 12 allélt detektáltak. Jelenleg 223 önmeddő és 25 öntermékenyülő fajta genotípusa ismert, összesen 26 inkompatibilitási csoport létezik. A termesztett cseresznyefajtákban 14 allélt írtak le, vad populációkban további hatot (Tobutt és mts., 2005; Békefi és mts., 2003; de Cuyper és mts., 2005).

3.5.3. Alma

Kobel és mts. (1939) írtak le elsőként 11 *S*-allélt 20 almafajtából pollentömlő-növekedés és szabadföldi termékenyülésvizsgálattal, melyeket S_1 – S_{11} -ként jelölték. Az első molekuláris analízis Sassa és mts. (1994) nevéhez fűződik, akik 2D-PAGE segítségével 6 allélt azonosítottak (S_a – S_f) négy diploid és három triploid fajtában. Ezt később további 3 alléllal bővítették ki (S_g – S_i) (Komori és mts., 2000). Bošković és Tobutt (1999) NEpHGE-vizsgálatokkal 14 új *S*-RN-áz allélt (S_{12} – S_{25}) írtak le, melyek közül kettő (S_{23} és S_{25}) DNS-szekvenciája később azonosnak bizonyult (Van Nerum és mts., 2001).

Egy belga kutatócsoport 15 (Broothaerts és mts., 1995; Janssens és mts., 1995; Van Nerum és mts., 2001; Broothaerts, 2003), míg egy japán csoport 10 *S*-RN-ázt kódoló DNS-szekvenciát határozott meg (Sassa és mts., 1996; Kitahara és mts., 1999; 2000; Matsumoto és Kitahara, 2000; Kitahara és Matsumoto, 2002a;b; Matityahu és mts., 2005). Közel 200 fajta *S*-genotípusa ismert, mindezidáig 56 inkompatibilitási csoportot és 29 *S*-allélt írtak le (Broothaerts és Van Nerum, 2003; Matityahu és mts., 2005). Alma F-box szekvenciák még csak két allél (S_1 és S_2) esetében ismertek (Cheng és mts., 2006).

Mivel egyetlen öntermékenyülő almafajta sem létezett, e tulajdonság kialakítása érdekében a *Rosaceae* családban elsőként alkalmaztak genetikai transzformációt. Az 'Elstar' (S_3S_5) fajtában az S_3 -allél géncsendesítésével alakították ki az öntermékenyülő jelleget (Van Nerum és mts., 2000b; Broothaerts és mts., 2004).

3.5.4. Körte

A japánkörte (*Pyrus serotina* Rehd.) termékenyülési rendszeréről nagyon sok adat került napvilágra, mert a *Rosaceae* családban ez volt az első faj, amelyben azonosították az S -RN-ázokat (Sassa és mts., 1992). A fajták önmeddők, az egyetlen öntermékenyülő fajta az 'Osa-Nijisseiki' (Hirata, 1989). Az öntermékenyülést okozó allélt S_4^{sm} néven jelölik (sm= stylar-part mutant). Eddig összesen 9 allélt írtak le, a fajták 8 inkompatibilitási csoportot alkotnak (Carlos és mts., 2001; Ishimizu és mts., 1999; Hiratsuka és mts., 1998; Nakanishi és mts., 1991; Sassa és mts., 1992; Sawamura és mts., 2002; Takasaki és mts., 2004).

Az ismert genotípusú kínai körtefajták (*Pyrus ussuriensis*) 7 inkompatibilitási csoportba sorolhatók (Tomimoto és mts., 1996).

Európai körtében (*Pyrus communis* L.) Tomimoto és mts. (1996) írtak le elsőként 9 S -allélt 8 fajtából 2D-PAGE alapján (S_1 - S_9). Mivel a legtöbb nemesítési programban gyakran használták ugyanazokat a fajtákat szülőként, nagyon sok inter-inkompatibilis hibrid jött létre (Morettini, 1957; Bellini és mts., 2000). Zuccherelli és mts. (2002) 6 allélt azonosítottak PCR alapján, de eltérő jelölést alkalmaztak, és nem a korábbi sort folytatták (S_a - S_e , S_h), majd további 7 allélról (S_i , S_k - S_p) számoltak be Zisovich és mts. (2004a). Az S_e -allélt később S_j néven írták le Zisovich és mts. (2004a), így bizonyos szerzők az S_a - S_d és S_h - S_p allélsort használják. Takasaki és mts. (2006) 9 S -RN-áz cDNS szekvenciát határozott meg, melyek közül kettő (S_q és S_r) újnak bizonyult. Hatvanhárom fajta között 25 genotípust és 14 inkompatibilitási csoportot azonosítottak. Sanzol és mts. (2006) a C1, C2 és C5 konzervatív régiókra tervezett primerekkel 5 S -RN-áz allélt (S_1 - S_5) azonosítottak, és meghatározták a betűvel és számmal jelölt allélok közti összefüggéseket: $S_1 = S_j$, $S_2 = S_i$, $S_3 = S_k$, $S_4 = S_b$ és $S_5 = S_a$.

3.5.5. Meggy

Az allotetraploid meggy (*Prunus cerasus* L.) fajtái között egyaránt ismertek öntermékenyülők és önmeddők (Lech és Tylus, 1983; Redalen, 1984a;b; Lansari és Iezzoni, 1990). Yamane és mts. (2001) az 'Érdi Bötermő' fajta 2 allélját megszekvenálták, az egyik azonos volt a cseresznye S_4 -alléljával, a másik újnak bizonyult. A megvizsgált 13

meggyfajta mindegyikében találtak legalább egy cseresznye S -allélt. Interspecifikus cseresznye \times meggy keresztezésekkel bizonyították, hogy a GSI a meggy esetében is létezik, annak poliploid jellegétől függetlenül (Hauck és mts., 2002). Az 'Érdi Bőtermő' ($S_4S_6mS_a$) fajtával végzett keresztezés során kiderült, hogy az S_6m -haplotípusnak nincsen funkcióképes bibekomponense. A további vizsgálatok megállapították, hogy az S_6 -RN-ázt kódoló allélban egy 2600 bp méretű inszerció található, ami megakadályozza a transzlációt (Yamane és mts., 2003a). Az ismert 14 meggy haplotípus közül hét bizonyult funkcióképtelennek, melyeknek vagy a bibe-, vagy a pollenkomponense sérült (Hauck és mts., 2002; 2006; Yamane és mts., 2003a, Tobutt és mts., 2004; Tsukamoto és mts., 2006). Hauck és mts. (2006) önmeddő és öntermékenyülő típusokat összevetve megalkották az ún. *one-allele match* modellt, mely szerint az öntermékenyüléshez a pollennek két funkcióját veszített haplotípust kell hordoznia. Amennyiben a pollen két haplotípusa közül csak egy is funkcióképes, akkor a kombináció inkompatibilis. A modell működését 92 magonc tesztelésével igazolták.

3.5.6. Szilva

A diploid szilvák S -allél-rendszeréről jóval több közlemény jelent meg, mint a hexaploid szilvákéről. A legtöbb termesztett japánszilvafajta (*Prunus salicina* Lindl.) önmeddő. Az elsőként, cDNS alapján meghatározott S -genotípusokat betűkkel jelölték (S_a - S_i), 17 fajtában 9 különböző allélt detektáltak (Yamane és mts., 1999; Beppu és mts., 2002), majd később további allélokat (S_j - S_n) azonosítottak (Beppu és mts., 2003). Az öntermékenyülést a dominánsan öröklődő S_e -allél határozza meg (Beppu és mts., 2005). Egy másik kutatócsoport 5 S -allélt klónozott újabb fajtákból (Sapir és mts., 2004), de mivel nem tudták összevetni a korábban leírt allélokkal, így számokkal jelölték azokat (S_3 , S_4 , S_5 és S_6). A két jelölési rendszer összehasonlításával Halász és mts. (2007) megállapították, hogy az S_5 -allél azonos az S_e -vel, illetve az S_4 - az S_c -alléllal, továbbá meghatározták az egyes allélok 1. intronrégióinak pontos hosszát. Japánszilva pollenkomponens génjéről mindezidáig egyetlen tanulmány számolt be, Zhang és mts. (2007) 8 SFB-allélt izoláltak és jellemeztek.

Prunus domestica L. fajtákkal végzett terméskötődési vizsgálatok alapján előfordultak önmeddő (Sutton, 1918; Crane, 1925; Tehrani, 1991), öntermékenyülő (Rawes, 1921), illetve hímsteril fajták is (Szabó, 2003). Sutherland és mts. (2004b) 24 S -allélt izoláltak a diploid *Prunus cerasiferából*, mely eredményeik a hexaploid szilva vizsgálatának első lépéseként tekinthetők. Mintegy 19 szilvafajta részleges S -genotípusát határozták meg PCR-analízissel és szekvenciaadatok alapján.

3.5.7. Őszibarack

Az őszibarack (*Prunus persica* [L.] Batsch) *S*-lókuszának működéséről sokáig igen kevés információ állt csak rendelkezésre, valószínűleg azért, mert szinte valamennyi fajta öntermékenyülő (Cullinan, 1937; Fogle, 1977). Néhány fajta kivételnek tekinthető, de ezeknél az ún. hímsterilitás jelensége fordul elő. Ez recesszíven öröklődő, monofaktoriális tulajdonság, mely nem kötődik az *S*-lókuszhoz (Chaparro és mts., 1994; Dirlewanger és mts., 1998). Martínez-Gómez és mts. (2003) egy mandula × őszibarack interspecifikus hibridpopuláció vizsgálatát végezték el PCR-analízissel, és az őszibarack szülőnövényben, valamint a hibridekben ugyanazt a fragmentumot detektálták.

A 'Texas' fajta bibeszálaiban két ribonukleáz izoenzimet azonosítottak SDS-PAGE technikával, melyek közül a 21 kD molekulatömegű enzimről kimutatták, hogy szignifikánsan gátolja a pollentömlők növekedését (Roiz és Shoseyov, 1995). Kutatócsoportunk 25 fajta NEpHGE és PCR-alapú vizsgálatával igazolta, hogy az öntermékenységet nem az *S*-ribonukleázok funkcióvesztése okozza, hanem vagy a pollenkomponens valamilyen jellegű mutációja, vagy a ma még kevésbé ismert, ún. módosító gének hatása (Hegedűs és mts., 2006). A különböző eredetű és változatos fenotípusú fajták között mindössze két *S*-allélt azonosítottunk, szemben a többi csonthéjas esetében eddig leírt 17–30 alléllal. A legfontosabb áruajták azonos *S*-allélt hordoznak homozigóta állapotban, ami a közös eredet és az öntermékenyülési képesség következménye lehet.

A legutóbbi vizsgálati eredmények szerint Tao és mts. (2007) 3 mutáns *S*-haplotípust izoláltak őszibarackból, és kimutatták, hogy ezek eredeti, nem mutáns változatai más *Prunus* fajokban (mandula és japánszilva) fellelhetők. Mindhárom haplotípus SFB génszakaszába egy inszerció ékelődik, s az egyikben egy funkcióképtelen *S*-RN-áz fehérjéhez vezető, nem szinonim nukleotidszubsztitúció is megfigyelhető.

3.5.8. Japánkajszi

A japánkajszival (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) kapcsolatos első molekuláris vizsgálatokat Tao és mts. (2000) adták közre. Mind DNS-hibridizációs technikával, mind PCR-analízissel azonosítani tudtak egy, kizárólag az öntermékenyülő fajtákban megjelenő fragmentumot. Szintén e két módszer segítségével izoláltak hét (*S*₁–*S*₇) japánkajszi *S*-RN-áz allélt, és meghatározták hat fajta *S*-genotípusát, melyet irányított keresztezéssel is megerősítettek, továbbá egy inkompatibilitási csoportot is leírtak (Yaegaki és mts., 2001). Az öntermékenyülő fajták által hordozott allélt Tao és mts. (2002) nevezték el *S*_F-allélnak, és feltételezték, hogy az öntermékenyülést a pollenkomponensgénben bekövetkezett

mutáció idézhette elő. Később egy gyors és egyszerű módszert is kidolgoztak az S_f -allélt hordozó fajták azonosítására (Habu és mts., 2006).

Az *Antirrhinum* fajokat követően a *Rosaceae* családban is jellemezték az S -lókuszt pollenkomponenseként valószínűsíthető F-box gént. Az első közlemény Entani és mts. (2003) nevéhez fűződik, akik a 'Nanco' fajta S -RN-áz génje közelében 13 gént azonosítottak, melyek közül az általuk SLF-ként nevezett gén bizonyult az S -lókuszt pollenkomponensének. Később az öntermékenyülésért felelős SFB_f -allélban egy 6,8 kbp hosszú inszerciót azonosítottak, melynek hatására a HVa és HVb régiókat nem tartalmazó, ezért az allélspecifikus felismerésre sem képes, sérült SFB fehérje transzlálódik (Ushijima és mts., 2004).

3.5.9. Európai kajszí

3.5.9.1. Kajszifajták csoportosítása, termékenyülése

A kajszí a *Rosaceae* család, *Prunoideae* alcsalád *Prunus* L. nemzetségébe tartozik. A legtöbb termesztett kajszifajtát a *Prunus armeniaca* L. faj adja. Vavilov (1926; 1951) a kajszí származási központjaként Kína északi, észak-keleti hegységeit jelölte meg. A vad kajsziformákban gazdag Tien-san, valamint Dzsungária hegységei másodlagos géncentrumnak tekinthetők (Mehlenbacher és mts., 1991). A kajszifajták négy különböző földrajzi csoportba sorolhatók: ázsiai, kaukázusi, európai és a dzsungár-altáji (Kosztina, 1970), melyeket később a kínai (ide tartoznak a *P. mandshurica* és *P. sibirica* fajtái) és a kelet-kínai (pl. a *P. ansu* fajták) csoportokkal egészítettek ki (Bailey és Hough, 1975). A Xinjiang, Afganisztán, Beludzsisztán, Pakisztán és Észak-India területeiről származó közép-ázsiai csoport a legöregebb és leginkább formagazdag, a fajták többsége önmeddő. Örményország, Grúzia, Azerbajdzsán, Dagesztán, Irán, Irak, Szíria, Törökország és Észak-Afrika fajtái a kaukázusi csoport nagyobb gyümölcsű, kisebb hidegigényű, túlnyomó részben szintén önmeddő fajtakörébe tartoznak. A dzsungáriai-altáji csoportba a dzsarszkenti, a taldikurgáni, a kazahsztáni és xinjiangi kis gyümölcsű szelekciók tartoznak (Mehlenbacher és mts., 1991). Az Európában, Észak-Amerikában, Dél-Afrikában és Ausztráliában termesztett fajták túlnyomó része egyaránt az európai csoportba sorolható. Ez a csoport számít a termesztési szempontból jelentős négy csoport közül a legfiatalabbnak és a legkevésbé változékonynak. A csoport fajtáinak zömét öntermékenyülőnek ismerik, de az utóbbi 15 év során, a többi csoport fajtáit is felhasználó keresztezéses nemesítés útján egyre több, széles körben elterjedt, önmeddő fajtát hoztak létre (Nyujtó és mts., 1985; Burgos és mts., 1993; Nyéki és Szabó, 1995; Pedryc, 2003).

A piac igényeinek megfelelő fajták előállítására feltétlenül megköveteli a

keresztezőkbe vont nemesítési alapanyagok körének szélesítését. Az Egyesült Államokban illetve Kanadában létrehozott fajtákat gyümölcstömögük, színük miatt nem lehet kihagyni a nemesítési programokból. A közép-ázsiai fajták esetében a magas cukortartalom, aszalványkészítésre való alkalmasság, hosszú mélynyugalmi állapot azok a tényezők, amelyek miatt a nemesítési műhelyekben ezek a fajták is potenciális szülőpartnernek számítanak.

A múlt század közepén két észak-amerikai fajtáról ('Riland' és 'Perfection') is bebizonyosodott önmeddő jellegük (Schultz, 1948). Egea és mts. (1991) szintén leírtak két önmeddő fajtát, miközben egy másik vizsgálat során 123 európai és amerikai fajta, illetve hibrid közül 42 bizonyult önmeddőnek (Burgos és mts., 1997a). Lomakin (1975) szerint a „női sterilitás” az európai fajták 24 %-át, az iráni-kaukázusi fajták 29 %-át, a közép-ázsiai fajták 31%-át és a kínai fajták 39 %-át jellemzi.

Magyarországon a fajták többsége öntermékenyülő (Horn, 1939), az elsőként leírt önmeddő fajta a 'Szegeci mammut' volt (Brózik és Nyéki, 1975). Maliga (1966) az 'Ananász' fajtát is önmeddőként határozta meg. Később az Óriás fajtacsoport többi tagjáról is bebizonyították, hogy önmeddők (Nyujtó és mts., 1985; Szabó és Nyéki, 1991).

3.5.9.2. Az inkompatibilitás öröklődése

Az inkompatibilitás öröklődésének tanulmányozása során 19 különböző keresztezésből (mindkét szülő önmeddő; mindkét szülő öntermékenyülő; egyik szülő önmeddő, másik öntermékenyülő) származó utódokat vizsgáltak (Burgos és mts., 1997b). A hasadó nemzedékekben meghatározták a autogám gyümölcskötődési arányokat, illetve a pollentömlő növekedését. A szerzők eredményeik alapján azt a hipotézist fogalmazták meg, hogy az inkompatibilitás monofaktoriális tulajdonság, mely a mendeli szabályok szerint öröklődik. Burgos és mts. (1998) NEpHGE alapján kilenc észak-amerikai és spanyol fajtában azonosítottak 6 allélt, amelyek az önmeddőség kialakításában játszanak szerepet (S_{1-6}), illetve az öntermékenyülést biztosító S_C -allélt. A 'Moniquí' × 'Pepito' és 'Gitano' × 'Pepito' keresztezésekből származó magoncokon tesztelték az inkompatibilitás öröklődését, és a hasadási arány a korábbi hipotézist igazolta. Az öntermékenyülésért felelős S -allél domináns allélként működik, ezáltal a heterozigóta egyedek is öntermékenyülők. Az öntermékenyülésért felelős (S_C) allél hatására a pollentömlő bármely termőben képes elérni az embriózsákot, míg az önmeddőségért felelős allélok – amennyiben ugyanaz az allél mind a pollenben, mind a bibében jelen van – megakadályozzák a pollentömlő növekedését.

Karyiannis és Tsaftaris (1999) az öntermékenyülő görög 'Bebeco' és az önmeddő

észak-amerikai 'Veecot' és 'Sunglo' keresztezéséből származó utódokon vizsgálták az inkompatibilitás öröklődését. Az 1:1 arányú hasadásból arra következtettek, hogy a 'Bebeco' heterozigóta, és inkompatibilitási allélja különbözik a 'Sunglo' és 'Veecot' fajták által hordozott alléloktól.

Más vizsgálatok Burgos és mts. (1997b; 1998) hipotézisének ellentmondó eredményre vezettek. Audergon és mts. (1999) 2 keresztezésből származó 100 magoncot vizsgáltak. Mindkét esetben az önmeddő 'Goldrich' volt az anya, pollenadóként pedig két öntermékenyülő fajtát ('Amabile Vecchioni' és 'Icapi 34/6') használtak, és eredményeik alapján nem látták megerősítve az öntermékenyülés monofaktoriális meghatározottságát. *S*-ribonukleáz izoenzimek vizsgálatával azonban igazolható volt az egy gén általi szabályozás, és az allélok öröklődése a domináns S_C -allél hipotézisét támasztotta alá (Burgos és mts., 1998; Burgos és Pérez-Tornero, 1999).

3.5.9.3. Gyümölcskötődés és pollentömlő-analízis: a kezdeti vizsgálatok

Nyujtó és mts. (1985) szabadföldi tesztkeresztesek alapján megállapították, hogy az Óriás fajtakör tagjai ('Ceglédi óriás', 'Szegedi mammut', 'Nagykőrösi óriás' és 'Ligeti óriás') önmeddők, ráadásul egymást kölcsönösen sem termékenyítik. Így e fajták alkotják a kajszis elsőként leírt inter-inkompatibilitási csoportját (Szabó és Nyéki, 1991). Egy másik inter-inkompatibilitási csoportot is azonosítottak, amely a 'Moniquí Fino' és a 'Moniquí Borde' spanyol fajtákból áll (Egea és mts., 1991). E két fajta morfológiailag nagyon hasonló, feltételezések szerint egyazon fajta két klónjáról van szó, ezért valójában nem tekinthetők önálló csoportnak. Burgos és mts. (1993) nyolc spanyol fajta tesztkeresztesése alapján nem találtak kölcsönösen inkompatibilis fajtákat. A spanyol fajták többsége észak-amerikai (önmeddő) és európai (öntermékenyülő) fajták keresztezéséből származik (Egea és mts., 1988), ezért nagymértékű heterozigótaság jellemzi őket. Egea és Burgos (1996) pollentömlő-analízissel és szabadföldi keresztezésekkel észak-amerikai fajták kompatibilitási viszonyait vizsgálva megállapították, hogy a 'Lambertin-1', 'Goldrich', 'Hargrand' és 'Harcot' fajták önmeddők, ráadásul az első három fajta között semmilyen kombinációban nem tapasztaltak termékenyülést. Mindhárom fajta pedigréjében szerepel az önmeddő 'Perfection' fajta (Schultz, 1948), tehát rokonságban állnak egymással. Ezek alapján e három fajta közös *S*-genotípussal rendelkezik, melyet S_1S_2 -ként jelölték meg. A 'Harcot' (S_1S_4) kompatibilisnek bizonyult mindegyikkel.

Viti és mts. (1997) 2 év alatt 48 keresztezést elvégezve megerősítették, hogy a 'Harcot', 'Moniquí' és 'Hargrand' fajták valóban önmeddők. Andrés és Durán (1998) 20 spanyol klón termékenyülési sajátosságát vizsgálták, és kiderült, hogy a 'Moniquí

Azaraque' klón esetében a pollentömlő sokkal lassabban növekszik ugyanolyan körülmények között, mint a többiben, míg a megtermékenyüléshez a 'Chicanos Archena' fajtának van a legrövidebb időre szüksége. Alburquerque és mts. (2004) eredményei alapján két jó termőképességű fajta, a 'Beliana' és a 'Palstein' pollentömlője gyorsabban növekedett, mint a kevésbé jó termőképességű 'Guillermo' és 'Bergeron' fajtáké. Hajilou és mts. (2006) 5 északnyugat-iráni fajtából kettőt találtak öntermékenyülőnek szabadföldi keresztezéssel és pollentömlő-vizsgálattal.

3.5.9.4. Fehérje- és DNS-alapú technikák: nagy hatékonyságú molekuláris vizsgálatok

Burgos és mts. (1998) nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálással (NEpHGE) vizsgálták 9 észak-amerikai és spanyol fajta *S*-genotípusát. Ennek alapján ők írtak le elsőként 6 *S*-RN-áz izoenzimet, melyek az inkompatibilitás kialakításában játszanak szerepet (*S*₁-*S*₆), illetve az *S*_C-RN-ázt, melyet valamennyi öntermékenyülő fajta hordoz. Az *S*-allélok számát később kibővítették, amikor a korábban nem ismert *S*₇-allélt azonosították NEpHGE alapján (Alburquerque és mts., 2002). Több olyan fajtát és magoncot is találtak, amelyek *S*_C*S*_C homozigóták, így különösen értékes keresztezési partnerek lehetnek, hiszen minden utódjuk örökli az *S*_C-allélt.

Kajszi esetében a DNS-alapú vizsgálatok első lépése a különböző földrajzi csoportok genetikai rokonságának föltérképezése volt mikroszatellit markerekkel (Romero és mts., 2003). Ezt követően egy spanyol kutatócsoport elkészítette a kajszi kapcsoltsági térképét SSR- és AFLP-markerek alapján, mely az önmeddőség jellemvonásának meghatározottságáról is értékes információt szolgáltatott (Vilanova és mts., 2003a;b). Sutherland és mts. (2004a) három konszenzus primert (EM-primerek) terveztek, melyek a *Prunus* fajok *S*-alléljainak 2. intronrégióját amplifikálják. Ezek segítségével az *S*₁-*S*₆ és az *S*_C-allélok agaróz gélelektroforézissel kimutathatók lettek. A kajszi 1. intronját határoló konzervatív szekvenciákra tervezett primerpárral (SRc-F és SRc-R) (Romero és mts., 2004; Vilanova és mts., 2005) 16 fajtában 7 allélt azonosítottak, melyek hossza 250 és 400 bp között változott, az *S*₁- és *S*₇-allél mérete azonban azonos volt, tehát önmagában csak az 1. intronra végzett vizsgálatok nem elegendőek a genotípus meghatározásához. Az *S*₆-allélt ezzel a primerpárral nem sikerült amplifikálni, viszont a reverz primer helyett a korábban, cseresznyére kidolgozott Pru-T2 indítószekvencia (Tao és mts., 1999) használtával az *S*₆-allél is kimutatható volt. A 2. intronrégió Pru-C2/Pru-C4R primerekkel történt amplifikációja során az *S*₃ kivételével a többi allél detektálható volt. Érdekes módon az *S*₂- és *S*₃-allélban egy mindkét intront tartalmazó fragmentumot sikerült amplifikálni az SRc-F/Pru-C6R primerpárral, és ebből a PCR-termékből nested PCR-rel már a 2. intronrégió is

amplifikálható volt. Az S_2 -allél a ‘Moniquí’ (S_2S_6) fajtában nem szaporodott fel, holott a többiben igen, valószínűleg a preferenciális amplifikáció miatt. Az 2. táblázat összefoglalja az eddig ismert kajszi S -genotípusokat.

2. táblázat. Kajszifajták S -genotípusa (Vilanova és mts., 2005)

csoport	fajta	S-genotípus	forrás
I. inter-inkompatibilitási csoport	Goldrich Hargrand Lambertín-1	S_1S_2	Egea és Burgos (1996)
0. csoport: univerzális pollenadók	Mauricio	$S_C S_1$	Albuquerque és mts. (2002)
	Canino	$S_C S_2$	Albuquerque és mts. (2002)
	Pepito	$S_C S_2$	Burgos és mts. (1998)
	Colorao*	$S_C S_5$	Burgos és mts. (1998)
	Rial Fino	$S_C S_6$	Sutherland és mts. (2004a)
	Beliana	$S_C S_7$	Albuquerque és mts. (2002)
	Currot	$S_C S_C$	Albuquerque és mts. (2002)
	Palau	$S_C S_C$	Vilanova és mts. (2005)
	Ginesta	$S_C S_C$	Vilanova és mts. (2005)
	Moniquí	$S_2 S_6$	Burgos és mts. (1998)
	Priana	$S_2 S_7$	Albuquerque és mts. (2002)
Sunglo	$S_2 S_3$	Burgos és mts. (1998)	

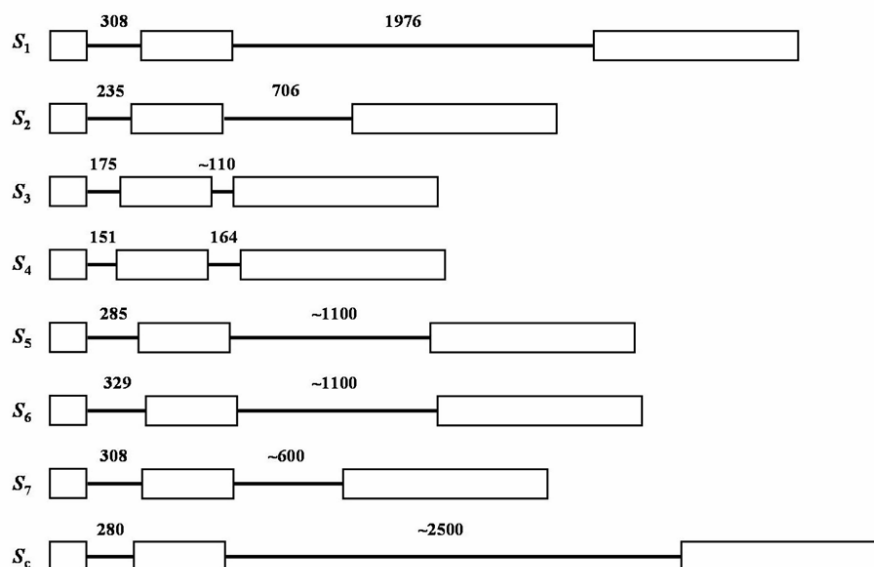
*A ‘Colorao’ fajtát S -genotípusa alapján Vilanova és mts. (2005) az univerzális pollenadókhöz sorolták és figyelmen kívül hagyták, hogy a fajta hímsteril (Burgos és mts., 1998)

Egy kínai kutatócsoport hat kínai fajtából összesen 9 S -allélt azonosított korábban publikált primerekkel (Tao és mts., 1999), Southern-blot technikával és tesztkeresztezésekkel (Jie és mts., 2005). Két fajta, a ‘Hongfeng’ és ‘Xinshiji’ azonos S -genotípusúnak bizonyult, így inter-inkompatibilis csoportot képeznek. Ezeket az eredményeket azonban nem vetették össze a korábban leírt rendszerrel (Burgos és mts., 1998; Albuquerque és mts., 2002), így az itt jelölt allélok (S_1 - S_9) nem azonosak az elsőként leírt S_1 - S_7 és S_C allélokkal.

3.5.9.5. A kajszi S -lókuszának szerkezete

Az önmeddő ‘Stark Early Orange’ és az öntermékenyülő ‘Tyrimthos’ fajták keresztezéséből származó F_2 nemzedék (az F_1 ‘Lito’ öntermékenyítéséből létrejött hibridek) alapján készített kapcsoltsági térképen az S -lókusz a 6. csoportban található (Vilanova és mts., 2003a). A hibridpopulációban AS1 és Pru-C4R primerekkel (Tao és mts., 1999) végzett PCR-analízis során az önmeddő egyedek mindegyikében egy 1,5 kb hosszúságú fragmentum amplifikálódott, míg az öntermékenyülőknél semmilyen PCR-

termék nem volt. Japánkajsziban a Pru-C2 és Pru-C4R primerpár ugyanakkora fragmentumot eredményezett, érdekes módon azonban fordítva, csak az öntermékenyülő fajták esetében (Tao és mts., 2000). A ‘Goldrich’ fajtából készült BAC génkönyvtár (Vilanova és mts., 2003b) alapján Romero és mts. (2004) megállapították, hogy a kajszis *S*-lókusza is hasonló szerkezetű, mint a korábban leírt többi *Prunus* fajé (Entani és mts., 2003; Ushijima és mts., 2003; Yamane és mts., 2003b). A kajszis *S*-RN-áz gén is két intront tartalmaz, melyek hosszát az *S*₁-, *S*₂- és *S*₄-allélok esetében pontosan meghatározták a ‘Goldrich’ (*S*₁*S*₂) és ‘Harcot’ (*S*₁*S*₄) fajtákból. Az intronokat a GT/AG konzervatív szekvenciák határolják, AT tartalmuk 65-78 % között található. A három allél aminosav-szekvenciája 77,5 %-ban azonos, tíz másik *Prunus* *S*-RN-ázzal összevetve az azonosság 55-82 % volt. Később az *S*₃-, *S*₅-, *S*₆-, *S*₇- és *S*_C-allélok intronhosszait (10. ábra) is leírták (Vilanova és mts., 2005).



10. ábra. Az *S*-RN-áz gén 1. és 2. intonjainak hossza (bp) 8 allél esetében (*S*₁-*S*₇, *S*_C). Az üres téglalapok az exonokat, a vonalak az intronokat jelölik (Vilanova és mts., 2005).

Az *SFB*₁, *SFB*₂ és *SFB*₄ allélok szintén nagymértékű polimorfizmust mutatnak, aminosav-sorrendjük 79,4 %-ban azonos, az eddig leírt *Prunus* fajok *SFB*-szekvenciáival összehasonlítva a homológia 67-83 % volt. Az *S*₂- és *S*₁-haplotípusban az *SFB*₂ és az *S*₂-RN-áz egymástól pontosan 2,9 kbp távolságra, az *SFB*₁ és az *S*₁-RN-áz legfeljebb 49 kbp távolságra helyezkedik el, az *S*₄-haplotípusban még nem sikerült megállapítani a két gén pontos pozícióját (Romero és mts., 2004). Az *S*₁-RN-ázban a TATA-box a -74 és -79 régióban található. Érdekes módon, egy, a transzlációs startkodontól elég messze (-1667 és

-1851 között) lévő régió 91 %-ban azonosnak bizonyult a *Prunus dulcis* S_C -alléljával. A régióban sok repetitív, mikroszatellit és palindrom szekvencia található. Az S_2 -RN-áz és az SFB_2 transzkripciós orientációja azonos, ellentétben a japánkajsziban, mandulában és cseresznyében megfigyelt inverz orientációval (Ushijima és mts., 2003; Entani és mts., 2003; Yamane és mts., 2003b). Szövetspecifikus expressziós vizsgálattal bizonyították, hogy az S -RN-áz gén csak a bibében, az SFB pedig csak a pollenben fejeződik ki, semmilyen más szövetben nem (Romero és mts., 2004).

Vilanova és mts. (2006) a 'Currot' ($S_C S_C$) fajtából izolálták és klónozták az S_C -RN-ázt és az SFB_C -allélt. Egy 358 bp hosszúságú inszerciót azonosítottak az SFB_C nyílt leolvasási keretében, melynek határoló szakaszai, a kb. 52 bp inverz ismétlődésű szekvenciák, hasonlóak a transzpozonok ITR (fordított terminális ismétlődés) szakaszaihoz. Az inszercióban található stop kodon miatt a transzlálódó fehérjéből legalább 75 aminosav hiányzik, köztük a két hipervariábilis régió is (HVa és HVb). Mivel az S_C -RN-áz enzimaktivitása sértetlen, feltehetően ez a pollenkomponensben bekövetkezett mutáció okozza az öntermékenyülést. A 'Goldrich' ($S_1 S_2$) \times 'Canino' ($S_C S_2$) keresztezésből származó populációban négy genotípus fordult elő ($S_1 S_C$; $S_1 S_2$; $S_2 S_2$; $S_2 S_C$) a várt kettő helyett ($S_1 S_C$; $S_2 S_C$). Mindegyik hibrid bizonyítottan öntermékenyülő volt. Ezek szerint a 'Canino' fajtából származó S_2 -haplotípust hordozó pollenek szintén képesek áttörni az inkompatibilitási gátat, holott az SFB_2 -ben semmilyen mutáció nyoma nem mutatható ki. Ebben az esetben feltehetően egy S -lókuszról független régióban bekövetkezett mutáció hatására vesztette el aktivitását a pollenkomponens, melynek biológiai funkciója jelenleg nem ismert.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

A vizsgált fajták és hibridek a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszék szigetcsépi ültetvényéből, az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet tordasi génbankjából, a Mendel Egyetem (Csehország) lednicei ültetvényéből, a Ceglédi Gyümölcsstermesztési Kutató-Fejlesztő Intézet génbankjából, a Kecskeméti Főiskola gyümölcsültetvényéből, illetve egy boldogkőváraljai ültetvényből származnak (3. táblázat).

4.2. Szabadföldi tesztkeresztezések

A mesterséges megporzási kísérleteket a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékének szigetcsépi gyümölcsültetvényében végeztük 2005 és 2006 során.

4.2.1. Öntermékenyülés-vizsgálat

A nem ismert vagy vitatott termékenyülésű kajszifajták szabadföldi gyümölcskötődés-vizsgálatát geitonogám megporzással értékeltük. A polleneket rózsaszínbimbós állapotú virágokból kipergetve szobahőmérsékleten kiszárítottuk, majd a megporzandó fajtákat fehérbimbós állapotban csipesszel kasztráltuk, a már kinyílt virágokat eltávolítottuk a kijelölt ágakról. Ezután a bibéket a saját fajtáról származó virágporral beporoztuk. A megporzott bibéket minden esetben megszámláltuk. Izolátor pergamenzacskót nem használtunk, mert a rovarporozta fák esetében a szirmaitól megfosztott virágokat nem látogatják a rovarok. A kötődött gyümölcsök arányát hetente ellenőriztük, véglegesen a 8. héten, illetve az adott fajta teljes érési idejében számoltuk meg.

A vizsgált fajták és hibridek: 'Krimszkij Medunec', 'Morden 604', 'Korai piros', 'Harmat', 'Korai zamatos' és 'NJA-8'.

3. táblázat. A dolgozatban vizsgált fajták és hibridek származása, a mintagyűjtés helyszíne, a fajták pedigéje és termékenyülési fenotípusa

	Genotípus	Származás	Génbank	Pedigré	Termékenyülés
1)	Auróra	USA	Sz.	RR17-62 × NJA-13	Önmeddő
2)	Ananasznij cjurpinszkij	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
3)	Andornaktályai magyarkajszai	Mo.	T.	Magyarkajszai tájszelekciója	Öntermékenyülő
4)	Antonio Errani	Ol.	B.	Reole d'Imola szabadmegporzású magonca	?
5)	Bayoto	USA	L.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
6)	Beixan Heda Huang	K.	L.	Ismeretlen	?
7)	Beliana	Mar.	L.	Canino × Hamidi	Öntermékenyülő
8)	Bergeron	Fro.	T.	Véletlen magonc (1920)	Öntermékenyülő
9)	B Liaoning	K.	L.	Ismeretlen	?
10)	Borsi-féle kései rózsá	Mo.	T.	Ismeretlen, Kecskemét	Öntermékenyülő
11)	Budapest	Mo.	Sz.	Nancy × (Acme, Magyarkajszai, Kései rózsá)	Öntermékenyülő
12)	Csacsanszko zlato	Szb.	T.	Magyarkajszai tájszelekciója	Öntermékenyülő
13)	Ceglédi arany	Mo.	Sz.	Rózsabarack C. 1668 × Ceglédi óriás	Öntermékenyülő
14)	Ceglédi bíborkajszai	Mo.	Sz.	Véletlen magonc	Öntermékenyülő
15)	Ceglédi kedves	Mo.	T.	Ceglédi óriás szabadbeporzású magonca	Öntermékenyülő
16)	Ceglédi óriás	Mo.	T.	Tájszelekció, Izsák (1953)	Önmeddő
17)	Ceglédi Piroska	Mo.	Sz.	Ceglédi óriás × Magyarkajszai C. 1789	Önmeddő
18)	Chuang Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
19)	CLR 8	K.	L.	Ismeretlen	?
20)	Crvena ungarska	Mac.	T.	Magyarkajszai szelektált klónja	Öntermékenyülő
21)	Da Bai Xing	K.	L.	Ismeretlen	?
22)	Da Sie Xing	K.	L.	Ismeretlen	?
23)	Darunek malahojeva	Ukr.	T.	Ismeretlen	?
24)	Effekt	Ukr.	Sz.	Krupnolodnij szabadbeporzású magonca	?
25)	Goldrich	USA	Sz.	Sunglo × Perfection	Önmeddő
26)	Gönci magyarkajszai	Mo.	T.	Magyarkajszai szelektált klónja	Öntermékenyülő

Genotípus		Származás	Génbank	Pedigré	Termékenyülés
27)	Harcot	Kan.	T.	(Geneva × Narmata) × Morden 604 × NJA1 (Perfection × Phelps) (1977)	Önmeddő
28)	Hargrand	Kan.	T.	NJA1 (Perfection × Phelps) × V51092 (1981)	Önmeddő
29)	Harmat	Mo.	Sz.	Salah szabadbeporzású magonca	?
30)	In Bei Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
31)	Juan Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
32)	Kecs-psár	Üzb.	Sz.	Helyi fajta	?
33)	Konzervnij Pozdnij	Ukr.	Sz.	Véleltlen magonc	Öntermékenyülő
34)	Korai piros	Mo.	Sz.	Ismeretlen eredetű tájfajta	?
35)	Korai zamatos	Mo.	Sz.	Jubilar szabadbeporzású magonca	?
36)	Kâszna ungarska	Bul.	T.	Magyarkajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
37)	Krimszkij Amur	Ukr.	T.	Mulla sadik × Udarnik	?
38)	Krimszkij Medunec	Ukr.	Sz.	Stepniak (Oranshevo kraszniy × Krasnoscekiy) × Salah	Önmeddő
39)	LE-3276	K.	L.	Ismeretlen	?
40)	Liaoning B	K.	L.	Ismeretlen	?
41)	Ligeti óriás	Mo.	T.	Tájszelekció, Dózsamajor (1959)	Önmeddő
42)	Magyar kajsz C. 235	Mo.	T.	Magyarkajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
43)	Mamaia	Rom.	Sz.	(Ananas × Ananas) × (Tarzii de Bukuresti × Ananas)	Öntermékenyülő
44)	Mandulakajszi	Mo.	T.	Ismeretlen (1954)	?
45)	Marculesti 5/5 (szin. Callatis)	Rom.	Sz.	(Tarzii de Bukuresti × Ananas) × (Luizet × Umberto)	?
46)	Mari de Cenad	Rom.	Sz.	Ismeretlen eredetű helyi fajta	Öntermékenyülő
47)	Mai Che Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
48)	Modesto	USA	Sz.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
49)	Morden 604	Kan.	Sz.	<i>P. mandshurica</i> (Scout × McClure)	?
50)	Nagygyümölcsű magyarkajszi	Mo.	T.	Magyarkajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
51)	Ninfa	Ol.	B.	Ouaroy × Tyrinthos	?

Genotípus	Származás	Génbank	Pedigré	Termékenyülés
52) Nyikitszkij	Ukr.	Sz.	Krasznoscsojij szelektált klónja	Öntermékenyülő
53) NJA-8	USA	Sz.	Ismeretlen	?
54) Nyujtó Ferenc emléke	Mo.	C.	Kései rózsza C.320 × Ceglédi bíborkajszi	Öntermékenyülő
55) Paksi magyarkajszi	Mo.	T.	Magyarkajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
56) Pannónia	Mo.	Sz.	Magyarkajszi × Borsi-féle kései rózsza	Öntermékenyülő
57) Pasinok	Ukr.	Sz.	Vinoslivij × Salah	?
58) Pisana	Ol.	Sz.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
59) Priboto	Fro.	L.	Goldrich mutációja	Önmeddő
60) Rakovszky	Mo.	T.	Véletlen magonc, Kocsóc	Öntermékenyülő
61) Roxana	Afg.	Kecs.	Ismeretlen	?
62) Rózsakajszi C.1406	Mo.	T.	Tájszelekció, Nagykőrös	Öntermékenyülő
63) Sha Jin Hong	K.	L.	Ismeretlen	?
64) Sirena	Rom.	Sz.	(Ananas × Ananas) × (Luizet × Umberto)	Öntermékenyülő
65) S Liaoning	K.	L.	Ismeretlen	?
66) Sulmona	Rom.	Sz.	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)	?
67) Sunglo	USA	L.	Ismeretlen (1942)	Önmeddő
68) Toyuda	USA	L.	Goldrich leszármazottja	Öntermékenyülő
69) T-8	Mo.	Sz.	Salah szabadmegporzású magonca	?
70) Yang Ji Yuang	K.	L.	Ismeretlen	?
71) Venus	Rom.	Sz.	(Umberto × Ananas) × (Luizet × Umberto)	?
72) Voszki	Ukr.	Sz.	Satani szabadbeporzású magonca	?
73) Zaposzdojje	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	?
74) Zard	Üzb.	Sz.	Zardalju szabad megporzású magonca, VIR intézet	?

Afg.: Afganisztán; **Bul.:** Bulgária; **Fro.:** Franciaország; **Kan.:** Kanada; **K.:** Kína; **Mac.:** Macedónia; **Mar.:** Marokkó; **Mo.:** Magyarország; **Ol.:** Olaszország; **Rom.:** Románia; **Szb.:** Szerbia; **USA:** Amerikai Egyesült Államok; **Ukr.:** Ukrajna; **Üzb.:** Üzbegisztán
B.: Boldogkőváralja; **C.:** Cegléd; **Kecs.:** Kecskemét; **L.:** Lednice; **Sz.:** Szigetcsép; **T.:** Tordas

4.2.2. Kompatibilitási vizsgálat

A NEpHGE és PCR-technikákkal kapott eredmények igazolására irányított keresztezést végeztünk néhány fajtakombináció esetében (4. táblázat). A keresztezések előkészítését a 4.2.1. pontban ismertetett öntermékenyülés-vizsgálatnál leírt módon végeztük. Az eltérő virágzási idők miatt, több esetben a pollen kinyeréséhez a zárt bimbós állapotú ágakat vízbe állítva egy napig szobahőmérsékleten hajtottuk. A beporzott virágokat megszámloltuk, az ágakat a 6. héten hálóval izoláltuk, a gyümölcskötődési arányokat és a fejlődő gyümölcsök méretét a megporzást követő 13., 21., 28., 34., 48. és 64. napon ellenőriztük. Az utódpopulációk jellemzéséhez a gyümölcsöket teljes érési állapotban megszámloltuk, majd leszedtük. A megtisztított csontárokat perlitben 90 napig 4 °C-on tároltuk. Csírázást követően cserepekbe ültettük a magoncokat, és az első lomblevelekből DNS-kivonást végeztünk (lásd 4.5.1. fejezet).

4. táblázat. Fajtakombinációk a kompatibilitási vizsgálatokhoz

	♀	♂
1.	Ceglédi óriás	Ceglédi arany
2.	Ceglédi arany	Ceglédi óriás
3.	Gönci magyarkajszi	Ceglédi óriás
4.	Korai piros	Ceglédi óriás
5.	Ceglédi arany	Korai piros
6.	Konzervnij Pozdnij	Bergeron
7.	Bergeron	Konzervnij Pozdnij

4.3. Pollentömlő növekedésének vizsgálata

A pollentömlők növekedésének UV-fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatát Martin (1959) módosított módszerével végeztük, melyet Hauck és mts. (2002) meggyre, illetve Ortega és mts. (2002) mandulára adaptáltak. A pollent a virágok felnyílását követően összegyűjtöttük, majd 24 órán keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk. A vizsgálathoz a termőket a következő módon készítettük elő: a virágbimbókat tartalmazó ágakat a virágok kinyílását megelőzően a laboratóriumba szállítottuk, majd megfosztottuk szirmaiktól és porzóiktól (kasztrálás). A begyűjtött pollenmintákkal elvégeztük a megporzást a kasztrálást követő 24 óra elteltével, amikor a magház termékenyülési képessége a legnagyobb. A megporzást követő 72 óra elteltével a termőket az ágról eltávolítva fixáló oldatba (kloroform, 95 %-os etanol, jégcet 1:3:1 térfogatarányú keveréke) helyeztük 24 órára, majd 96 %-os etanolban 4 °C-on tároltuk. A termőket ezt követően csapvízben alaposan átmostuk, majd a szövetek fellazítása érdekében egyik esetben 5-6 órán át 10 M NaOH-oldatban áztattuk (Hauck és mts., 2002), illetve 30 percen át autoklávban 1 kg · cm⁻² nyomáson 5 %-os Na-szulfid oldatban inkubáltuk (Ortega és mts., 2002). Az utóbbi

módszer során a bibeszálak fellazult, szőrös epidermiszét csipesszel és tűkkel, nagyon óvatosan eltávolítottuk. A pollentömlők fluoreszcens festéséhez a mintákat 0,1 %-os anilinkék- és 33 mM K₃PO₄-oldatban áztattuk 1 órán át. A pollentömlők növekedését UV-fluoreszcens adapterrel felszerelt mikroszkóp (Olympus BH2) alatt vizsgáltuk, fényforrásként Osram HBO 100 W/2 higanygőzlámpát használtunk. A metszetek készítése során a bibeszálat a magházzal együtt egy csepp glicerinnel tárgylemezre helyeztük, majd a fedőlemezzel szétnyomtuk, ún. quash-technikát alkalmazva. A vizsgálatot öntermékenyített 'Ceglédi arany' és 'Ceglédi óriás' fajtákon, valamint a 'Gönci magyarkajszai' × 'Ceglédi óriás', 'Ceglédi óriás' × 'Ceglédi arany' és a reciprok 'Ceglédi arany' × 'Ceglédi óriás' kombinációkban végeztük el.

4.4. Az S-ribonukleáz izoenzimek vizsgálata

4.4.1. S-ribonukleáz-aktivitás vizsgálata agaróz diffúziós plate-en

Az S-RN-ázoknak a bibe fejlettségi állapotával összefüggő aktivitásváltozását 19 cm átmérőjű Petri-csészékben vizsgáltuk Roiz és Shoseyov (1995) módosított módszerével. A Petri-csészébe 100 mM nátrium-acetátot (pH 5,8), 1 % agarózt és 0,1 % *Torula* élesztő RNS-t tartalmazó oldatból gélt készítettünk. A különböző fejlődési stádiumban lévő virágokból kiemeltük a bibeszálat, majd a gél felületére helyezve 2 órán át 37 °C-on inkubáltuk azokat. A bibék eltávolítását követően a géllapokat 0,5 %-os ecetsavban oldott 0,02 % toluidinkék oldattal festettük meg. Az RN-áz aktivitás mértékét a kék színű háttéren megjelenő akromatikus udvarok mutatják (Broothaerts és mts., 1995).

4.4.2. A ribonukleáz-aktivitás spektrofotometriás meghatározása

Kb. 50 bibeszálat gyűjtöttünk be 48 órával a portokok felnyílása (antézis) előtt, illetve az antézis 1. napján. Dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben eldörzsöltük, majd hűtött kivonópufferben (100 mM nátrium-acetát pH 5,8, 100 µM fenilmetán-szulfonil-fluorid, 1 % (v/v) 2-merkaptoetanol, 100 mM KCl) homogenizáltuk a mintákat. A homogenizátumokat Mikro 22 R centrifugában (Hettich Zentrifugen) üleptettük (2 °C, 25 min, 18750 g). A mérésekhez a felülúszót használtuk. Az RN-áz aktivitás kvantitatív spektrofotometriás vizsgálatát 260 nm-en a Cuatrecasas és mts. (1967) által kidolgozott módszer alapján végeztük kisebb módosításokkal, Nicolet Evolution 300 BB spektrofotométerrel (Thermo Electron Corporation) a BCE Alkalmazott Kémia Tanszékén. Az enzimreakciót a szövetkivonattal indítottuk, az abszorbanciát 1 percen át 10 másodpercenként mértük. A reakcióelegy 100 mM nátrium-acetátot (pH 5,8), 25 µg/ml *Torula* élesztő RNS-t, 1mM dithiothreitol és 100 mM kálium-kloridot tartalmazott. A

fehérjemennyiséget Bradford (1976) módszere alapján határoztuk meg marhaszérum albumin kalibráció alapján.

4.4.3. Minta-előkészítés az izoelektromos fókuszáláshoz

A portokok felnyílását közvetlenül megelőzően mintegy 40, pollentől mentes bibeszálát gyűjtöttünk fajtánként. A kivonatok elkészítését a cseresznyére kidolgozott módszer alapján végeztük. A 40 bibeszálát folyékony nitrogénben és 1 ml izoláló pufferben homogenizáltuk. Az izoláló puffer összetétele: 30 % dimetil-szulfoxid, 10 % szacharóz, 0,1 % Na-metabiszulfid, 0,2 % Pharmalyte pH 3–10 (Fluka) és 0,5 % 10 %-os Triton X-100-oldat (Bošković és Tobutt, 1996). Az ülepítés Hettich Zentrifugen Micro 22 R centrifugában történt (−4 °C, 35 perc, 18750 g). A felülúszót −80 °C-on tároltuk. Valamennyi vizsgált fajtából készítettünk levélkivonatokat is, a levél mintatömeg és az izoláló puffer térfogatának aránya 1:6 volt.

4.4.4. Izoelektromos fókuszálás (IEF) és nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE)

A kivonatokat vertikális gélen futtattuk, amely 7,5 % poliakrilamidot, 10 % szacharózt és különféle hordozó amfolinokat tartalmazott az elválasztási paramétereknek megfelelően. Az első gél Burgos és mts. (1998) módszere alapján készült, 4 % Pharmalyte pH 5–8 (Fluka) hozzáadásával. Később, az elválasztás hatékonyságának növelése érdekében a 4 % Pharmalyte pH 5–8 és 1,2 % Ampholine pH 7–9 (Sigma) kombinációt használtuk. A 30 perces prefókuszálást (100 V) követően 40 µl kivonatot vittünk fel mintánként a gél anód felé eső oldalán, a fókuszálás az alábbiak szerint történt: 1 óra 130 V, 2 óra 260 V, 1 óra 350 V, 1 óra 400 V (NEpHGE I); illetve további 30 perc 450 V (NEpHGE II). A NEpHGE III-protokoll a 4 % Pharmalyte pH 3–10 és 1,2 % Ampholine pH 7–9 tartalmú gélek és a fentiekben részletezett NEpHGE II futási paraméterek ötvözetét jelenti. Az anódoldat 0,04 M DL-glutaminsav, a katódoldat 0,1 M nátrium-hidroxid volt. A gél a futtatás során végig 4 °C-on tartottuk.

Az izoelektromos fókuszálást 4 % Pharmalyte pH 3–10 amfolint tartalmazó gélekkel végeztük az alábbi program szerint: 1 óra 150 V, 1 óra 300 V, 2 óra 450 V és 2 óra 550 V. Az izoelektromos pont meghatározásához pI 5,9–9,3 tartományú pI-markerkitet (Sigma) használtunk. A markerfehérjéket Coomassie Brilliant Blue R 250 festékkel tettük láthatóvá.

4.4.5. S-ribonukleáz izoenzimek kimutatása specifikus festéssel

A ribonukleázok aktivitásának detektálásához Wilson (1971) módszerét használtuk Bošković és Tobutt (1996) módosításainak megfelelően. A géleket 10 percig 37 °C-on preinkubációs pufferben (0,1 M Na-acetát pH 5,8, 0,1 M KCl) ráztuk, majd 30 percen át 0,1 % *Torula* élesztő RNS-sel kiegészített, az előbbivel azonos összetételű pufferben inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően a géleket az RNS-t nem tartalmazó, preinkubációs pufferben inkubáltuk 10 percen át, szintén 37 °C-on. A géleket a fixálást (3 perc, 7 % ecetsav) követően 0,5 % ecetsavoldatban oldott 0,2 %-os toluidinkékkel festettük, majd az RN-áz aktivitást reprezentáló akromatikus foltok megjelenéséig csapvízben több alkalommal átmostuk.

4.5. DNS-alapú vizsgálatok

4.5.1. DNS-kivonás

A genomi DNS-t fiatal levelekből a DNeasy Plant Mini Kittel vontuk ki (Qiagen). A DNS-koncentrációt GeneQuant II RNA/DNA spektrofotométerrel mértük (Pharmacia Biotech).

4.5.2. S-PCR-analízis

4.5.2.1. Az S-RN-áz gén PCR-vizsgálata

Az S-RN-áz allélok amplifikációjához használt konszenzus primerek szekvenciáit a 5. táblázat mutatja. A PaConsI-F, PaConsI-R, SRc-F (fluoreszcens jelölés: JOE) és SRc-R, EM-PC1consRD az első intronrégió amplifikációjához (Sonneveld és mts., 2003; Romero és mts., 2004; Ortega és mts., 2005), míg a PaConsII-F, PaConsII-R, valamint az EM-PC2consFD és EM-PC3consRD primerpárt a második intronrégió felszaporításához (Sonneveld és mts., 2003; Sutherland és mts., 2004a) használtuk. A PCR-hez kb. 20-80 ng DNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban. Az 1 × PCR puffer (Sigma) végső koncentrációja 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl és 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM az adott primerekből és 0,625 U *Taq* DNS-polimeráz (Sigma). A PCR-t PTC 200 (MJ Research) típusú készülékben végeztük a primerekhez közölt, eltérő protokollok alapján. A PCR-termékeket 2 %-os TAE agaróz gélben választottuk szét (2 h 100 V) és etidium-bromidos festéssel, UV-fénnyel átvilágítva tettük láthatóvá. Az 500 bp-nál nagyobb fragmentumok méretének megállapításához 1-kb + DNS-markert (Promega) használtunk.

4.5.2.2. Az F-box gén PCR-vizsgálata

Az F-box gén kódoló szakaszainak amplifikálásához konszenzus primereket terveztünk: AprSFB-F1, AprSFB-F2 és AprSFB-R (5. táblázat) a *P. armeniaca* SFB₁ (AY587563), SFB₂ (AY587562) és SFB₄ (AY587565) (Romero és mts., 2004) és *P. mume* SFB₁ (AB101440), SFB₇ (AB101441) (Yamane és mts., 2003d), illetve SLF₉ (AB092645) (Entani és mts., 2003) ismert, konzervatív szekvenciák alapján. A PCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklus a következő lépésekből állt: 94 °C 2 min, 35 ciklus során 94 °C 30 s, 50 °C 1,5 min és 72 °C 2 min, majd 72 °C 5 min. A PCR-reakcióelegy összetétele, illetve a gélelektroforézis mindegyik amplifikáció során azonos volt az *S*-RN-áznál ismertetett adatokkal.

5. táblázat. A PCR során felhasznált primerek nukleotidsorrendje

primer	szekvencia 5'–3' ^a	forrás
PaConsI-F	MCT TGT TCT TGS TTT YGC TTT CTTC	Sonneveld és mts., 2003
PaConsI-R	CAT GRA TGG TGA ART WTT GTA ATG G	Sonneveld és mts., 2003
PaConsII-F	GGC CAA GTA ATT ATT CAA ACC	Sonneveld és mts., 2003
PaConsII-R	CAW AAC AAA RTA CCA CTT CAT GTA AC	Sonneveld és mts., 2003
EM-PC1consRD	GCC AYT GTT GMA CAA AYT GAA	Ortega és mts., 2005
EM-PC2consFD	TCA CMA TYC ATG GCC TAT GG	Sutherland és mts., 2004a
EM-PC3consRD	AWS TRC CRT GYT TGT TCC ATT C	Sutherland és mts., 2004a
EM-PC5consRD	CAA AAT ACC ACT TCA TGT AAC ARC	Sutherland és mts., 2004a
SRc-F	_{JOE} -CTC GCT TTC CTT GTT CTT GC	Romero és mts., 2004
SRc-R	GGC CAT TGT TGC ACA AAT TG	Vilanova és mts., 2005
AprSFB-F1	AAG AAW GAR AYY TTR RTC GAC AT	Saját tervezésű
AprSFB-F2	TCY CTY RTT CGR TTT MTK TG	Saját tervezésű
AprSFB-R	ATY GAG WAA AAC CAW RCT YTC	Saját tervezésű

^aM=A+C, S=C+G, Y=C+T, R=A+G, W=A+T, _{JOE}=fluoreszcens festék

4.5.3. RT-PCR

A össz-RNS kivonását 40–50 érett bibeszálból E.Z.N.A. Plant RNA kittel végeztük, a kivonatokat 1%-os TBE agarózgéllel ellenőriztük. A cDNS-szintézishez 0,1–5 µg össz-RNS-t használtunk 20 µl végtérfogatban, a reakcióelegy a következő komponensekből állt: 0,5 µg Oligo(dT)₁₈ primer, 5x puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 20 U RiboLock ribonukleáz inhibitor, 0,1 mM dNTP-mix, 40 U M-MuLV reverz transzkriptáz, DEPC-vízzel kiegészítve (Fermentas). A reverz transzkriptáz hozzáadása előtt az elegyet 65 °C-on 10 percig inkubáltuk, majd 2 percig jégen hűtöttük, a reverz transzkripció 42 °C-on 1 óráig tartott, végül 70 °C-on 10 percig inkubáltuk, és közvetlenül PCR-hez használtuk vagy a cDNS-t –20 °C-on tároltuk. A PCR során a cDNS-ből az SRc-F és az EM-PC5consRD primerekkel amplifikáltunk egy megközelítőleg 600 bp hosszú fragmentumot az alábbi PCR-programon: 94 °C 2 min, 35 cikluson keresztül

94 °C 10 s, 55 °C 2 min és 72 °C 1 min, végül 72 °C 10 min. A gélelektroforézis 1 % TAE agarózgélben történt a korábban említett körülmények között.

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

Az *S*-RN-áz első intronrégiót tartalmazó PCR-fragmentumok méretének meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) automata DNS-szekvenátorral történt, amihez az 5' végen fluoreszcensen jelölt forward primereket használtunk a PCR során. A kapott adatokat a Genotyper programmal (Applied Biosystem) elemeztük.

Az *S*-RN-áz második intronrégió és a kódoló F-box szakaszok PCR-fragmentumait, illetve az RT-PCR során nyert cDNS-szakaszok tisztítását 1 %-os agaróz gélből QIAquick Gel Extraction Kittal (Qiagen) végeztük. A PCR-termékek 3' végén extra adenin van, ezért klónozásuk általában olyan plazmiddal történik, melynek 3' végén extra timin található. Vizsgálatainkhoz a pGEM-T Easy Vector Systemet (Promega) használtuk. A ligálás egy éjszakán át 4 °C-on 10 µl végtérfogatban történt: 20–50 ng kitisztított 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), desztillált vízzel kiegészítve.

A klónozott fragmentumokkal JM109 kompetens sejteket transzformáltunk. A teljes ligációs elegyet 80 µl –70 °C-on tárolt kompetens baktériumszuszpenzióval finoman összeráztuk, majd 20 percen át jégen tartottuk, azután 45 másodpercig 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük 2 percig. Végül 950 µl 37 °C-os folyékony, antibiotikummentes LB táptalajt adtunk hozzá, és másfél óráig ráztuk 37 °C-on, 150 rpm fordulatszámmal. Ezután 100–400 µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk LB /ampicillin/IPTG/X-gal szilárd táptalajon: 10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 7 g/l agar, 100 µg/ml ampicillin pH=7; a plate felszínén 100 mM IPTG-t és 50 mg/ml X-galt oszlattunk szét, 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, minden plate-ről legalább 3 db különálló, nagyméretű, fehér színű telepet oltottunk le steril fogpiszkáló segítségével, melyet először egy masterplate-hez érintettünk, majd beletettük egy 2 ml folyékony LB táptalajt és 50 mg/ml ampicillint tartalmazó Falcon-csőbe. A csöveket jól lezárva egy éjszakán át 37 °C-on ráztuk 250 rpm fordulaton. A masterplate-en az eredeti telepeket szaporítottuk fel egy éjszakán át 37 °C-on.

A plazmidokat Rapid Plasmid DNA Daily Mini-prep kittel (V-gene) izoláltuk. Az inszertek ellenőrzését *EcoRI* restrikciós enzimmel (Fermentas) végeztük 37 °C-on 2 óras emésztéssel. Szekvenciájuk meghatározása szintén ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) 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 BLAST szoftverét (Altschul és mts., 1990) használtuk. Az illesztéseket a CLUSTAL W (Thompson és mts., 1994) és a Vector NTI 10.3.0 (Invitrogen) programokkal hoztuk létre. A filogenetikai és molekuláris evolúciós analíziseket a MEGA version 3.1 szoftver segítségével végeztük (Kumar és mts., 2004).

4.6. Statisztikai analízis

A ‘Konzervnij Pozdnij’ × ‘Bergeron’ utódnemzedéket jellemző *S*-genotípusok szegregációjának illeszkedését az elméletileg várható arányhoz khi-négyzet próbával vizsgáltuk. $P < 0,05$ szignifikancia szinten. A különböző *S*-genotípusú fajták összes ribonukleáz-aktivitásának eredményeit 3 ismétlés átlagából számítottuk. A szignifikanciavizsgálathoz egytényezős varianciaanalízist végeztünk ($P < 0,05$). A statisztikai próbákat a Microsoft Excel 2000 program használatával hajtottuk végre.

A filogenetikai fa megbízhatóságának becslésére a nukleotidszekvencia-pozíciók véletlenszerű ismétléses mintavételét és ezt követő faszerkesztést 1000-es ismétlésben alkalmazó bootstrap analízist végeztünk a MEGA 3.1 szoftverrel.

5. EREDMÉNYEK

5.1. *S*-genotípus meghatározása ribonukleáz izoenzimek kimutatásával

Az *S*-ribonukleáz izoenzimeket izoelektromos fókuszálással (IEF) és ún. nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálással (NEpHGE) választottuk szét poliakrilamid gélen, az egyes izoformákat specifikus festéssel tettük láthatóvá. A 24 ismeretlen *S*-genotípusú fajta mellett a már korábban leírt genotípusú fajták bibeszálaiból készült kivonatokat használtuk kontrollként: 'Hargrand' (S_1S_2), 'Goldrich' (S_1S_2) és 'Harcot' (S_1S_4). A levélkivonatok a vizsgált pH-tartományban nem mutattak RN-áz aktivitást.

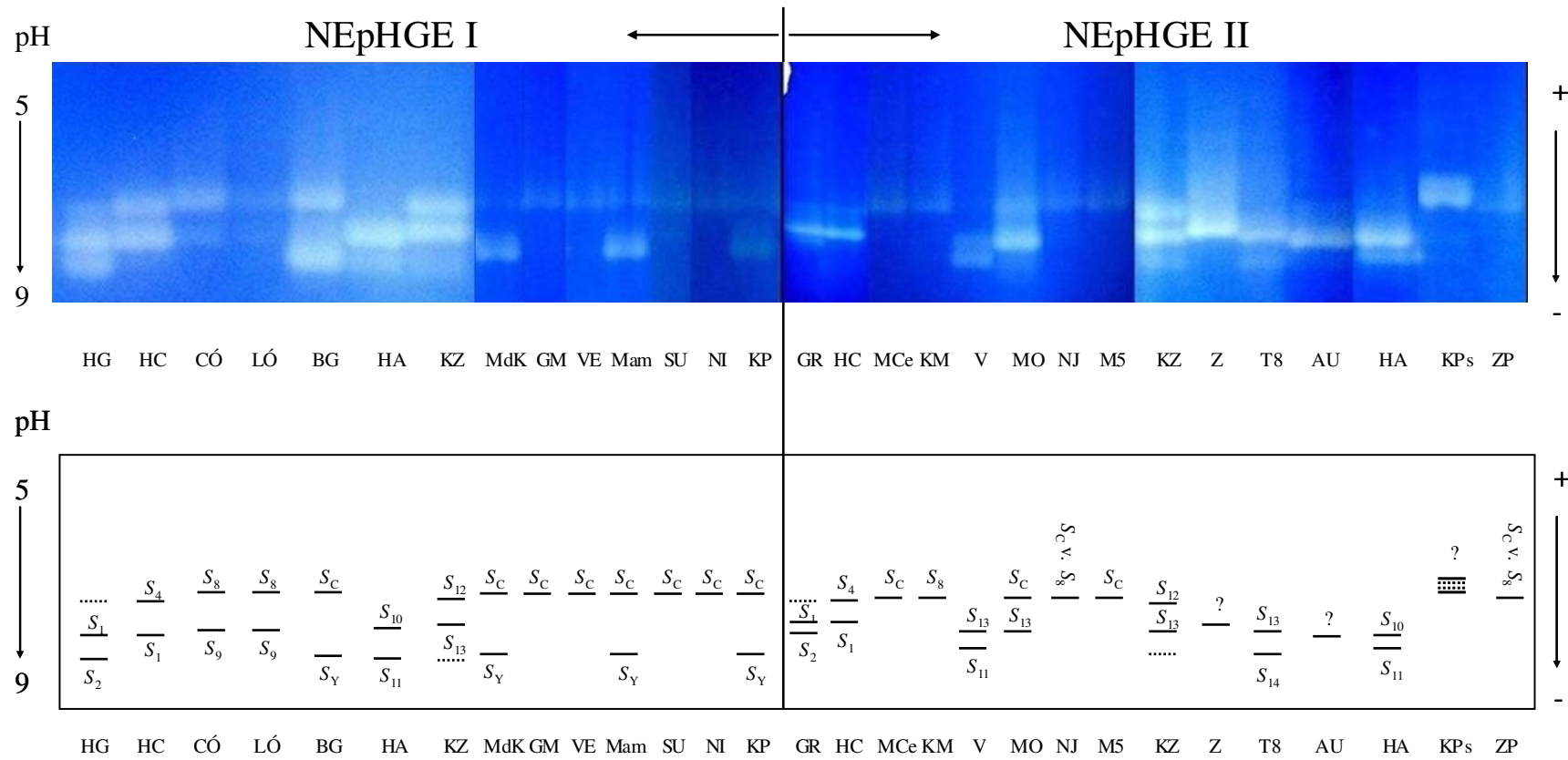
Az első gélek Burgos és mts. (1998) módszerét követve készültek 4 % Pharmalyte pH 5-8 használatával, de ezek nem eredményeztek megfelelő minőségű elválasztást. Ezt követően több Ampholine és Pharmalyte kombinációt próbáltunk ki, melyek közül a 4 % Pharmalyte pH 5-8 és az 1,2 % Ampholine pH 7-9 együttes használata eredményezte az izoenzimek legtökéletesebb szétválasztását. Az általunk kidolgozott NEpHGE I fókuszálási paraméterek között vizsgált 14 kajszifajta közül 8 fajta két különböző ribonukleáz izoenzimet mutatott, míg 4 fajta csak egyet (11. ábra). A NEpHGE II paraméterek hatására 15 fajtából 5 fajta kettő, 8 pedig csak egy izoenzimet mutatott. A 'Hargrand', 'Goldrich' és a 'Korai zamatos' fajták esetében 3 izoenzim volt kimutatható, jöllehet a harmadik sáv intenzitása mindkét fajtánál elmaradt a másik kettő sáv intenzitásától. Ezért ezeket nem *S*-specifikus izoenzimeknek tekintettük.

A korábban leírt *S*-RN-áz alléltermékeket az ismert genotípusú fajták zimogramja alapján azonosítottuk: az S_1S_4 genotípusú 'Harcot' és az S_1S_2 genotípusú 'Hargrand' (Burgos és mts., 1998) egy közös izoenzimet mutatott, amely valószínűleg a mindkét fajta által hordozott S_1 -allélnak felel meg. A 'Hargrand' S_2 -allélja a pH-gradiens gél lúgosabb tartományába, a 'Harcot' S_4 -allélja a kevésbé lúgos tartományba fókuszálódott. A korábban valamennyi öntermékenyülő fajtából kimutatott S_C -RN-áz izoenzimet (Burgos és mts., 1998) a szintén öntermékenyülő 'Bergeron' izoenzim-mintázata alapján tudtuk azonosítani.

A 'Ceglédi óriás' és 'Ligeti óriás' mintázata teljesen azonos volt. A kevésbé alkalikus pH-tartományban található izoenzim vándorlási pozíciója mind a NEpHGE I, mind a NEpHGE II fókuszálási körülmények között megegyezett az S_C -RN-áz pozíciójával. Mivel azonban mindkét fajta bizonyítottan önmeddő, ezt az allélt S_8 -ként jelöltük, folytatva az allélok azonosítására korábban leírt numerikus nómenklatúrát. Az S_8 -RN-áz enzim a 'Krimszkij Medunec' fajtában is kimutatható volt. Az Óriás fajtakörbe tartozó kajszifajták másik *S*-RN-áz izoenzimét a korábban leírtaktól teljesen különböző

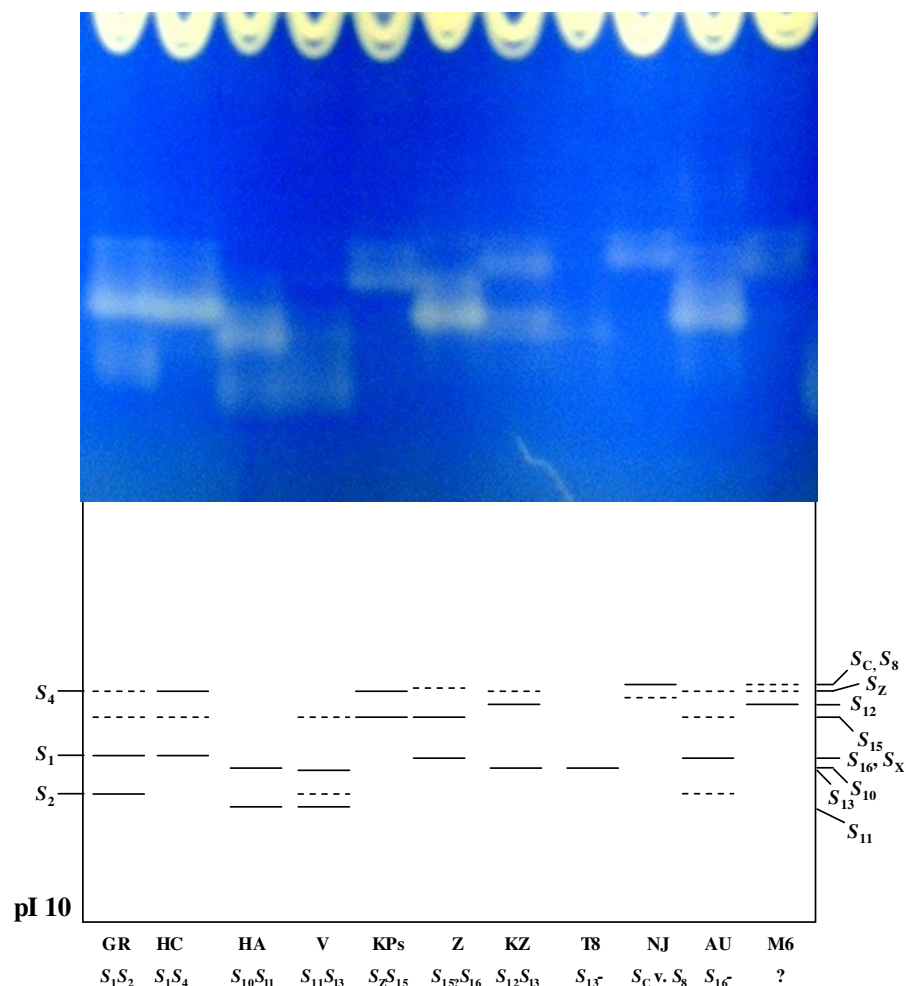
vándorlási pozíció jellemzi, ezért ezt S_9 -nek neveztük el. Az S_C -allél mellett a ‘Bergeron’, ‘Mandulakajsi’, ‘Mamaia’ és ‘Konzervnij Pozdnij’ fajták másik allélja is azonos, ez az S_2 -RN-ázhoz hasonló helyzetbe fókuszálódik, de azonosságuk igazolásához további vizsgálatok szükségesek, így ezt az allélt ideiglenesen S_Y -allélként jelöltük. Öt további öntermékenyülő fajtában mindössze egy izoenzimet (S_C) detektáltunk.

A NEpHGE-vizsgálat alapján a ‘Harmat’ és ‘Korai zamatos’ genotípusa $S_{10}S_{11}$, illetve $S_{12}S_{13}$ -nak határozható meg. Az S_4 és az S_{12} , illetve az S_{10} és az S_{13} vándorlási pozíciója csak kismértékben különbözött, de a fókuszálási paraméterek megváltoztatása (NEpHGE II, 11. ábra) alátámasztotta különbségüket. Igazoltuk, hogy az önmeddő ‘Voszki’ és az öntermékenyülő ‘Modesto’ is hordozza az S_{13} -allélt, és egy további allélt is kimutattunk a T-8 hibridben (S_{14}).



11. ábra. A bibeszálakban kifejeződő S-ribonukleáz izoenzimek NEpHGE I és II fókuszálási protokoll mellett kapott elektroforogramja és magyarázó diagramja. **HG:** ‘Hargrand’, **HC:** ‘Harcot’, **CÓ:** ‘Ceglédi óriás’, **LÓ:** ‘Ligeti óriás’, **BG:** ‘Bergeron’, **HA:** ‘Harmat’, **KZ:** ‘Korai zamatos’, **MdK:** ‘Mandulakajszai’, **GM:** ‘Gönci magyarkajszai’, **VE:** ‘Venus’, **Mam:** ‘Mamaia’, **SU:** ‘Sulmona’, **NI:** ‘Nyikitszkij’, **KP:** ‘Konzervnij Pozdnij’, **GR:** ‘Goldrich’, **MCe:** ‘Mari de Cenad’, **KM:** ‘Krimszkij Medunec’, **V:** ‘Voszki’, **MO:** ‘Modesto’, **NJ:** ‘NJA-8’, **M5:** ‘Marculesti 5/5’, **Z:** ‘Zard’, **T8:** T-8 hibrid, **AU:** ‘Auróra’, **KPs:** ‘Kecs-psár’, **ZP:** ‘Zaposzdojle’. A magyarázó ábrán az egyes inkompatibilitási allélokat reprezentáló izoenzimeket folytonos vonallal, míg a nem specifikus (a termékenyülési folyamatokhoz nem köthető) sávokat szaggatott vonallal jelöltük.

A 'Zard' és az 'Auróra' egyetlen, nagy intenzitású RN-áz sávot mutatott, míg a 'Kecs-psár' több, diffúz sávot. A futtatási paraméterek további módosításával (NEpHGE III) azonban a 'Kecs-psár' izoenzimei egyértelműen szétváltak, genotípusa $S_{15}S_Z$ (12. ábra). Az S_Z -RN-ázt az alkalmazott futtatási körülmények között az S_4 -hez hasonló migrációs tulajdonság jellemzi, de azonosságuk nem egyértelmű. Ugyanígy kétséges a szemre azonos pozícióban megjelenő 'Kecs-psár' S_{15} - és a 'Zard' S_{15} ?-RN-áz allélok azonossága. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a 'Zard' szintén hordoz egy korábban nem azonosított allélt, az S_{16} -ot. Az 'Auróra'-ban egyetlen, az S_1 -re illetve az S_{16} -ra hasonlító izoenzimsáv jelent meg, amit ideiglenesen S_X -nek neveztünk el. Az 'NJA-8' egyik izoenzime valószínűleg az S_C - vagy S_8 -RN-ázzal azonos, míg a 'Morden 604' elmosódott, halvány sávokat mutat, melyek azonosítása (S_4 , S_8 , S_C , S_{12} vagy S_Z ?) az alkalmazott körülmények között nem lehetséges.



12. ábra. A NEpHGE III fókuszálási paraméterekkel kapott S-ribonukleáz izoenzim-mintázat. **GR:** 'Goldrich', **HC:** 'Harcot', **HA:** 'Harmat', **V:** 'Voszki', **KPs:** 'Kecs-psár', **Z:** 'Zard', **KZ:** 'Korai zamatos', **T8:** T-8 hibrid, **NJ:** 'NJA-8', **AU:** 'Auróra', **M6:** 'Morden 604'.

Az újonnan leírt 9 *S*-allél, a pontosan nem azonosítható 3 és a korábban leírt 4 allél (Burgos és mts., 1998) által kódolt ribonukleázok izoelektromos pontjának (pI) meghatározása érdekében izoelektromos fókuszálást végeztünk. Az izoelektromos pontok pH 8,46 és 10,11 értékek között változtak (6. táblázat). Két pár allél esetében a pI értékek teljesen azonosak voltak: az *S*₄ és *S*₁₂ esetében pI=9,38; az *S*₁₃ és *S*_X esetében pI=9,98, de a különböző nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálási protokollok használatával ezek az izoenzimek is jól elkülöníthetők.

6. táblázat. A különböző allélok által kódolt *S*-ribonukleázok izoelektromos pontjai (pH)

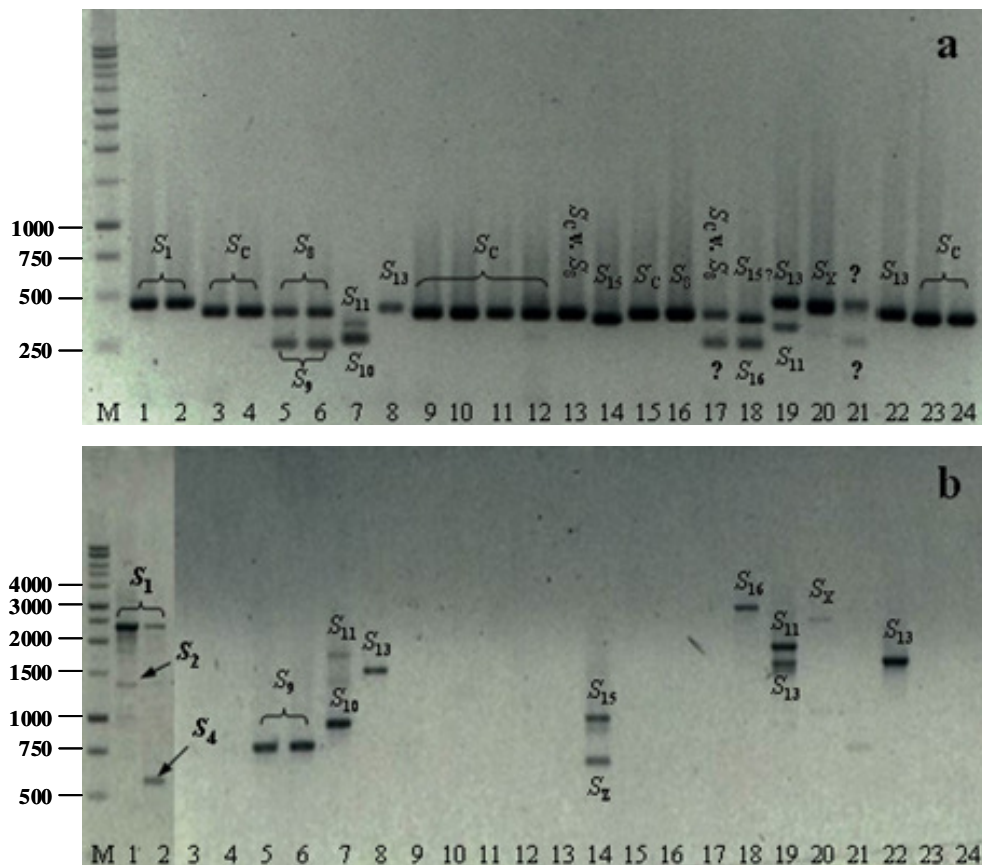
Allél	pI
<i>S</i> ₁	9,80
<i>S</i> ₂	10,06
<i>S</i> ₄	9,38
<i>S</i> _C	9,22
<i>S</i> _X	9,98
<i>S</i> _Y	10,06
<i>S</i> _Z	9,41

Allél	pI
<i>S</i> ₈	9,22
<i>S</i> ₉	9,91
<i>S</i> ₁₀	9,74
<i>S</i> ₁₁	10,11
<i>S</i> ₁₂	9,38
<i>S</i> ₁₃	9,98
<i>S</i> ₁₄	9,53
<i>S</i> ₁₅	8,46
<i>S</i> ₁₆	9,85

5.2. *S*-RN-áz gén alapú, DNS-szintű genotípus-meghatározás

A fehérjevizsgálatok eredményeinek alátámasztása és a kérdéses allélok azonosítása érdekében PCR-analízist végeztünk. Ennek elméleti lehetőségét az adja, hogy az *S*-ribonukleáz gén intronjainak mérete allélspecifikus variabilitást mutat, és az intronokat határoló konzervatív exonrégiókra primerek tervezhetők. Az *S*-genotípusok meghatározásának alapja, hogy a diploid fajták esetében PCR-rel felszaporított két különböző méretű fragmentum megfeleltethető egy-egy *S*-allélnak. Vizsgálataink kezdetekor a *Prunus* fajok közül csak cseresznye *S*-RN-áz génszekvenciák voltak ismertek, és az ezen génekre tervezett primerek voltak elérhetők. Ezért az első néhány kísérletben arra kerestünk választ, hogy a cseresznye *S*-RN-áz gén konzervatív régióira tervezett konszenzus primerek használhatók-e kajszifajták *S*-genotípusának vizsgálatára. A vizsgálatokban alkalmazott két primerpár (Sonneveld és mts., 2003) közül a PaConsI-F és PaConsI-R primerek az *S*-RN-áz gén szignálpeptid és C1 konzervatív régiójához kötődnek, és a gén 1. intronját amplifikálják. A második primerpár (PaConsII-F és PaConsII-R) a C2 és C5 régiókhoz kötődik, és használatával a gén hipervariábilis régiója, valamint az abba ékelődő 2. intron amplifikálható (13. a. és b. ábrák).

Az első intront felszaporító primerpár 260–460 bp méretű fragmentumokat eredményezett, míg a második intront közrefogó PaConsII-F és PaConsII-R primerek 550–2900 bp hosszú szakaszokat amplifikáltak.



13. ábra. Kajszi fajták PCR-analízise cseresznye *S*-RN-áz gén 1. (a) és 2. intronjára (b) tervezett konszenzus primerekkel. M: 1-kb + DNS-marker, 1. ‘Hargrand’, 2. ‘Harcot’, 3. ‘Bergeron’, 4. ‘Gönci magyarkajszai’, 5. ‘Ceglédi óriás’, 6. ‘Ligeti óriás’, 7. ‘Harmat’, 8. ‘Korai zamatos’, 9. ‘Mandulakajszai’, 10. ‘Venus’, 11. ‘Mamaia’, 12. ‘Mari de Cenad’, 13. ‘NJA-8’, 14. ‘Kecs-psár’, 15. ‘Marculesti 5/5’, 16. ‘Krimszikij Medunec’, 17. ‘Zapozsdolje’, 18. ‘Zard’, 19. ‘Voszki’, 20. ‘Auróra’, 21. ‘Morden 604’, 22. ‘T-8’, 23. ‘Nyikitszkij’, 24. ‘Konzervnij Pozdnij’.

A korábban leírt *S*-genotípusú ‘Hargrand’ (S_1S_2) és ‘Harcot’ (S_1S_4) fajták csak egyetlen, azonos méretű fragmentumot mutattak az 1. intron amplifikációját követően, míg a 2. intron analízisekor a közös fragmentumon kívül mindkettőben megjelent egy-egy, egymástól eltérő hosszúságú szakasz. Ezek alapján a közös fragmentum megfeleltethető az S_1 -allélnak, míg a ‘Hargrand’ másik fragmentuma az S_2 -, a ‘Harcot’ másik fragmentuma az S_4 -allélnak. Az Óriás fajtakör tagjainak azonos DNS-mintázata tovább erősíti, hogy *S*-genotípusuk megegyezik. A PCR-analízis alapján biztossá vált, hogy az izoelektromos fókuszálást követően nagyon hasonlóan tűnő S_4 - és S_{12} -, illetve az S_{10} - és S_{13} -allélok

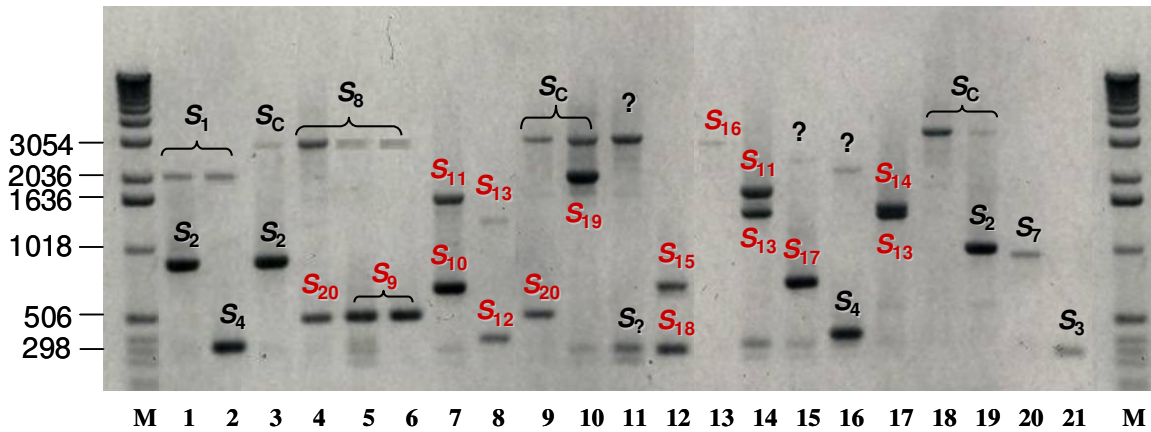
különbözőek, továbbá, hogy a 'Harmat' genotípusa $S_{10}S_{11}$ és a 'Korai zamatos'-é $S_{12}S_{13}$, megerősítve ezzel a NEpHGE-eredményeket.

Az összes öntermékenyülő fajtában ('Bergeron', 'Gönci magyarkajszi', 'Mandulakajszi', 'Venus', 'Mamaia', 'Mari de Cenad', 'Nyikitszkij' és 'Konzervnij Pozdnij') az 1. intron amplifikációja során egy közel 420 bp méretű fragmentumot kaptunk, míg a 2. intronnál semmilyen PCR-termék nem jelent meg. Ennek alapján feltételezhető, hogy az első intront tartalmazó közös fragmentum az S_C -allélt reprezentálja, továbbá, hogy a második intront tartalmazó fragmentum hiánya is valamennyi öntermékenyülő fajta esetében ehhez az allélhoz köthető. Az S_8 -allél 1. intronja a 'Ceglédi óriás', 'Ligeti óriás' és 'Krimszkij Medunec' fajtákban azonos fragmentumhosszal jellemezhető, mint az S_C , ráadásul a 2. intronrégió amplifikációja ez esetben is sikertelen volt.

Az ismeretlen termékenyülésű 'NJA-8' és a 'Zaposzdojje' szintén hordoz egy S_8 - vagy S_C -RN-ázt. Az első intron esetében a 'Zaposzdojje' és a 'Zard' hasonló méretű fragmentumot adott, mint a 'Harmat' S_{10} -allélja, mivel azonban e három fajta RN-áz izoenzimeit különbözőnek bizonyultak, valószínűleg nincs közös alléljuk. A T-8 hibridben mindkét intron amplifikációja során csak egyetlen allél, az S_{13} volt detektálható, amelyet a 'Korai zamatos' és 'Voszki' fajták is hordoztak.

Az első intront felszaporító primerpár termékeit a következő öt allél esetében klónoztuk, és meghatároztuk DNS-szekvenciájukat: S_C – 'Gönci magyarkajszi', 'Pannónia', 'Borsi-féle kései rózsza'; S_8 és S_9 – 'Ceglédi óriás'; S_{11} – 'Harmat'; S_{13} – 'Korai zamatos'. A szekvenciákat összevetettük az NCBI-adatbázissal, ami igazolta, hogy az általunk szekvenált fragmentumok az inkompatibilitási reakciókban résztvevő ribonukleázok nukleotidsorrendjével mutatják a legnagyobb mértékű homológiát.

Időközben Sutherland és mts. (2004a) egy új, a *Prunus* S-RN-áz gén 2. intronját felszaporító, degenerált PCR-primerpárt (EM-PC2consFD és EM-PC3consRD) publikáltak, amely a spanyol kutatók által leírt 8 kajszi S-allél (S_{1-7} ; S_C) mindegyikénél sikeres amplifikációt eredményezett. A primerpár alkalmazhatóságának tesztelésére tovább bővítettük az ismeretlen S-genotípusú, vizsgálandó fajták körét (14. ábra).

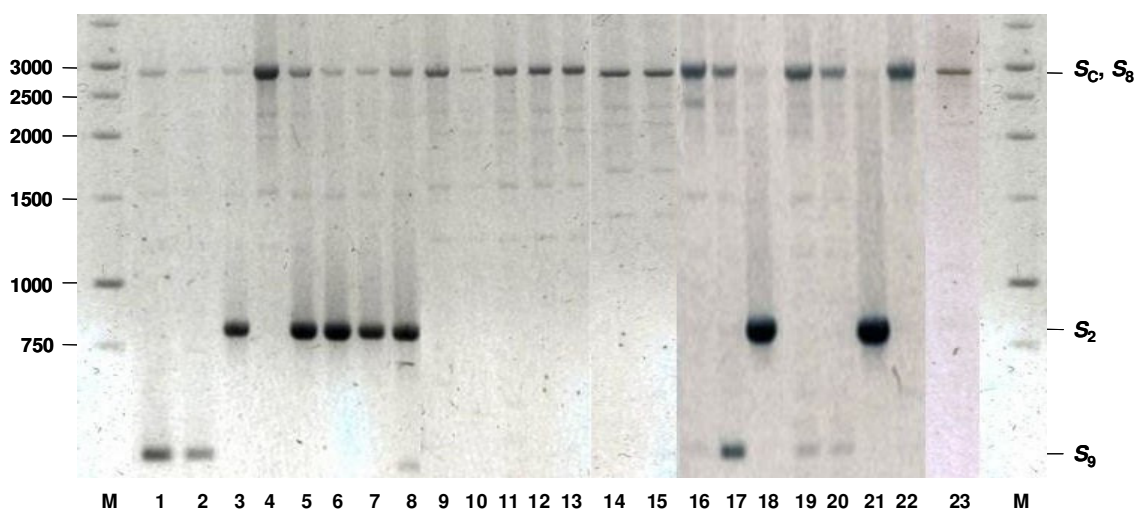


14. ábra. Kajszifajták EM jelű (EM-PC2consFD és EM-PC3consRD), a *Prunus* S-RN-áz gén második intronrégióját amplifikáló, konszenzus primerekkel végzett PCR-vizsgálatának eredménye, az újonnan azonosított allélok piros színnel jelölve. **M:** 1 kb DNS-marker, **1.** ‘Hargrand’, **2.** ‘Harcot’, **3.** ‘Bergeron’, **4.** ‘Ceglédi Piroska’, **5.** ‘Ceglédi óriás’, **6.** ‘Ligeti óriás’, **7.** ‘Harmat’, **8.** ‘Korai zamatos’, **9.** ‘Korai piros’, **10.** ‘Mari de Cenad’, **11.** ‘NJA-8’, **12.** ‘Kecs-psár’, **13.** ‘Zard’, **14.** ‘Voszki’, **15.** ‘Auróra’, **16.** ‘Morden 604’, **17.** ‘T-8 hibrid’, **18.** ‘Nyikitszkij’, **19.** ‘Toyuda’, **20.** ‘Beliana’, **21.** ‘Sunglo’.

Ezzel a primerpárral is kimutatható volt mindaz a 11 allél, amelyeket a cseresznye 2. intronjára tervezett primerekkel azonosítottunk: S_1 , S_2 , S_4 , S_9 , S_{10} , S_{11} , S_{13} , S_{15} , S_{16} , S_Z és S_X . Az előző PCR-vizsgálattal szemben e primerekkel valamennyi vizsgált öntermékenyülő fajtában (‘Bergeron’, ‘Korai piros’, ‘Mari de Cenad’, ‘Nyikitszkij’ és ‘Toyuda’) amplifikálni tudtunk egy kb. 2800 bp hosszúságú fragmentumot, ami az S_C -allélnak feleltethető meg. Ugyanekkora méretű fragmentumot kaptunk három bizonyítottan önmeddő fajta (‘Ceglédi Piroska’, ‘Ceglédi óriás’ és ‘Ligeti óriás’) S_8 -allélja esetében, továbbá az ismeretlen termékenyülésű ‘NJA-8’ hibridnél. Sikerült kimutatni a ‘Korai zamatos’-ban az S_{12} -allélt, illetve a T-8 hibridben az S_{14} -allélt, melyeket korábban csak a NEpHGE segítségével tudtunk azonosítani. A ‘Morden 604’ kanadai hibrid, melynek pedigréjében *P. mandshurica* is található, az S_1 - és S_4 -allélokhoz nagyon hasonló fragmentumméretű allélokot hordoz.

Kontrollként ezúttal az S_1 -, S_2 -, S_4 - és S_C -allélokot reprezentáló fajták mellett a ‘Beliana’ ($S_C S_7$) (Albuquerque és mts., 2002) és a ‘Sunglo’ ($S_2 S_3$) (Burgos és mts., 1998) fajtákat is használtuk (14. ábra). Három fajtánál csak egy-egy allél amplifikálódott, a ‘Beliana’ esetében az S_7 , a ‘Sunglo’-nál az S_3 és a ‘Zard’-nál az S_{16} . Az ‘Auróra’-ban két allélt detektáltunk, a kisebbet az S_{10} -allélhoz hasonló méret jellemezte, de a PCR-termékek szekvenálása után megállapítottuk, hogy azzal nem azonos. Az új allélt S_{17} -allélként neveztünk el. A ‘Kecs-psár’ fajtában kimutatott S_Z -allél azonos méretű PCR-fragmentumot adott az S_4 -alléllal, és a megfelelő fehérjetermékek izoelektromos pontja csak

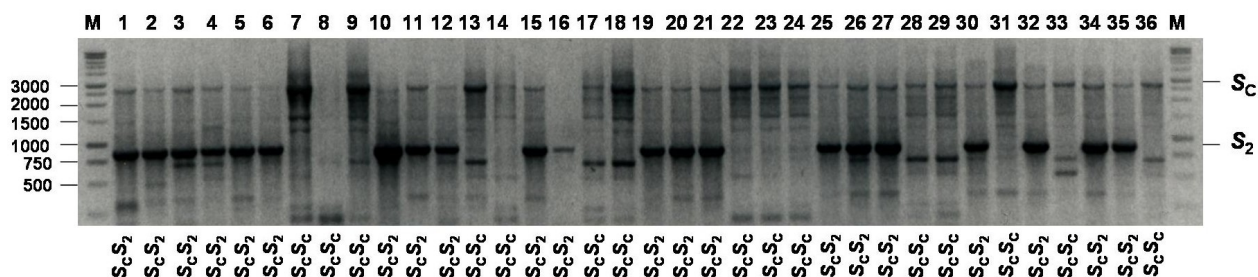
kismértékben különbözött egymástól (S_2 : 9,41; S_4 : 9,38). A hipervariábilis régiót is tartalmazó fragmentumok szekvenálása után egyértelművé vált, hogy új allélról van szó, melyet S_{18} -nak neveztünk el. Az öntermékenyülő ‘Mari de Cenad’ fajta az S_C -allélon kívül egy olyan allélt is hordozott, amelynek mérete minden eddigétől különbözött, ezt S_{19} -allélként jelöltük. A ‘Ceglédi Piroska’ és ‘Korai piros’ fajtákban amplifikált kisebb fragmentum hasonló méretű volt, mint az S_9 -allél. A hipervariábilis régiójuk szekvenálását követően megerősítést nyert, hogy egymással teljesen azonosak, de a ‘Ceglédi óriás’-ból szintetizált S_9 -cDNS-től különböznek, így ezeket S_{20} -allélként neveztük el. Összesen 13 új S -RN-áz allélt (S_8 - S_{20}) azonosítottunk a vizsgált fajtákban.



15. ábra. Kajszifajták EM jelű (EM-PC2consFD és EM-PC3consRD), a *Prunus* S -RN-áz gén második intronrégióját amplifikáló, konszenzus primerekkel végzett PCR-vizsgálatának eredménye. **M:** 1-kb + DNS-marker, **1.** ‘Ceglédi óriás’, **2.** ‘Ceglédi bíbor’, **3.** ‘Mandulakajszi’, **4.** ‘Pannónia’, **5.** ‘Roxana’, **6.** ‘Mamaia’, **7.** ‘Bergeron’, **8.** ‘Konzervnij Pozdnij’, **9.** ‘Borsi-féle kései rózsza’, **10.** ‘Rózsakajszi C. 1406’, **11.** ‘Gönci magyarkajszi’, **12.** ‘Paksi magyarkajszi’, **13.** ‘Nagygyümölcsű magyarkajszi’, **14.** ‘Andornaktályai magyarkajszi’, **15.** ‘Kászna ungarska’, **16.** ‘Ceglédi kedves’, **17.** ‘Ceglédi arany’, **18.** ‘Rakovszky’, **19.** ‘Crvena ungarska’, **20.** ‘Venus’, **21.** ‘Budapest’, **22.** ‘NJA-8’, **23.** ‘Nyikitszkij’.

Mivel az S_C -allél jelenléte minden korábbi és saját vizsgálatunk alapján is egyértelműen összefügg a kajszi öntermékenyülő fenotípusával, ezen allél markerezése kiemelkedő jelentőségű. Ezért a fent bemutatott 5 bizonyítottan öntermékenyülő fajtán kívül további 20 öntermékenyülő kajszifajta PCR-analízisét is elvégeztük (15. ábra), és az EM-primerek valamennyi esetben sikeres amplifikációt eredményeztek. E primerek az S_C -allélon kívül a ‘Hargrand’ (S_1S_2), ‘Bergeron’, ‘Toyuda’ (14. ábra), továbbá a

‘Mandulakajszai’, ‘Roxana’, ‘Mamaia’, ‘Konzervnij Pozdnij’, ‘Rakovszky’ és ‘Budapest’ (15. ábra) fajtákban egy másik, azonos méretű (kb. 900 bp hosszúságú) fragmentumot is felszaporítottak. A PaConsII-primerek használatával ez az allél nem volt amplifikálható. A NEpHGE-vizsgálatok alapján korábban ezt az allélt S_Y -nak neveztük el, és megállapítottuk, hogy az S_Y -allél által kódolt RN-áz izoelektromos pontja azonos az S_2 -RN-áz izoelektromos pontjával (10,06). Feltételeztük, hogy ez a fragmentum közös inkompatibilitási allélra utal, ezért irányított keresztezéssel ‘Konzervnij Pozdnij’ × ‘Bergeron’ hibrideket hoztunk létre, és az utódpopulációban meghatároztuk az S -genotípusok szegregációját (16. ábra). Az EM-primerekkel végzett PCR-analízis igazolta, hogy a várakozásoknak megfelelően mindegyik hibrid hordozza az S_C -allélt. A homozigóta és heterozigóta genotípusok 19:15 arányú hasadása statisztikailag ($P < 0,05$) azonos az elméletileg várható 1:1 arányú hasadással, ami alátámasztja, hogy a két szülő egy azonos inkompatibilitási allélt hordoz. Az említett 5 fajtából a hipervariábilis régiót és a 2. intront magába foglaló fragmentumokat klónoztuk és DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. Az NCBI génbanki adatbázis használatával elvégzett homológia-keresés (BLASTN) során kiderült, hogy a szekvenciák megegyeznek a ‘Goldrich’-ből izolált S_2 -allél szekvenciájával (Romero és mts., 2004), tehát az S_Y azonos az S_2 -vel. Így a ‘Bergeron’, ‘Mamaia’ és ‘Konzervnij Pozdnij’ genotípusa bizonyosan, de feltételezhetően a ‘Toyuda’ (14. ábra), ‘Roxana’, ‘Rakovszky’ és ‘Budapest’ fajták genotípusa is $S_C S_2$. A ‘Mandulakajszai’ S_2 -alléljának hipervariábilis régiójában egy guanin helyett adenin szerepel, mely a transzlálódott fehérjében egy glutamin → arginin aminosavcseréhez vezet, ezért a ‘Mandulakajszai’ ezen allélját S_{2m} -ként jelöljük.



16. ábra. A ‘Konzervnij Pozdnij’ × ‘Bergeron’ keresztezésekből származó utódok PCR-mintázata EM-PC2consFD és EM-PC3consRD primerekkel. **M:** 1-kb + DNS-marker, **1.** ‘Bergeron’, **2.** ‘Konzervnij Pozdnij’, **3–36.** 34 hibrid.

Az egyes fajták S -genotípusának meghatározását a 2. intronrégió amplifikálásán túlmenően az 1. intronrégió hasonló PCR-analízise is segítheti. Mivel azonban a *Prunus S*-

RN-áz gén 1. intronrégiójának méretbeli polimorfizmusa sokkal kisebb mértékű, mint a 2. intronméretek közötti variabilitás, a felbontóképesség növelése érdekében a mikroszatellit vizsgálatok során alkalmazott megközelítést alkalmaztuk: a kajszai 1. intronját határoló konzervatív régióra tervezett SRC_F forward primert (Vilanova és mts., 2005) JOE fluoreszcens festékkel jelöltük, így az amplifikált fragmentumok méretei automata szekvenátor használatával pontosan meghatározhatók. Az SRC_{F/R} primerpár 29 fajta esetében kettő, 26 fajta esetében egy fragmentumot amplifikált (7. táblázat). Valójában e 26 utóbbi fajta esetében is megjelent egy másik, 336 bp méretű fragmentumot reprezentáló jel, de ennek intenzitása a többi allélt reprezentáló jel intenzitásának fele–negyede volt (18. a–c. ábra). Mivel ez a fragmentum az öntermékenyülő S_CS_C homozigóta fajtákban is kimutatható volt az S_C-allél 355 bp hosszú fragmentuma mellett, ezeket PCR-műtermékeként kezeltük. Az S₈-allélt ('Ceglédi óriás', 'Ceglédi Piroska', 'Krimszkij Medunec' és 'Ligeti óriás') szintén 355 bp hosszú fragmentum jellemezte.

7. táblázat. Kajszfajták Vilanova és mts. (2005) által tervezett, fluoreszcens festékkel jelölt SRC_{F/R} primerekkel felszaporított 1. intronrégiójának automata szekvenátorral meghatározott méretei (bp)

Ananasznij cjurpinszkij	355	–
Andornaktályai magyarkajszai	355	–
Antonio Errani	244	401
Auróra	401	412
Bayoto	332	355
Bergeron	332	355
Borsi-féle kései rózsza	355	–
Budapest	332	355
Csacsanszko zlato	355	–
Marculesti 5/5	355	–
Ceglédi arany	203	355
Ceglédi bíborkajszai	203	355
Ceglédi kedves	355	–
Ceglédi óriás	203	355
Ceglédi Piroska	222	355
Crvena ungarska	355	–
Darunek malahojeva	355	–
Effekt	355	–
Goldrich	332	401
Gönci magyarkajszai	355	–
Hargrand	332	401
Harmat	285	306
Kecs-psár	324	332
Korai piros	222	355
Konzervnij Pozdnij	332	355
Korai zamatos	261	378
Kászna ungarska	355	–
Krimszkij Amur	355	–
Krimszkij Medunec	355	–

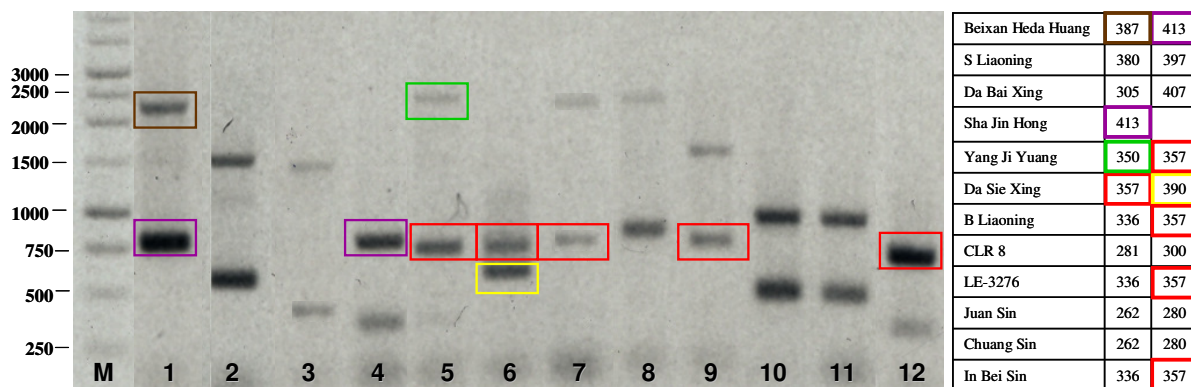
Ligeti óriás	203	355
Mamaia	332	355
Mandulakajszai	332	355
Marculesti 5/5	355	–
Mari de Cenad	355	334
Morden 604	245	360
Nagygyümölcsű magyarkajszai	355	–
Ninfa	332	401
Nyikitszkij	355	–
NJA-8	355	–
Nyujtó Ferenc emléke	355	–
Paksi magyarkajszai	355	–
Pannónia	355	–
Pasinok	355	–
Pisana	355	–
Priboto	332	401
Rakovszky	332	355
Roxana	332	355
Rózsakajszai C.1406	355	–
Sirena	355	–
T-8	378	380
Toyuda	332	355
Venus	355	–
Voszki	306	378
Zaposzdolje	355	–
Zard	316	337

Az S_1 -allélt hordozó 8 fajtában egy 401 bp hosszú PCR-termék volt jelen. Az S_2 -allélt tartalmazó 16 fajtában ugyanakkor egy 332 bp hosszú szakasz jelent meg. Az S_9 -allélt 203 bp ('Ceglédi arany', 'Ceglédi bíborkajszi', 'Ceglédi óriás' és 'Ligeti óriás'), az S_{10} -allélt 285 bp ('Harmat'), az S_{11} -allélt 306 bp ('Harmat' és 'Voszki'), az S_{12} -allélt 261 bp ('Korai zamatos'), az S_{13} -allélt 378 bp ('Korai zamatos', 'Voszki' és T-8 hibrid), az S_{14} -allélt 380 bp (T-8 hibrid), az S_{17} -allélt 412 bp ('Auróra'), az S_{19} -allélt 334 bp ('Mari de Cenad') és az S_{20} -allélt 222 bp ('Ceglédi Piroska' és 'Korai piros') hosszúságú fragmentum jellemzi. Az S_{15} -, S_{16} - és S_{18} -allélokhoz tartozó fragmentumméreték nem állapíthatók meg, mert az $S_{15}S_{18}$ genotípusú 'Kecs-psár' 324 és 332 bp, az $S_{16}S_7$ genotípusú 'Zard' pedig 316 és 337 bp hosszú fragmentumokat mutatott.

A 2. intronrégió amplifikálása és az 1. intronok hosszának meghatározása alapján azonos S -genotípussal rendelkeznek a 'Ninfa' és 'Priboto' fajták, ami megegyezik a 'Goldrich' és 'Hargrand' fajták S -genotípusával, tehát feltételezhetően S_1S_2 . A 2. intronrégió PCR-analízise alapján meghatározott $S_C S_2$ genotípusú fajták (14. és 15. ábrák) S -genotípusát az 1. intronrégió vizsgálata tovább erősíti, sőt a 'Bayoto' nevű fajtaival bővíti e csoportot. Az 'Antonio Errani' a 'Harcot'-hoz hasonlóan S_1S_4 -genotípusú. A NEpHGE és az S -RN-áz gén 1. és 2. intronjának PCR-analízise alapján összesen 26 fajta S -genotípusát tudtuk meghatározni (11. táblázat).

A kajszai őshazája Kína, ezért érdekes kérdés, hogy a napjainkban termesztett kínai fajták milyen S -allélokot hordoznak. Kísérletünkbe 14 kínai eredetű fajtát vontunk be, melyek genotípus-meghatározását a két intron hosszának markerezésével hajtottuk végre (17. ábra). Ezek alapján megállapítható, hogy legalább 13 eddig nem azonosított allélt találtunk. Mivel még szekvenciaadatok nem állnak rendelkezésünkre, az egyes allélokot nem neveztük el. A fajták mindegyike önmeddő, S_C -allél egyikben sem fordult elő. A 'Juan Sin' és a 'Chuang Sin' fajták S -genotípusa azonos, vagyis inkompatibilisek, míg a 'Yang Ji Yuang', 'Da Sie Xing', 'B Liaoning', 'LE-3276', 'In Bei Sin', illetve a 'Beixan Heda Huang' és a 'Sha Jin Hong' fajták egy azonos inkompatibilitási allélt hordoznak, tehát egymással szemi-kompatibilisek. Három fajta ('B Liaoning', 'LE-3276' és 'In Bei Sin') egyik alléljának első intronrégió-méretét 357 bp hosszúnak határoztuk meg. A második intronrégiót amplifikáló PCR során ugyanezen fajtákban egy azonos, kb. 800 bp hosszú fragmentumot mutattunk ki. Ez a két fragmentum feltételezhetően ugyanazon allél 1. és 2. intronrégióját reprezentálja, hiszen ezek a fragmentumok két másik fajtában ('Da Sie Xing' és 'Yang Ji Yuang') is együttesen voltak kimutathatók. A 'B Liaoning', 'LE-3276' és 'In Bei Sin' fajtákban a 357 bp hosszú, 1. intront tartalmazó fragmentum mellett egy 336 bp hosszú fragmentum is előfordul. Ez azonban valószínűleg PCR-műtermék, ugyanis az ezen

allélhoz köthető 2. intronrégió hossza e három fajtában eltérő. A ‘Sha Jin Hong’ fajtában az első intron amplifikációja során csak egyetlen fragmentumot detektáltunk, holott egy önmeddő fajta szükségszerűen heterozigóta kell legyen. A fajta heterozigótaságát a 2. intronrégiót felszaporító PCR-reakció igazolta, mellyel két különböző allél jelenléte volt kimutatható.



17. ábra. Kínai kajszifajták 2. intronrégiójának PCR-analízise EM-PC2consFD és EM-PC3consRD primerekkel (balra), valamint az 1. intronrégió fragmentumhosszai SRC_{F/R} primerekkel felszaporítva (jobbra). Az azonos színek az ugyanazon allél által kódolt fragmentumokat jelölik. **M:** 1-kb + DNS-marker, **1.** ‘Beixan Heda Huang’, **2.** ‘S Liaoning’, **3.** ‘Da Bai Xing’, **4.** ‘Sha Jin Hong’, **5.** ‘Yang Ji Yuang’, **6.** ‘Da Sie Xing’, **7.** ‘B Liaoning’, **8.** ‘CLR 8’, **9.** ‘LE-3276’, **10.** ‘Juan Sin’, **11.** ‘Chuang Sin’, **12.** ‘In Bei Sin’.

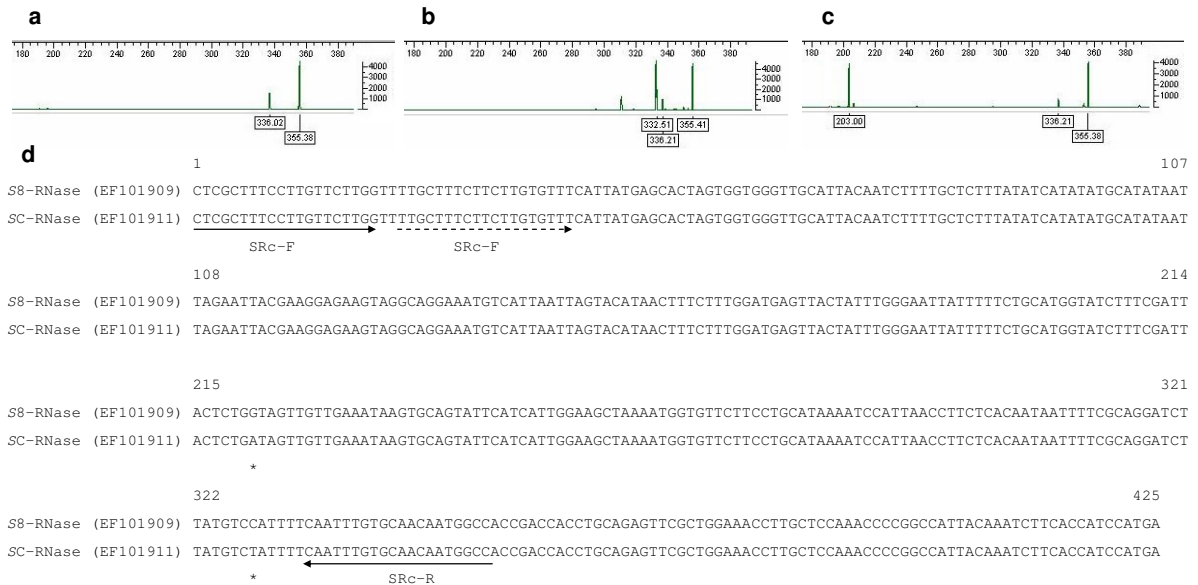
Tekintve, hogy az *S*-RN-áz gén vizsgálatával az *S_C*- és az *S₈*-allélok nem tudtuk egymástól megkülönböztetni, a két allél bármelyikét hordozó, ismeretlen termékenyülésű fajtáról e vizsgálatokkal nem dönthető el, hogy öntermékenyülő vagy önmeddő fenotípusú. Továbbá, ha az eddigi eredményeink alapján (izoelektromos pont, intronméretek) egyformának látszó *S_C*- és *S₈*-RN-ázok azonossága igazolható lenne, mindez igen jelentős mértékben hozzájárulna az öntermékenyülés molekuláris okainak tisztázásához is. Ezért vizsgálatainkat ebben az irányban folytattuk tovább.

5.3. Az öntermékenyülés molekuláris háttere

5.3.1. Az *S_C*- és *S₈*-RN-áz allélok molekuláris analízise

Eredményeink alapján az *S_C*- és *S₈*-allélok 2. intronrégióját azonos fragmentumméret (kb. 2800 bp) jellemezte (14. és 15. ábrák). A 2. intronrégió vizsgálata alapján *S_CS_C* homozigótának feltételezhető fajta (15. ábra), a ‘Pannónia’ az 1. intronrégió fragmentumhossz-analízise során két fragmentumot mutatott, egy 336 bp és egy 355 bp méretűt (18. a. ábra), jöllehet az előbbi fragmentum jele sokkal kisebb intenzitású volt. Ez

a 336 bp hosszúságú fragmentum a heterozigóta öntermékenyülő fajtákban (18. b. ábra), sőt, az S_8 -allélt hordozó genotípusokban is megjelent (18. c. ábra).

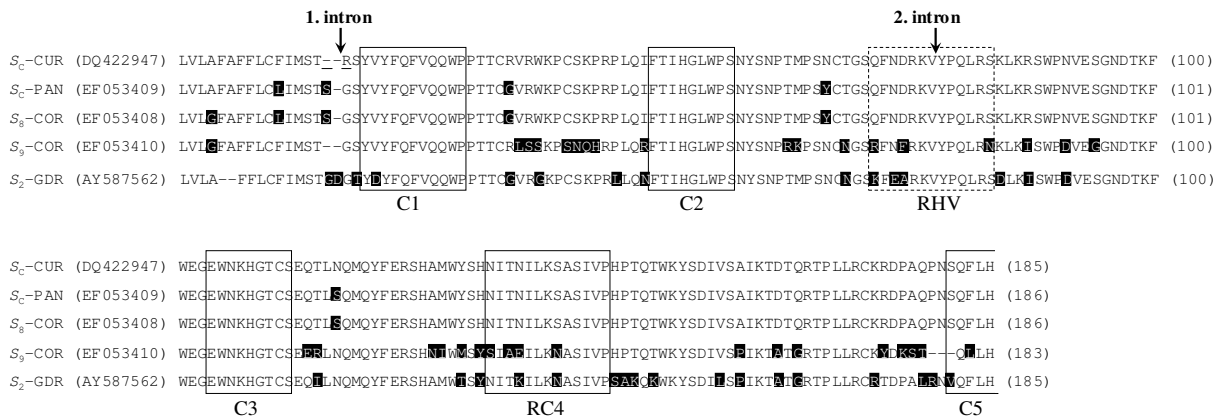


18. ábra. Az S -RN-áz gén 1. intronrégiójának automata szekvenátorral meghatározott elektroforogramja $SRC_{F(JOE)/R}$ primerekkel amplifikálva, **a:** $S_C S_C$ ('Pannónia'); **b:** $S_C S_2$ ('Budapest'); **c:** $S_8 S_9$ ('Ceglédi óriás'), illetve az S_C - és S_8 -RN-áz allélok 1. intronrégiójának szekvenciája a primerek tervezett (folyamatos vonal) és potenciális (szagott vonal) kötődési helyeivel (**d**). * variábilis nukleotid.

Az S_C - és S_8 -allélok 1. intronrégióját klónoztuk és DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. A két allél ezen szakaszának szekvenciája 99,5 %-ban azonosnak bizonyult. Az SRC_F forward primer kötődési helyétől 19 bp távolságra downstream irányban olyan szekvenciárészlet található, mely lehetőséget adhat a primer kötődésére. Ennek következtében a 355 bp méretű fragmentum mellett amplifikálódik egy 336 bp hosszúságú PCR-műtermék is (18. d. ábra).

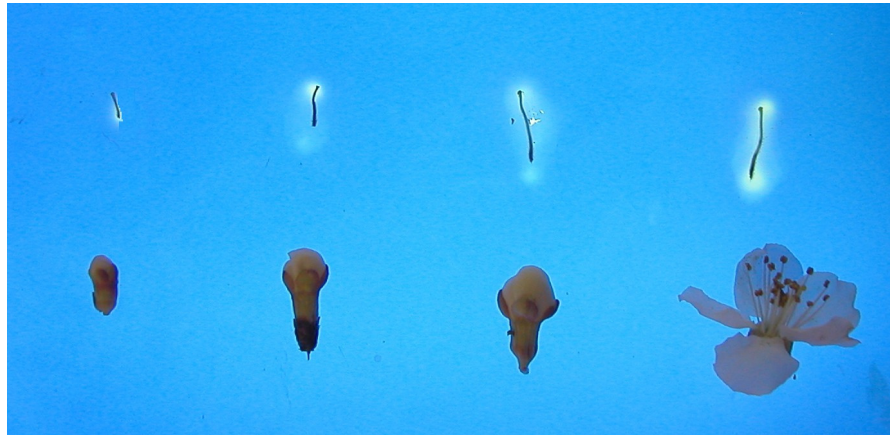
Az S_C - és S_8 -RN-áz allélok kódoló régiójának összevetése érdekében a kinyílt virágok bibéiből cDNS-t szintetizáltunk, melyeket klónozást követően megszekvenáltunk. A 'Pannónia'-ból származó S_C - és a 'Ceglédi óriás'-ból izolált S_8 -RN-áz nukleotidszekvenciája a vizsgált 185 aminosavas szakaszon 99,5 %-ban azonos volt, de a 'Pannónia' és a 'Currot' (Vilanova és mts., 2006) fajtákból származó S_C -RN-ázok érett fehérjetermékének szekvenciája között valamennyivel kisebb, 98,2 %-os homológia volt kimutatható (19. ábra). A két S_C -allél szignálpeptidje szintén 3 aminosavban különbözött, de ezért részben a spanyol fajta hibásan megadott szekvenciája felelős. Az S_8 -allél két másik RN-ázzal jóval kisebb mértékű, az S_9 -cel 79,0 %-os, az S_2 -vel 80,1 %-os homológiát

mutatott. A cDNS alapján következtetett aminosavszekvenciák hipervariábilis régiója az S_8 -, illetve a két különböző fajtából izolált S_C -RN-ázok esetében teljesen azonos volt.



19. ábra. A ‘Currot’ (CUR) (Vilanova és mts., 2006) és ‘Pannónia’ (PAN) fajtákból származó S_C -, illetve a ‘Ceglédi óriás’-ból (COR) izolált S_8 - és S_9 -, valamint a ‘Goldrich’ (GDR) fajtában előforduló S_2 -allélok részleges aminosav-szekvenciájának illesztése. A CUR S_C -RN-áz aminosav-sorrendjét az allél genomi DNS-szekvenciája alapján adták meg Vilanova és mts. (2006), míg az általunk leírt allélok aminosav-sorrendjét a cDNS-szekvenciák alapján határoztuk meg. Az S -RN-áz gén öt konzervatív régióját (C1, C2, C3, RC4 és C5) folyamatos, hipervariábilis (RHV) régióját (Ushijima és mts., 1998) szaggatott kerettel jelöltük. A nyilak az intronok helyét, a fekete árnyékolás az egyes allélok S_C -CUR-hoz viszonyított variábilis aminosavait jelölik. A ‘Currot’ és ‘Pannónia’ S_C -RN-ázokban a 16. és 17. aminosavak közötti különbség a Vilanova és mts. (2006) által tévesen megadott 1. intron pozíciójából ered.

A ‘Ceglédi óriás’ (S_8S_9), ‘Ceglédi arany’ (S_CS_9), ‘Bergeron’ (S_CS_2) és ‘Budapest’ (S_CS_2) fajták bibekivonataiból ribonukleáz-aktivitást mértünk, hogy meghatározzuk, van-e különbség a különböző S -allélok által kódolt RN-áz izoenzimek aktivitása között. Az S -ribonukleázok aktivitása a virág fejlettségi állapotától függ. Ennek bemutatásához két különböző vizsgálatot végeztünk el. Egyfelől RNS-tartalmú agarózgélben a négy különböző stádiumú virágból preparált bibékből szekretált ribonukleázok enzimaktivitását szemléltettük (20. ábra). A bibék fejlődésével párhuzamosan növekszik az akromatikus foltok nagysága és intenzitása, ami az RN-áz aktivitás növekvő mértékét tükrözi.



20. ábra. Négy különböző fejlettségi állapotú bibeszálból szekretálódó *S*-ribonukleázok aktivitásvizsgálata RNS-tartalmú agarózgélben. A *Torula* RNS-t tartalmazó agarózgélét toluidinkékkel festettük meg, így a bibeszálak körül látható akromatikus udvar intenzitása és kiterjedése a bibeszálakból az agarózgélbe diffundált RN-ázok aktivitásával arányos. A bibék fejlődésével párhuzamosan egyre nagyobb RN-áz aktivitás mutatható ki.

Ezenkívül spektrofotometriás méréssel is meghatároztuk a bibekivonatok összes RN-áz aktivitását is. A fehérbimbós állapotú virágokból („balloon stage”) izolált bibeszálakban 10–15 %-kal nagyobb specifikus RN-áz aktivitás volt mérhető, mint a két nappal korábban begyűjtött virágok esetében. Az anthézis napján a különböző *S*-genotípusú fajták RN-áz aktivitásában jelentős különbségeket mértünk, míg az azonos genotípusúak nagyon hasonló értékeket mutattak (8. táblázat). A ‘Ceglédi óriás’ és a ‘Ceglédi arany’ fajtákban mért értékek közel azonosnak bizonyultak: 423,90 és 429,97 $\Delta A/\text{min/g}$ fehérje.

8. táblázat. Különböző *S*-genotípusú fajták különböző fejlődési stádiumú bibeszálainak kivonatából mért specifikus ribonukleáz-aktivitás

Fajta	Fejlődési stádium	Aktivitás ($\Delta A_{260}/\text{min/g}$ fehérje)
Budapest ($S_C S_2$)	Fehérbimbós	472,55 ^a
Bergeron ($S_C S_2$)	Fehérbimbós	478,44 ^a
Ceglédi arany ($S_C S_9$)	2 nappal a fehérbimbós állapot előtt	384,94
Ceglédi arany ($S_C S_9$)	Fehérbimbós	429,97 ^b
Ceglédi óriás ($S_8 S_9$)	2 nappal a fehérbimbós állapot előtt	399,14
Ceglédi óriás ($S_8 S_9$)	Fehérbimbós	423,90 ^b

^{a,b}A ‘Budapest’, ‘Bergeron’, ‘Ceglédi arany’ és ‘Ceglédi óriás’ fehérbimbós állapotú bibéiben mért ribonukleáz-aktivitás (n=3) egytényezős varianciaanalízise. Az azonos betűkkel jelzett értékek nem különböznek $P < 0,05$ szignifikanciaszint mellett.

5.3.2. Az SFB_C- és SFB₈-allélok molekuláris analízise

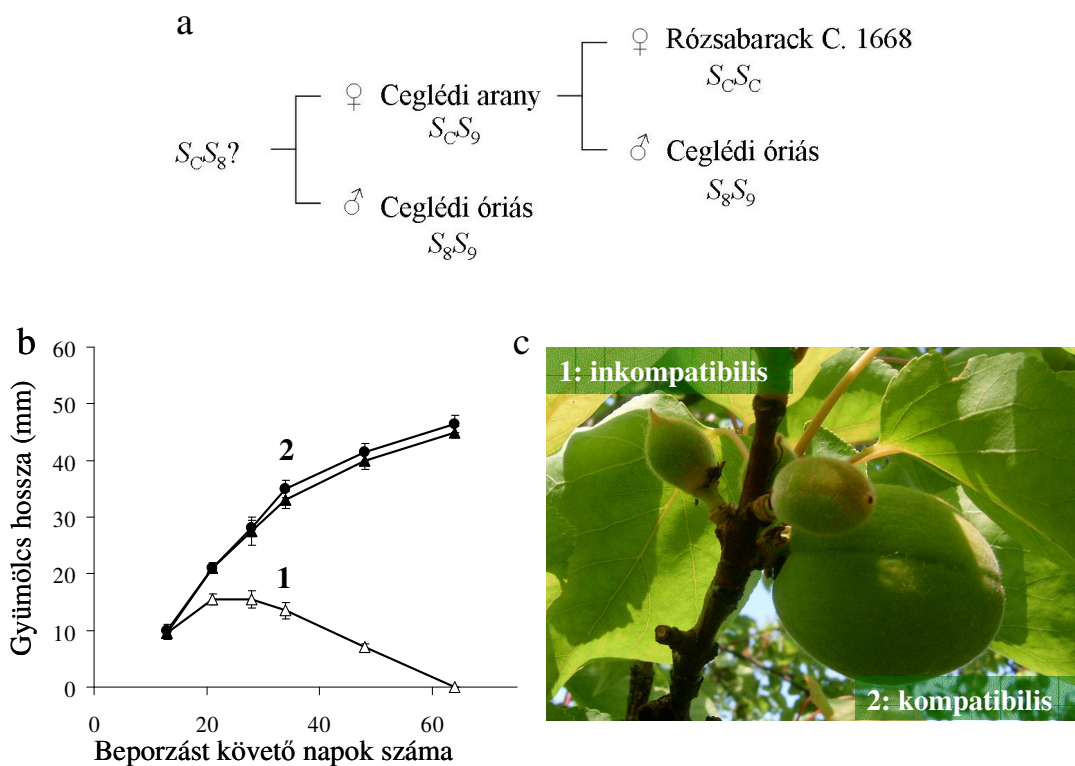
Mivel a bibekomponens *S*-RN-áz gén két allélja, az öntermékenyülésért felelős *S_C*, illetve egy inkompatibilitási allél, az *S₈*, minden vizsgálat során azonosnak mutatkozott, feltételezhető volt, hogy az *S₈*-haplotípusú allél pollenkomponens, F-box génjében (SFB₈) bekövetkezett mutáció hatására alakult ki az öntermékenyülésért felelős SFB_C-allél. E hipotézis funkcionális bizonyítására megfelelő *S*-genotípusú szülőnövények irányított keresztezését végeztük el (21. a. ábra). Az öntermékenyülő ‘Ceglédi arany’ (*S_CS₉*) fajtát az önmeddő ‘Ceglédi óriás’ (*S₈S₉*) pollenadó fajtával kereszteztük. Mivel mindkét fajta közös inkompatibilitási alléllal (*S₉*) rendelkezik, csak az *S₈*-allélt hordozó pollenek okozhatnak termékenyülést. Ha azonban a pollenadó fajta *S₈*-allélja az *S_C* nem mutáns változatának felel meg, akkor nem mutáns, funkcióképes F-box fehérjét expresszál, ami az öntermékenyülő anyapartner *S_C*-RN-áz enzimét sajátként ismeri fel, és „megvédi” az ubikvitin/26S proteaszóma rendszer általi lebontástól. Az aktív ribonukleázok hatására a pollentömlő növekedése gátlódik, a termékenyülés elmarad. A ‘Ceglédi arany’ × ‘Ceglédi óriás’ keresztezést két egymást követő évben (2005 és 2006) elvégezve 0,0 és 2,9 %-os gyümölcskötődést kaptunk (9. táblázat). A reciprok, illetve a ‘Gönci magyarkajszai’ × ‘Ceglédi óriás’ keresztezések bőséges terméskötődést eredményeztek.

9. táblázat. Szabadföldi terméskötődési arányok irányított keresztezést követően 2005 és 2006 években

♀	♂	Beporzott virágok száma (db.)	Gyümölcskötődés aránya (%)	(In)kompatibilitás
Gönci magyarkajszai ^b	Ceglédi óriás	71	40,9	Kompatibilis
Ceglédi óriás ^b	Ceglédi arany	157	36,9	Kompatibilis
Ceglédi arany ^b	Ceglédi óriás	175	2,9	Inkompatibilis
Ceglédi arany ^a	Ceglédi óriás	240	0	Inkompatibilis

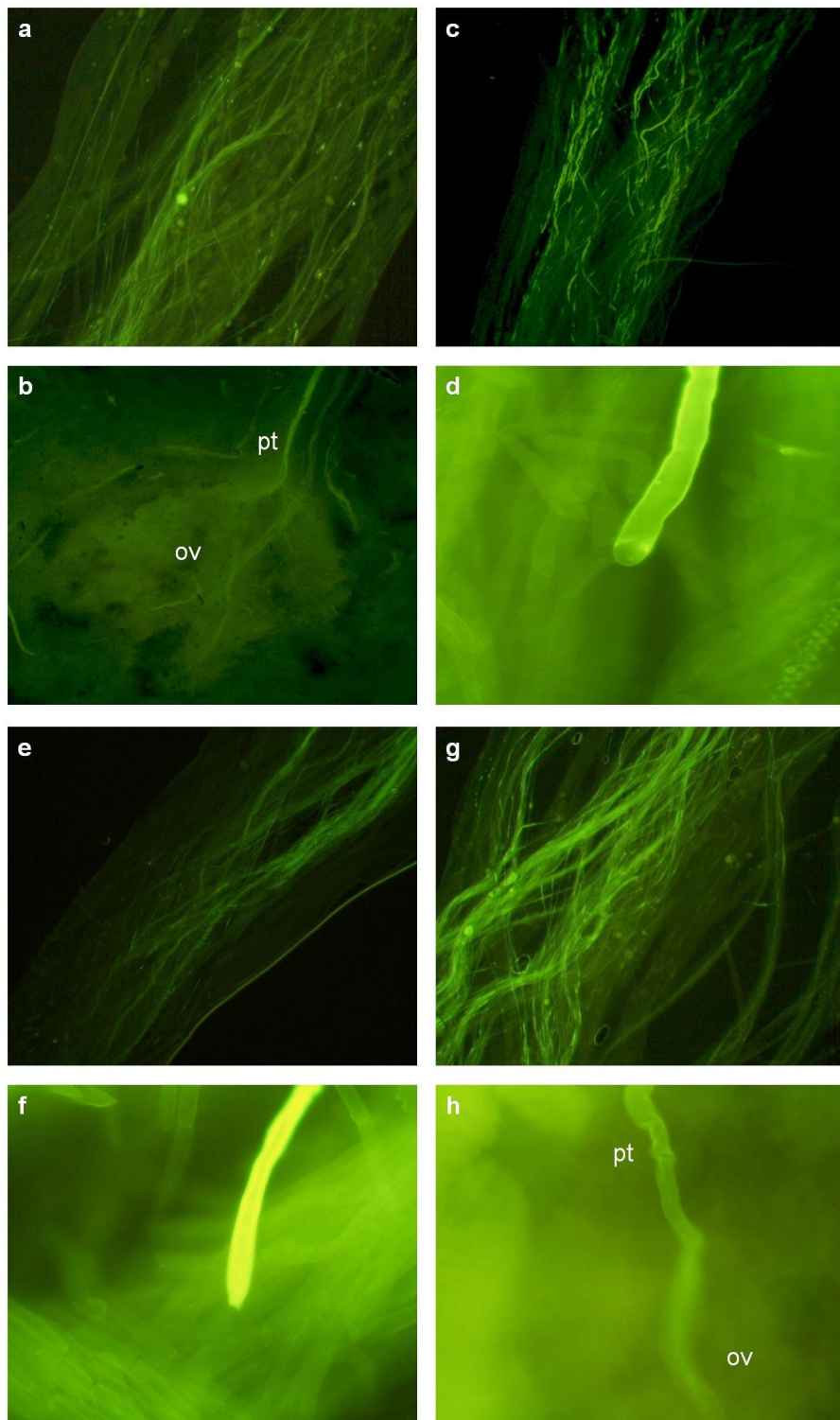
^a2005; ^b2006

A terméskötődési arány megállapításához a legalkalmasabb időpontot az inkompatibilis és kompatibilis keresztezésekből származó gyümölcsök fejlődése alapján határoztuk meg (21. b. és c. ábrák).



21. ábra. Irányított szabadföldi keresztezés annak igazolására, hogy az S_C - az S_8 -haplotípus pollenkomponensének funkcióképtelen, mutáns változatát hordozza (a); a gyümölcsfejlődés dinamikája a ‘Ceglédi arany’ × ‘Ceglédi óriás’ (üres háromszög), a reciprok (fekete háromszög) és a ‘Gönci magyarkajszi’ × ‘Ceglédi óriás’ (fekete kör) keresztezéseket követően (b). Az inkompatibilis (1) és kompatibilis (2) megporzásból származó gyümölcsök fejlődésében tapasztalható különbségek 34 nappal a beporzást követően (c).

A ‘Ceglédi arany’ öntermékenyülésének, a ‘Ceglédi óriás’ önmeddőségének, továbbá a ‘Ceglédi arany’ × ‘Ceglédi óriás’ keresztezés inkompatibilitásának és a reciprok keresztezés kompatibilitásának megerősítésére pollentömlő-növekedési vizsgálatot végeztünk UV-fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A kompatibilis kombinációk (‘Ceglédi arany’ öntermékenyítése és ‘Ceglédi óriás’ × ‘Ceglédi arany’) során a pollenek túlnyomó része csírázott, növekedésük intenzíven megindult (22. a. és g. ábrák), majd az ováriumba általában egy vagy néhány pollentömlő hatolt be (22. b. és h. ábrák). A ‘Ceglédi óriás’ öntermékenyítése valamint a ‘Ceglédi arany’ × ‘Ceglédi óriás’ inkompatibilis kapcsolatnak bizonyult. Ebben az esetben is csírázott a bibeszájra került pollenek nagy része, növekedésük elkezdődött, a bibeszál felső harmadában azonban valamennyi pollentömlő növekedése megtorpant (22. c. és e. ábrák), és egy sem érte el az embriózsákot, így nem jöhetett létre sikeres megtermékenyülés. A fejlődésben gátolt pollentömlőkben az inkompatibilitási reakció tipikus tünete, a jelentős mértékű kallózfelhalmozódás figyelhető meg (22. d. és f. ábrák).



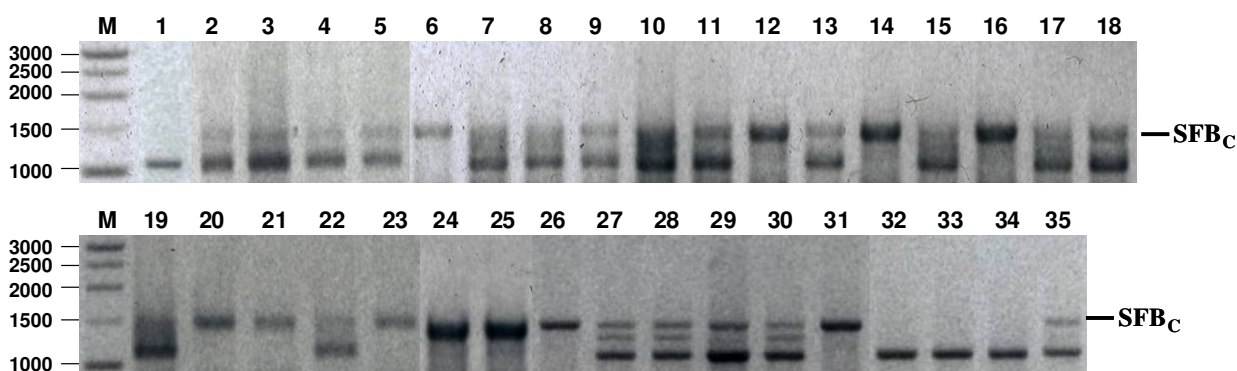
22. ábra. Pollentömlő-növekedés a bibeszálban irányított keresztezést követően. Az öntermékenyített ‘Ceglédi arany’ bibeszálának középső része rengeteg pollentömlővel (a), illetve az ováriumba (ov) belépő pollentömlővel (pt) (b). Az öntermékenyített ‘Ceglédi óriás’ bibeszálának középső szakasza (c) és egy, a növekedésben megállt pollentömlő (d). A ‘Ceglédi óriás’ pollentömlőinek növekedése az öntermékenyülő ‘Ceglédi arany’ bibeszáljának középső szakaszán gátódik (e), és az inkompatibilis pollentömlőkre jellemző tipikus kallózfelhalmozódást mutatnak (f). A ‘Ceglédi arany’ pollentömlői akadálytalanul növekednek a ‘Ceglédi óriás’ bibéjében (g), melyek közül egy eléri az ováriumot (h).

Az NCBI adatbázisban elérhető *P. armeniaca* és *P. mume* SFB/SLF-szekvenciák alapján degenerált primereket terveztünk (két forward és egy reverse irányút). Az SFB_C- ('Pannónia') és SFB₈-allélok ('Ceglédi óriás') AprSFB-F1 és AprSFB-R primerekkel felszaporított szakaszát, továbbá az SFB₉-allél ('Ceglédi arany') AprSFB-F2 és AprSFB-R primerekkel amplifikált fragmentumait klónoztuk, és DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. A szekvenciák illesztéséből egyértelműen kiderült, hogy az SFB_C-allél egy 358 bp hosszú inszerciót tartalmaz az SFB₈-hoz képest (23. ábra). Ez az inszerció mutáció egy abnormalis helyzetű stop kodont eredményez éppen az inszerció első tripletjénél, melynek következtében a fehérje karboxiterminális vége a HVa és HVb régiókkal nem fordítódik át, így a transzlálódott fehérje nagy valószínűséggel funkcióképtelen lesz.

A 'Ceglédi óriás' fajtából más, a *Prunus* SFB-allélokhöz kisebb (>60 %) homológiát mutató F-box géneket is izoláltunk (F-box 1 és F-box 2), amelyek szerepe nem ismert, de feltételezhetően nem a termékenyülési folyamatokban vesznek részt.

5.4. F-box gén alapú *S*-genotípus-meghatározás

Az AprSFB-F1/R primerpárral az SFB_C-allél minden más SFB-alléltól jól elkülöníthető a 358 bp hosszú inszerció miatt. Így ezen primerek használatával lehetőség nyílik az *S*_C-haplotípus markerezésére. Az inszerció nélküli SFB-allélok (SFB₁₋₂₀) hossza nem mutat olyan mértékű polimorfizmust, hogy azt agarózgélben detektálni tudjuk, így mindegyikből közel azonos méretű fragmentum amplifikálódik. A korábbi vizsgálataink során, ha az *S*-RN-áz gén 1. és 2. intronrégiója alapján csak egy, az *S*₈- vagy *S*_C-RN-áz méretére jellemző fragmentumot sikerült amplifikálnunk, a fajta pontos *S*-genotípusa nem volt meghatározható. Az AprSFB-F1/R primerpárral azonban az is kimutathatóvá vált, hogy az adott fajta homo- vagy heterozigóta az *S*-lókuszban. E primerekkel mintegy 32 ismeretlen genotípusú vagy vitatott termékenyülésű fajta pontos *S*-genotípusát tudtuk meghatározni (24. ábra), melyeket a korábbi vizsgálatainkkal nem sikerült jellemezni.



24. ábra. Kajszifajták PCR-analízise az SFB-gént amplifikáló AprSFB-F1 és AprSFB-R konszenzus primerekkel. **M:** 1-kb + DNS-marker, **1.** ‘Harmat’, **2.** ‘Konzervnij Pozdnij’, **3.** ‘Mamaia’, **4.** ‘Mandulakajszi’, **5.** ‘Marculesti 5/5’, **6.** ‘Ananasznij cjurpinszkij’, **7.** ‘Csacsanszko zlato’, **8.** ‘Crvena ungarska’, **9.** ‘Darunek malahojeva’, **10.** ‘Effekt’, **11.** ‘Krimszkij Amur’, **12.** ‘Paszinok’, **13.** ‘Pisana’, **14.** ‘Sirena’, **15.** ‘Kâszna ungarska’, **16.** ‘Nyujtó Ferenc emléke’, **17.** ‘Paksi magyarkajszi’, **18.** ‘Roxana’, **19.** ‘Nyikitszkij’, **20.** ‘NJA-8’, **21.** ‘Sulmona’, **22.** ‘Venus’, **23.** ‘Zaposzdojje’, **24.** ‘Rózsakajszi C.1406’, **25.** ‘Ceglédi kedves’, **26.** ‘Pannónia’, **27.** ‘Magyarkajszi C. 235’, **28.** ‘Andornaktályai magyarkajszi’, **29.** ‘Rakovszky’, **30.** ‘Nagygyümölcsű magyarkajszi’, **31.** ‘Borsi-féle kései rózsa’, **32.** ‘Ceglédi óriás’, **33.** ‘Ligeti óriás’, **34.** ‘Krimszkij Medunec’, **35.** ‘Ceglédi arany’.

Az SFB-gén alapú PCR-analízissel azonosítható volt a közép-európai régióban meghatározó jelentőségű Magyarkajszi fajtakörbe tartozó fajták *S*-genotípusa. A fajtakör Magyarországról, Ukrajnából, Szerbiából, Macedóniából, Bulgáriából és Romániából származó fajtáinak genotípusa egyaránt *S*_C*S*₈-nak adódott. Az *S*₈-allél a másik jelentős

magyar fajtakör, az Óriás fajtacsoport valamennyi fajtájából is kimutatható volt. Érdekes, hogy míg a magyar kajszifajták között az S_8 -allél viszonylag gyakran fordult elő, a Magyararkajsi fajtakörön kívül csak két ukrán és egy olasz fajtából volt kimutatható.

10. táblázat. Néhány kajszifajta és -hibrid termékenyülési fenotípusának vizsgálata geitonogám önbeporzással (Szigetcsép, 2006).

Fajta	Összes megporzott virág (db)	Összes kötődött termés (db)	Összes kötődött termés (%)
Krimszkij Medunec	295	8	2,7
M604	327	48	14,7
Korai piros	269	101	37,5
Harmat	277	12	4,3
Korai zamatos	259	9	3,5
NJA 8	141	17	12,1

Összesen 55 fajta S -genotípusát határoztuk meg, melyeket egy összefoglaló táblázatba gyűjtöttük, az eredményeket szolgáltató vizsgálati módszereket is feltüntetve (11. táblázat). A fehérje- és DNS-alapú analíziseket néhány fajta esetében szabadföldi vizsgálatokkal is kiegészítettük. Az öntermékenyülési képességet hat fajtánál geitonogám megporzással ellenőriztük (10. táblázat). A Viti és mts. (1997) által megadott 5 % határérték alatti gyümölcskötődést tekintettük önmeddő genotípusnak. Az öntermékenyített 'M604' (14,7 %), a 'Korai piros' (37,5 %) és az 'NJA 8' (12,1 %) terméskötődése is meghaladta ezt a küszöbértéket, míg a 'Krimszkij Medunec' (2,7 %), a 'Harmat' (4,3 %) és a 'Korai zamatos' (3,5 %) fajtáknál 5 % alatti kötődést kaptunk. A 'Korai piros' ($S_C S_{20}$) × 'Ceglédi óriás' ($S_8 S_9$) keresztezés során 128 megporzott virágból 39 gyümölcs kötődött, ami 30,5 %-os kötődési arányt jelent. Ha a 'Korai piros' is S_9 -allélt tartalmazott volna, ahogyan azt az RN-áz 2. intronrégióját amplifikáló PCR-vizsgálat eredményei alapján feltételeztük (14. ábra), az adott kombináció inkompatibilis lett volna.

A vizsgált fajták közül 14 önmeddőnek, 41 öntermékenyülőnek, ez utóbbiak közül 11 fajta homozigóta genotípusúnak ($S_C S_C$) bizonyult. A vizsgált 55 fajta közül az S_8 -allél 19, az S_2 -allél 12, az S_1 -allél 4, az S_9 -allél 4, az S_{13} -allél 3, az S_{10} -, S_{11} - és S_{20} -allélok 2–2, az S_{12} - és S_{14-19} -allélok egy–egy fajtában fordultak elő.

11. táblázat. A vizsgált kajszifajták *S*-genotípusa, az annak meghatározására használt módszerek és a fajták termékenyülési fenotípusa

Fajta	Az <i>S</i> -genotípus meghatározásának módszere	<i>S</i> -genotípus	Termékenyülés ^c
Auróra	R1, R2	<i>S</i> ₁₇₋	Önmeddő
Ananasznij cjurpinskij	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Andornaktályai magyarkajszi	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Antonio Errani	R1, R2, FB	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₄	Önmeddő
Bayoto	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂	Öntermékenyülő
Bergeron	N, R1, R2	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂	Öntermékenyülő
Borsi-féle kései rózsza	R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Budapest	R1, R2	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂	Öntermékenyülő
Csacsanszko zlato	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Ceglédi arany	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₉	Öntermékenyülő
Ceglédi bíborkajszi	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₉	Öntermékenyülő
Ceglédi kedves	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Ceglédi óriás	N, R1, R2, FB	<i>S</i> ₈ <i>S</i> ₉	Önmeddő
Ceglédi Piroska	R1, R2	<i>S</i> ₈ <i>S</i> ₂₀	Önmeddő
Crvena ungarska	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Darunek malahojeva	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Effekt	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Gönci magyarkajszi	N, R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Harmat	N, R1, R2, Sz	<i>S</i> ₁₀ <i>S</i> ₁₁	Önmeddő
Kecs-psár	N, R1, R2	<i>S</i> ₁₅ <i>S</i> ₁₈	Önmeddő
Konzervnij Pozdnij	N, R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂	Öntermékenyülő
Korai piros	R1, R2, Sz	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂₀	Öntermékenyülő
Korai zamatos	N, R1, R2, Sz	<i>S</i> ₁₂ <i>S</i> ₁₃	Önmeddő
Kászna ungarska	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Krimszkij Amur	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Krimszkij Medunec	N, R1, FB, Sz	<i>S</i> ₈₋	Önmeddő
Ligeti óriás	N, R1, R2, FB	<i>S</i> ₈ <i>S</i> ₉	Önmeddő
Magyar kajszi C. 235	FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Mamaia	N, R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂	Öntermékenyülő
Mandulakajszi	N, R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _{2m} ^b	Öntermékenyülő
Marculesti 5/5 (szin. Callatis)	N, R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Mari de Cenad	N, R1, R2	<i>S</i> _C <i>S</i> ₁₉	Öntermékenyülő
Modesto	N, R1	<i>S</i> _C <i>S</i> ₁₃	Öntermékenyülő
Morden 604	N, R1, R2, FB, Sz	<i>S</i> ₄₋	Öntermékenyülő
Nagygyümölcsű magyarkajszi	R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Ninfa	R1, R2, FB	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₂	Önmeddő
Nyikitszkij	N, R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
NJA-8	N, R1, R2, FB, Sz	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Nyujtó Ferenc emléke	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Paksi magyarkajszi	R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Pannónia	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Pasinok	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> _C	Öntermékenyülő
Pisana	R1, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₈	Öntermékenyülő
Priboto	R1, R2, FB	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₂	Önmeddő
Rakovszky	R1, R2, FB	<i>S</i> _C <i>S</i> ₂	Öntermékenyülő

Fajta	Az <i>S</i> -genotípus meghatározásának módszere	<i>S</i> -genotípus	Termékenyülés ^c
Roxana	R1, R2, FB	$S_C S_2$	Öntermékenyülő
Rózsakajszai C.1406	R2, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Sirena	R1, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Sulmona	N, R1, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Toyuda	R1, R2	$S_C S_2$	Öntermékenyülő
T-8	N, R1, R2	$S_{13} S_{14}$	Önmeddő
Venus	N, R1, R2, FB	$S_C S_8$	Öntermékenyülő
Voszki	N, R1, R2	$S_{11} S_{13}$	Önmeddő
Zaposzdlje	N, R1, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Zard	N, R1, R2, FB	S_{16-}	Önmeddő

^a**R1:** az *S*-RN-áz gén 1. intronrégiójának PCR-vizsgálata; **R2:** az *S*-RN-áz gén 2. intronrégiójának PCR-vizsgálata; **FB:** az F-box gén PCR-analízise; **N:** nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE); **Sz:** szabadföldi öntermékenyítés

^bAz S_2 - és S_{2m} -allélok funkcionális különbözőségének igazolása további vizsgálatokat igényel

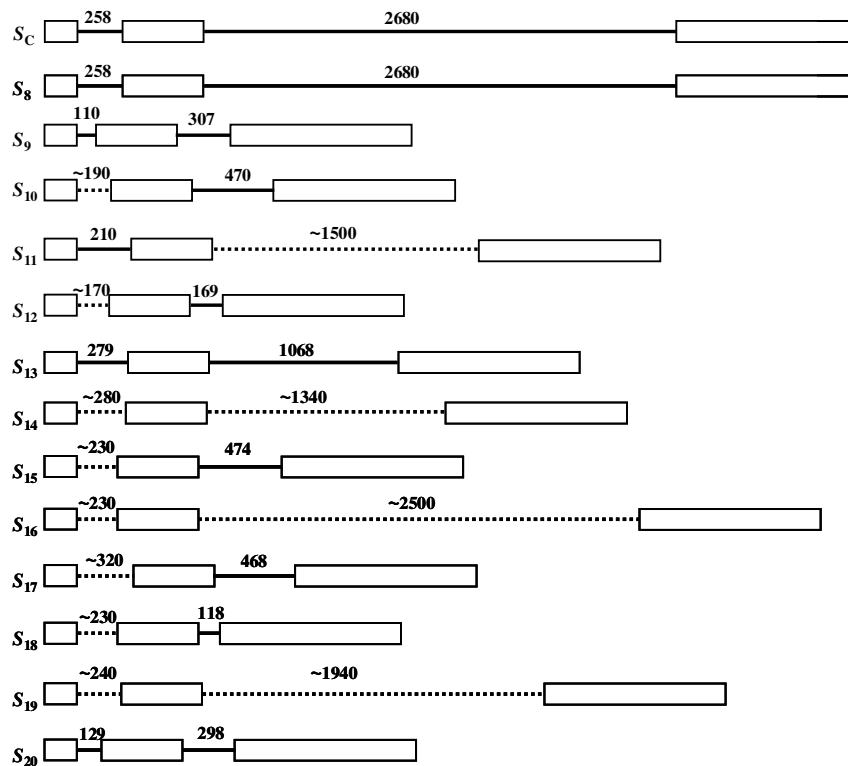
^cA félkövér betűvel szedett termékenyülési fenotípus tisztázása vagy igazolása vizsgálataink eredménye

– Olyan allél, amelynek meghatározása egyik módszerrel sem volt eredményes

5.5. Az *S*-allélok szerkezete és filogenetikai vizsgálata

Hét *S*-RN-áz allél (S_C ; S_8 ; S_9 ; S_{11} ; S_{13} ; S_{15} ; S_{16}) cDNS-ét, továbbá hat allél (S_C ; S_8 ; S_9 ; S_{11} ; S_{13} ; S_{20}) első intronrégióját, illetve nyolc allél (S_9 ; S_{10} ; S_{12} ; S_{13} ; S_{15} ; S_{17} ; S_{18} ; S_{20}) második intronrégióját klónoztuk, majd megszekvenáltuk (2. Melléklet). A DNS-szekvenciákat benyújtottuk a National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank nemzetközi adatbázisba, ahol a következő azonosító számok alatt található meg: EF101909, DQ269996; EF101910, DQ269997; DQ269998; DQ269995; DQ269999; DQ270001; DQ270000; EF173402; DQ386735; EF101911, EF101905, EF101906, EF101907, EF101908, EF053410; EF053409; EF053408; EF173398; EF173399; EF173400; EF173401; EF053405; EF053407; EF053404; EF053403, EF101912.

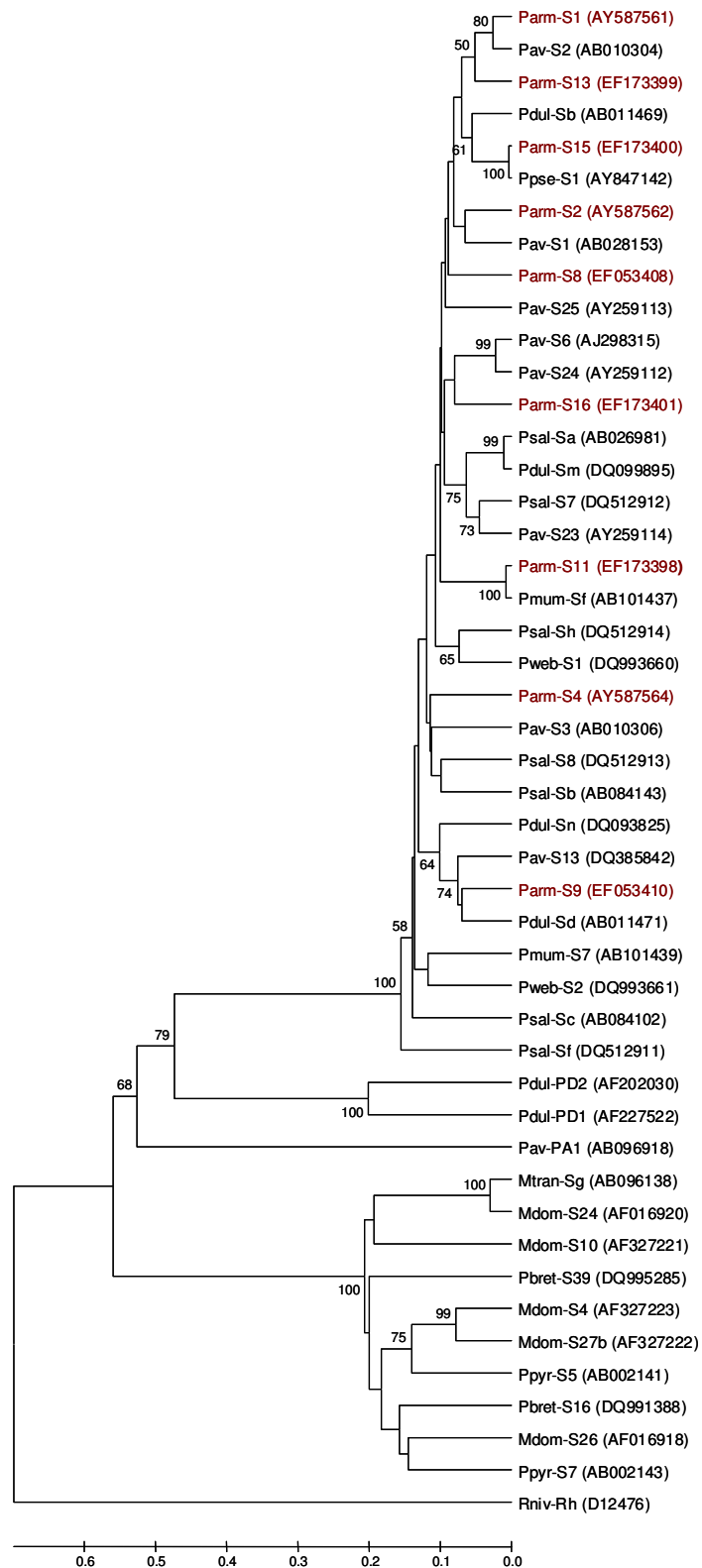
Ezenkívül mindegyik allél fragmentumhossz-analízise és gélelektroforézise alapján meghatároztuk a tizenhárom újonnan izolált és azonosított allél, valamint az öntermékenyülés kialakításában meghatározó jelentőségű S_C -RN-áz allél szerkezetét (25. ábra). Azoknak az intronoknak a hosszát (bp), ahol nem állt rendelkezésünkre pontos szekvenciaadat, az amplifikált fragmentumok és az ismert exonok mérete alapján becsültük meg. Az első intron hosszának variabilitása (110 és ~320 bp között) jóval kisebb mértékű, mint a második introné (118–2680 bp). Az egyes allélokban az első intron kisebb méretű, mint a második, ami alól csak az S_{12} (~170 bp és 169 bp) és az S_{18} -RN-áz allél (~230 bp és 118 bp) képez kivételt.



25. ábra. Az S_{8-20} - és S_C -RN-áz allélok szerkezete. Az üres téglalapok az exonokat, a vonalak az első és második intronokat jelölik. A DNS-szekvencia alapján meghatározott intronhosszakat folyamos, a becsült intronhosszakat szaggatott vonalak mutatják (bp).

A hét S -RN-áz allél cDNS-ből származó aminosav-szekvenciáit összevetve a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető más *Prunus*, *Malus* és *Pyrus* fajokból izolált S -RN-áz aminosav-szekvenciákkal filogenetikai analízist végeztünk (26. ábra). A csoportátlag eljárás (UPGMA) alapján készült dendrogramon a *Rhizopus* gombából izolált T_2 -típusú RN-áz a csoporton kívüli kontroll. A *Maloideae* alcsalád (*Malus* és *Pyrus* fajok) S -RN-áz alléljai jól elkülönülnek a *Prunoideae* fajok S -ribonukleáz enzimeitől. A *Prunusok* között a mandulából és cseresznyéből származó, az S -RN-ázokhoz hasonló szerkezetű, de nem a termékenyülési folyamatokban szerepet játszó, nem S -specifikus RN-áz enzimek (PD1, PD2 és PA1 „ S -like RNase”) szekvenciái jól elkülönülnek a csonthéjas fajok S -RN-áz alléljaitól.

A *Prunus* fajokból izolált allélok nem alkotnak monofiletikus csoportot: az egy fajhoz tartozó allélok nem kerültek egymás mellé a kladogramon. A *P. armeniaca* allélok egyes cseresznye, *P. pseudocerasus*, japánkajszi vagy mandula S -RN-ázokkal mutatják a legnagyobb mértékű homológiát, így a kajsziszekvenciák sem alkotnak elhatárolt, fajspecifikus csoportot. A bootstrap-analízis eredménye szerint a legszorosabb kapcsolat a kajszi S_{11} és japánkajszi S_f (100 %), kajszi S_{15} és *P. pseudocerasus* S_1 (100 %), illetve a kajszi S_1 és cseresznye S_2 -RN-ázok között volt kimutatható.



26. ábra. A *Rosaceae* családból származó S-RN-áz allélok aminosav-szekvencián alapuló filogenetikai analízise csoportátlag eljárás (UPGMA) alapján. A nóduszoknál feltüntetett bootstrap-értékek az 50 %-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöli. Az allélok neve mellett a szekvenciák nemzetközi adatbázisbeli (NCBI) azonosítószáma látható. Parm: *Prunus armeniaca*; Pav: *Prunus avium*; Pdul: *Prunus dulcis*; Psal: *Prunus salicina*, Ppse: *Prunus pseudocerasus*; Pmum: *Prunus mume*; Pweb: *Prunus webbii*, Mdom: *Malus × domestica*; Mtran: *Malus transitoria*; Ppyr: *Pyrus pyrifolia*, Pbret: *Pyrus × bretschnideri*, Rniv: *Rhizopus niveus*.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. *S*-genotípus meghatározása izoelektromos fókuszálással

A termékenyülési viszonyokat irányító *S*-genotípusok megismerésében McClure és mts. (1989) új dimenziókat nyitottak, amikor igazolták, hogy a bibe–pollen között lejátszódó saját/idegen felismerési reakció a bibeszálban kifejeződő ribonukleáz enzimekhez kötődik. A különböző allélváltozatok által kódolt ribonukleáz enzimek mérete közel azonos, de a reakció specificitása következtében aminosav-szekvenciájuk szükségszerűen különbözik egymástól kisebb-nagyobb mértékben. Ez alapján ezek az izoenzimek izoelektromos fókuszálással jó eséllyel szétválaszthatók egymástól. Termesztett gyümölcsfák közül első ízben japánkörte esetében számoltak be ilyen kísérletekről Sassa és mts. (1992), akik igazolták, hogy az *S*-RN-ázok alkalikus izoelektromos pontú fehérjék. Az izoelektromos fókuszálási protokollok továbbfejlesztésével Bošković és Tobutt (1996) a cseresznye *S*-genotípusok és a fajták zimogramja között egyértelmű korrelációt határoztak meg.

Kísérleteinket a kajszi esetében legmegfelelőbb izoelektromos fókuszálási protokoll kidolgozásával kezdtük meg. Eredményeink szerint a leghatékonyabb szétválást az 1750–1975 Vh körüli érték esetén kaptuk, ami nem bizonyult elegendőnek ahhoz, hogy a fehérjék elérjék izoelektromos pontjukat. Ez a technika tehát nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálásnak (NEpHGE = non-equilibrium pH gradient electrofocusing) tekinthető (O'Farrell és mts., 1977), amit korábban sikeresen alkalmaztak alma (Bošković és Tobutt, 1999), mandula (Bošković és mts., 1997b; 2003), cseresznye (Bošković és Tobutt, 2001) és kajszi (Burgos és mts., 1998) esetében is.

A NEpHGE-vizsgálatokkal négy (S_1 , S_2 , S_4 és S_C) korábban leírt (Burgos és mts., 1998) illetve kilenc új (S_8 – S_{16}) *S*-allélhoz kötődő ribonukleáz izoenzimet mutattunk ki. A levélkivonatokban a vizsgált pH-tartományokban nem volt kimutatható RN-áz aktivitás, vagyis a bibeszálakból készült kivonatok alkalikus RN-áz enzimjei szövetspecifikusak, ami szintén a termékenyülési folyamatokban játszott szerepükre utal. A más növényfajok, pl. japánkörte és cseresznye bibekivonatokból kimutatott, nem polimorf RN-áz sávok (Sassa és mts., 1992; Bošković és Tobutt, 1996) kajszinál nem voltak megfigyelhetők. A legtöbb fajta két, egymástól elkülönült izoenzimet mutatott, vagyis a vizsgált genotípusok heterozigóták voltak, ahogyan az a gametofitikus inkompatibilitási rendszer működése mellett várható. A NEpHGE-vizsgálatok során 27 fajta közül 3 fajtánál egy harmadik, kisebb aktivitású RN-áz izoenzim jelenléte is kimutatható volt, melyeket nem *S*-specifikus izoenzimeknek tekintettünk. Ezek az aspecifikus sávok az *S*-lókuszon kívül kódolt, egyéb

fiziológiai funkcióval rendelkező ribonukleáz enzimeket reprezentálják, vagy különböző poszttranszlációs módosulások következtében alakulnak ki; de az sem kizárható, hogy az enzimkivonatokban lejátszódó degradációs folyamatok hatására jelennek meg. Ehhez hasonló jelenséget írtak le Bošković és mts. (1997b) hosszan tárolt mandula bibekivonatok esetében. Az S_5 - és S_6 -allélokat hordozó spanyol és észak-amerikai fajták nem voltak hozzáférhetők, de ezek és az általunk azonosított allélok különbözősége később kétséget kizáróan igazolódott (Sutherland és mts., 2004a; Vilanova és mts., 2005).

A 'Ceglédi óriás' és 'Ligeti óriás' azonos S -genotípussal rendelkezik (S_8S_9). E fajták régóta ismert önmeddőségét és kölcsönös inkompatibilitását korábban a kedvezőtlen időjárás hatására képződő életképtelen pollenekkel magyarázták (Nyujtó és mts., 1985). Eredményeink feltárták a jelenség valódi genetikai hátterét, és alátámasztják a kajszi esetében szabadföldi beporzási kísérletek által leírt inter-inkompatibilitási csoport létezését (Szabó és Nyéki, 1991). A fajták azonos S -alléljai közös származásra utalhatnak, amit a mikroszatellit vizsgálatok is alátámasztanak (Romero és mts., 2003; Maghuly és mts., 2005). Kajszi esetében korábban két inter-inkompatibilitási csoportot írtak le. Az észak-amerikai 'Lambertin-1', 'Goldrich' és 'Hargrand' fajták tartoznak az I. csoportba, melyek genotípusa S_1S_2 (Egea és Burgos, 1996). A magyar Óriás fajtacsoport tagjai által alkotott II. csoportot jöllehet korábban írták le, mint az I. csoportot (Nyujtó és mts., 1985), ezek genotípusa (S_8S_9) csak munkánk révén vált ismertté.

Az öntermékenyülő 'Gönci magyarkajszi', 'Venus', 'Sulmona', 'Nyikitszkij', 'Mari de Cenad' és 'Marculesti 5/5' esetében a NEpHGE-vizsgálatok egyetlen közös izoenzimet mutattak ki. Ez utalhat arra, hogy e fajták mindegyike homozigóta az S_C -allélra nézve, vagy az alkalmazott vizsgálati paraméterekkel nem sikerült szétválasztani a két különböző allél által kódolt S -RN-áz fehérjét. A 'Marculesti 5/5' termékenyülési jellegét pollentömlő vizsgálattal nem lehetett egyértelműen megállapítani (Burgos és mts., 1997a), de gyümölcskötődése magyar és román ültetvényekben több éven át 10 % felett volt, ami öntermékenyülési képességét valószínűsíti (Cociu, 1993; Szabó és mts., 1999).

Az öntermékenyülő 'Bergeron', 'Mandulakajszi', 'Mamaia' és 'Konzervnij Pozdnij' különböző országok különféle nemesítési programjaiból származnak. Az S -lókuszra mindegyik heterozigótának bizonyult. A 'Mandulakajszi' fajtát már régóta részlegesen öntermékenyülőként jegyzik, mivel a gyümölcskötődési vizsgálatok geitonogámia esetén mindig alacsonyabb értékeket adtak, mint más öntermékenyülő fajtáknál, ugyanakkor terméskötődésük meghaladta az önmeddő fajtákét. Eredményeink kétséget kizáróan igazolták, hogy a 'Mandulakajszi' hordozza az öntermékenyülést biztosító S_C -haplotípust. A viszonylag rossz terméskötődést az abnormális virágfejlődés következtében kialakuló,

fejletlen termőjű virágok okozhatják. A hiányos vagy fejletlen termőjű virágok aránya néhány évben 70 %-nál is magasabbnak bizonyult (Surányi és Molnár, 1981).

A 'Harmat' ($S_{10}S_{11}$) és 'Korai zamatos' ($S_{12}S_{13}$) korai érésű fajták. A koraiság forrása közép-ázsiai genotípusoktól származik (Pedryc, 1996), így az önmeddőséget kialakító alléljaikat is ebből a génforrásból örökölték. A 'Korai zamatos' S_{13} -allélja megtalálható még a T-8 hibridben, valamint a 'Modesto' és 'Voszki' fajtákban. Ennek oka lehet, hogy a 'Korai zamatos' és T-8 genotípusok nemesítése a BCE Genetika és Növénynemesítés Tanszékének 'Modesto' és 'Voszki' fajtákat is magában foglaló szigetcsépi ültetvényében történt, így nem kizárt, hogy a 'Jubilar' illetve 'Salah' szabad megporzásából keletkezett genotípusok pedigréjében a 'Modesto' és 'Voszki' fajták is szerepelnek. Hasonló magyarázata lehet a 'Harmat' és a 'Voszki' közös S_{11} -alléljának, mely allél a többi vizsgált fajtában nem volt jelen. A 'Harmat' és a 'Voszki' közös allélja jól tükrözi, hogy mindkettő örmény genetikai vonalból származik (Pedryc, 1996). A 'Voszki' ugyan ukrán fajta, de a 'Sateni' szabad megporzásból eredő magonca, mely az irano-kaukázusi ökoföldrajzi kajszcsoportba tartozik (Mehlenbacher és mts., 1991).

A 'Zard', 'Auróra' és 'Kecs-psár' a NEpHGE II fókuszálási körülmények között egyetlen intenzív RN-áz sávot mutatott. Az 'Auróra' bizonyítottan önmeddő (Burgos és mts., 1997a), de közép-ázsiai származásuk következtében feltételezhetően a 'Zard' és a 'Kecs-psár' is az (Mehlenbacher és mts., 1991). Ez alapján nem lehetnek homozigóták az S -lókuszra. Burgos és mts. (1998) a 'Gitano' fajtánál szintén csak egy intenzív RN-áz sávot detektáltak, és nem találtak megfelelő Ampholine-kombinációt az alléltermékek szétválasztására. Az általunk kifejlesztett NEpHGE III protokoll sikeres szétválást eredményezett a 'Kecs-psár' esetében, melynek genotípusa $S_{15}S_Z$, míg a 'Zard' fajtáról igazolódott, hogy az S_{16} -allélt hordozza. Az 'Auróra' genotípusának megállapítása csak részben volt sikeres, egyik allélját S_X -ként jelöltük. Ez feltehetően azonos az S_1 -alléllal, különösen annak tükrében, hogy az S_1 nagyon gyakori az észak-amerikai fajták körében (Burgos és mts., 1998), de ennek igazolásához további vizsgálatok szükségesek.

A NEpHGE során alkalmazott 1750–1975 Vh helyett az egyes S -RN-ázok izoelektromos pontjának meghatározásához 2450 Vh-t használtunk, mely érték már elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a fehérjék a pH-gradiens gélben elérjék izoelektromos pontjukat. Érdekes módon, két esetben a különböző allélok által kódolt S -RN-áz izoenzimek (S_4 és S_{12} , illetve S_{13} és S_X) azonos izoelektromos pontot mutattak. Ennek oka lehet elméletileg, hogy a két izoenzimet azonos mennyiségű és minőségű aminosav alkotja, az allélok közti különbség pusztán ezek sorrendjében jelentkezik. Miután az S -ribonukleázok glikoproteinek (Anderson és mts., 1986), az sem zárható ki, hogy a fehérjék

közti töltéskülönbséget a szénhidrátláncok heterogenitása kompenzálja. Ezek az oldalláncok ugyanis jelentős mértékben befolyásolhatják az összetett fehérjék nettó töltését (Westermeier, 1993), amit először *Nicotiana alata* esetében Woodward és mts. (1992), japánkörte esetében Ishimizu és mts. (1996) igazoltak reverz fázisú HPLC-s elválasztást követő tömegspektrometriás vizsgálattal. Később Van Nerum és mts. (2001) kimutatták, hogy az alma S_{22} - és S_{25} -RN-áz enzimét kódoló allélok DNS-szekvenciája azonos, holott ezek fehérjetermékének izoelektromos pontja között 1,35 pH-értékbeli különbséget határoztak meg izoelektromos fókuszálással (Bošković és Tobutt, 1996). Ennek alapján föltételezték, hogy a két allél szénhidrátláncában jelentős eltérés lehet.

Hasonló jelenségre a kajszi S -RN-áz enzimek szerkezetében is számítani lehet. Négy kajszi S -RN-áz teljes DNS-szekvenciája ismert: S_1 , S_2 , S_4 (Romero és mts., 2004) és S_C (Vilanova és mts., 2006). A DNS-szekvenciából következtetett aminosav-szekvenciákra kiszámítható izoelektromos pontok (Toldo és Kindler, 1999) és az általunk izoelektromos fókuszálást követően gélből meghatározott értékek közötti különbség izoenzimenként igen eltérőnek bizonyult. A legkisebb különbség az S_4 -RN-áz esetében 0,055 pH egység volt, ezzel szemben a legnagyobb eltérés (0,751 pH) az S_2 esetében mutatkozott. Az aminosav-szekvenciából számított izoelektromos pont mind a négy vizsgált izoenzimnél 9,31 és 9,55 közötti értéknek adódott, míg ugyanezen RN-ázok esetében gélből meghatározva 9,22 és 10,06 közötti pI-értékeket kaptunk. Mindez alátámasztja, hogy az egyes S -RN-áz izoenzimek szénhidrátláncaiban jelentős mértékű eltérés lehet, továbbá megmagyarázza, miért alkalmazható sikeresen a NEpHGE-technika S -genotípusok meghatározására.

Az általunk kidolgozott NEpHGE I-III protokollok segítségével összesen 12 fajta teljes és 11 fajta részleges S -genotípusát tudtuk meghatározni.

6.2. S -RN-áz gén alapú, DNS-szintű genotípus-meghatározás

A ribonukleáz izoenzimek szétválasztásán és kimutatásán alapuló módszer legfőbb hátránya, hogy a vizsgálatokhoz generatív állapotú növényekre van szükség, amit a fák csak a 3–4 év hosszú juvenilis időszak után érnek el. Amennyiben a vegetatív szövetekből kivonható DNS alapján is meghatározható lenne az S -genotípus, az a kajszinemesítési programokban értékes időt és költséget takarítana meg a létrehozott hibridpopulációk korai szelekciója révén.

A csonthéjas gyümölcsfák S -lókuszában található ribonukleáz gén két intront tartalmaz. Tao és mts. (1999) három cseresznyeallél cDNS-ének szekvenciáját meghatározva a szignálpeptid, a C2 és az RC4 konzervatív régiókra tervezett primerekkel öt különböző allélt tudtak sikeresen megkülönböztetni. Az allélok elkülönítésére használt

megközelítés alapja, hogy az intronokat jelentős mértékű méretpolimorfizmus jellemzi, míg a környező exonrégiók (jelen esetben az RN-áz enzimaktivitásához nélkülözhetetlen régiók) szekvenciája konzervatív (Kiss és Endre, 1999). Ezekre a régiókra többféle primert terveztek, melyeket sikerrel használtak cseresznye (Wiersma és mts., 2001; Sonneveld és mts., 2003), mandula (Tamura és mts., 2000; Channuntapipat és mts., 2001; Ortega és mts., 2005), meggy (Yamane és mts., 2001; Bošković és mts., 2006), japánszilva (Beppu és mts., 2002; 2003), japánkajszi (Tao és mts., 2002) és kajszi (Sutherland és mts., 2004a; Vilanova és mts., 2005) esetében.

Az *S*-genotípusok meghatározásának alapja, hogy a diploid fajták PCR-analízise során felszaporított két különböző méretű fragmentum megfeleltethető egy-egy *S*-allélnak. Vizsgálataink kezdetekor *Prunus* fajok PCR-analíziséhez csak a Sonneveld és mts. (2003) által cseresznye *S*-allélok szekvenciájából tervezett primerek álltak rendelkezésre. Az 1. intronrégiót amplifikáló cseresznyeprimerekkel 16 allél közül 10, míg a 2. intronrégiót amplifikálókkal 11 allél volt kimutatható. Ez a közel 70 %-os hatékonyság jól tükrözi, hogy az *S*-ribonukleáz kódoló DNS-szekvenciák nagymértékben konzervatívák (Igic és Kohn, 2001), különösen a *Prunoideae* alcsaládon belül (Ma és Oliveira, 2002).

Az *S*-genotípusok meghatározása során a különböző fajtákban csak akkor tekintettünk két allélt azonosnak, ha azok *S*-RN-áz fehérjetermékeit azonos izoelektromos pont jellemezte, és a PCR mindkét intron esetében megegyező eredményt adott. A vitás esetekben szabadföldi termékenyülési vizsgálatot vagy DNS-szekvenálást végeztünk.

Az amplifikált fragmentumméreték jó összefüggést mutattak a Romero és mts. (2004) által BAC-könyvtárból szekvenált 3 allél intronméreteivel. Az 1. intront és a környező rövidebb exonrégiókat közrefogó primerpár az *S*₁-allél esetén 432 bp hosszú fragmentumot eredményezett, a szekvencia alapján következtetett intronhossz pedig 308 bp volt. A 2. intron esetében a fragmentumméret az *S*₁-allélnál 2393 bp, az *S*₂-nél 1374 bp, míg az *S*₄-nél 544 bp volt, a megfelelő pontos intronhosszak 1976, 706 és 164 bp (Romero és mts., 2004).

Sutherland és mts. (2004a) 22 cseresznye, mandula, japánkajszi, japánszilva és cseresznyeszilva *S*-RN-áz allél használatával olyan új degenerált primerpárt (EM-PC2consFD és EM-PC3consRD) terveztek, mely számos cseresznye- és mandulaallélon kívül a kajszi *S*₁–*S*₆ és *S*_C allélok esetén is sikeres amplifikációt adott. A C2 és C3 konzervatív régiókhoz kötődő primerek használatával minden allél kimutatható volt. Ráadásul, a kilenc, NEpHGE és cseresznyeprimerek alapján azonosított allélon (*S*₈–*S*₁₆) kívül további 4 új allél (*S*₁₇–*S*₂₀) azonosítása is lehetővé vált. Ennek oka lehet egyrészt, hogy a degenerált primereket több különböző oligonukleotid elegye alkotja, melyek közül

lehetőség nyílhat a precízebben illeszkedő primerek kötődésére. Ezenkívül a 2. és 3. konzervatív régiók közötti szakaszt szaporítják fel, szemben a cseresznyeprimerekkel, melyek egy hosszabb, a 2. és 5. konzervatív régiók közötti szakaszt amplifikálják. Ez a különbség igen jelentős lehet a viszonylag hosszú intront tartalmazó allélok esetén. Az EM-primerekkel a legnagyobb intront tartalmazó S_C - és S_8 -allélok is kimutathatók voltak, melyeket korábban a cseresznyeprimerekkel nem tudtunk amplifikálni.

Három fajtában ('Beliana', 'Sunglo' és 'Zard') csak egyetlen fragmentum amplifikálódott. Vilanova és mts. (2005) a 'Moniquí' és 'Sunglo' fajtákban szintén csak egy fragmentumot detektáltak. A jelenség, az úgynevezett preferenciális amplifikáció, konszenzus primerek használatakor gyakran előfordulhat, ha a primerek kötődési helyén a két célzott allél szekvenciája közt eltérés van, és a primerek illeszkedése, kötődésének lehetősége nem azonos a két allél esetén (Brace és mts., 1993).

Az intronméretek allélspecifikus variabilitása nemcsak a 2. intronra igaz, így az 1. intronrégió vizsgálata tovább pontosíthatja az allélok azonosítását és a genotípusok meghatározását. Mivel azonban minden *Prunus* faj esetében az 1. intron hossza jóval elmarad a 2. intron hosszától, a méretbeli variabilitás mértéke is sokkal kisebb (Sonneveld és mts., 2003; Ortega és mts., 2005; Vilanova és mts., 2005). A jobb felbontás érdekében a forward primereket (SRc-F, Vilanova és mts., 2005) fluoreszcens festékkel megjelöltük, és a PCR-fragmentumok méretét automata szekvenátorral határoztuk meg, ahogyan azt korábban japánkörte (Sawamura és mts., 2002), mandula (Ortega és mts., 2005) és cseresznye (Sonneveld és mts., 2006) esetében is eredményesen alkalmazták.

Vilanova és mts. (2005) szekvenálással meghatározták az általunk is használt primerekkel amplifikált fragmentumok méretét hét kajszai S -allél (S_1 - S_5 , S_7 és S_C) esetében. Az S_1 -allélnál 400, az S_2 -nél 327, az S_4 -nél 243, az S_C -nél 353 bp hosszúságot mértek, míg mi az S_1 esetében 401, az S_2 -nél 332, az S_4 -nél 244, míg az S_C -nél 355 bp hosszú fragmentumot mutattunk ki. A futtatási körülmények (pl. hőmérsékleti eltérések) és a fluoreszcens festékek megválasztása is befolyásolja a fragmentumoknak az automata szekvenátor kapillárisaiban jellemző mobilitását (Delmotte és mts., 2001; Weising és mts., 2005). Ez okozza, hogy a valóságos mérettől 1–4 nukleotiddal nagyobb fragmentumhosszat határoztunk meg, és ezért minden egyes vizsgálatnál fontos a kontroll minták használata (Weising és mts., 2005; Sonneveld és mts., 2006). Az általunk azonosított új allélok közül 10 allél első intronrégiójának mérete egyértelműen különbözik a korábbiaktól, három allélhoz azonban nem tudtunk pontos méretet rendelni. Ezek meghatározásához az 1. intronrégió szekvenálása szükséges az adott allélokot hordozó fajták esetében ('Kecs-psár' és 'Zard'). Az S_{15} - vagy S_{18} -allélok egyike azonos hosszúságú

fragmentumot eredményezett, mint az S_2 (332 bp). Mivel az S_1 - és S_7 -allélok is azonos fragmentumméret (400 bp) jellemzi (Vilanova és mts., 2005), továbbá több allél esetében a második intronrégió mérete (pl. S_9 és S_{20} ; S_4 és S_{18}) is hasonló, a pontos genotípus-meghatározásokhoz feltétlenül ajánlható mindkét intron markerezése, a cseresznye és mandula esetében alkalmazott gyakorlatnak megfelelően (Sonneveld és mts., 2003; Ortega és mts., 2005; Sonneveld és mts., 2006).

Jó példa erre a 'Ceglédi Piroska' és 'Korai piros' fajtákban azonosított S_{20} -allél esete. Ennek agarózgélben meghatározott második intronmérete az S_9 -RN-áz intronméretével megegyezőnek tűnt, hiszen az allélok szekvenálását követően ezek mérete között mindössze 9 bp-os különbség volt kimutatható (25. ábra). A 'Ceglédi Piroska' bizonyítottan önmeddő (Mády és Szalay, 2003; Szabó és mts., 2003), ennek alapján feltételezhető genotípusa S_8S_9 lenne. A fajta elvileg a 'Ceglédi óriás' (S_8S_9) × 'Magyarkajszai C. 1789' (feltételezhetően $S_C S_8$) keresztezésből származik, de ebből a kombinációból nem keletkezhet S_8S_9 genotípusú hibrid, csak $S_C S_8$ vagy $S_C S_9$, vagyis kizárólag öntermékenyülő utód jöhetne létre. Az 1. intronrégió PCR-analízisét elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az S_9 -allélra jellemző 203 bp-os fragmentum helyett a 'Ceglédi Piroska'-ban egy 222 bp-os fragmentum található az S_8 -allélra jellemző 355 bp-os fragmentum mellett. Ezen allél SP-C3 régiók közti szakaszának DNS-szekvenciáját meghatároztuk, ami igazolta, hogy az allél nem azonos az S_9 -RN-ázzal, ezért S_{20} -ként jelöltük. Ráadásul ugyanezt az allélt mutattuk ki a 'Korai piros' fajtában. A 'Korai piros' $S_C S_{20}$ genotípusát irányított keresztezéssel is igazoltuk (10. táblázat). Ezt az allélt csak ebben a két fajtában tudtuk kimutatni a vizsgált 74, ebből 22 magyar fajta közül, ami alapján feltételezhetjük, hogy a 'Ceglédi Piroska' pedigréjében pollenadóként a 'Magyarkajszai C. 1789' helyett a 'Korai piros' szerepel, feltéve, hogy a dolgozatban nem vizsgált, eredeti pollenadó 'Magyarkajszai C. 1789' klónfajta genotípusa megegyezik a többi Magyarkajszai S -genotípusával. E feltételezés bizonyításához azonban további vizsgálatok szükségesek.

Érdekes jelenségként a korábbi vizsgálatok szerint homozigóta $S_C S_C$ genotípusú, öntermékenyülő 'Pannónia' kajszifajta 1. intronrégiójának SRc-F/R primerekkel történő PCR-amplifikálása két különböző hosszúságú fragmentumot eredményezett. A 355 bp méretű fragmentumhoz képest a kisebb, 336 bp-os fragmentum közel fele mennyiségben volt kimutatható. Ez a 336 bp-os fragmentum minden olyan fajta esetében jelen volt, amely az S_C - vagy S_8 -allélokot hordozza. A két allélból amplifikált fragmentumok DNS-szekvenciáját meghatározva kiderült, hogy a forward primer kötődési helyétől downstream irányban 19 bp távolságra egy hasonló szekvenciarészlet található, mely lehetőséget adhat

a primer kötődésére. Ennek következtében jelenik meg a 336 bp-os PCR-műtermék. A többi allél esetében műtermékek zavaró hatásával nem kellett számolni.

A 'Bergeron' és 'Konzervnij Pozdnij' fajták keresztezésével nyert hibridekben vizsgáltuk az S -allélok öröklődését, illetve igazoltuk, hogy mindkét öntermékenyülő szülő egy azonos, S_2 inkompatibilitási allélt hordoz. Az utódok genotípusának hasadási aránya a mendeli szabályoknak megfelelő volt, ahogyan azt Burgos és mts. (1998) is megállapították. A keresztezés nemesítési szempontból sem jelentéktelen, mert mindkét fajta kései érésű, gyümölcsük mutatós, nagyméretű, továbbá minden hibrid biztosan öntermékenyülő lesz. Ráadásul a hibridek fele homozigóta $S_C S_C$ genotípusú, így a termékenyülés szempontjából kiváló keresztezési partnerek, mert utódaik mindegyike öntermékenyülő lesz függetlenül attól, hogy a keresztezési partner milyen S -genotípusú. A 'Mandulakajsi'-ből izoláltunk egy mutáns S_2 -allélt, mely RHV-régiójának közepén egy nem szinoním SNP található. Annak eldöntésére, hogy ez a pontmutáció kihatással van-e az allél funkciójára, további vizsgálatok szükségesek.

Az I. inkompatibilitási csoportot további fajtákkal bővítettük, ugyanis a 'Goldrich'-hez és a 'Hargrand'-hoz hasonlóan $S_1 S_2$ genotípusúak a 'Ninfa' és 'Priboto' fajták. Mivel a 'Priboto' a 'Goldrich' rügymutációjaként jött létre, azonos S -genotípusuk nem meglepő (12. táblázat).

Eredményeink alapján a két korábban megismert inkompatibilitási csoport mellett egy további, III. inkompatibilitási csoportot írtunk le, mely az 'Antonio Errani' és a 'Harcot' fajtákat tartalmazza, ezek genotípusa $S_1 S_4$.

12. táblázat. Kajszi fajták inter-inkompatibilitási csoportjai és az univerzális pollenadókat magába foglaló öntermékenyülő és önmeddő genotípusok. Az aláhúzott fajták genotípusai az alábbi forrásmunkákból származnak: Egea és Burgos (1996), Burgos és mts. (1998), Albuquerque és mts. (2002), Sutherland és mts. (2004a)

Csoport	Fajta	S-genotípus
I. inter-inkompatibilitási csoport	<u>Goldrich</u> , <u>Hargrand</u> , <u>Lambertin-1</u> Ninfa, Priboto	S_1S_2
II. inter-inkompatibilitási csoport	Ceglédi óriás, Ligeti óriás	S_8S_9
III. inter-inkompatibilitási csoport	<u>Harcot</u> Antonio Errani	S_1S_4
0. csoport: univerzális pollenadók	Ananasznij cjurpinszkij ($S_C S_C$); Borsi-féle kései rózsa ($S_C S_C$); Ceglédi kedves ($S_C S_C$); <u>Currot</u> ($S_C S_C$); <u>Ginesta</u> ($S_C S_C$); NJA-8 ($S_C S_C$); Nyujtó Ferenc emléke ($S_C S_C$), <u>Palau</u> ($S_C S_C$); Pannónia ($S_C S_C$); Pasinok ($S_C S_C$); Rózsakajsz C.1406 ($S_C S_C$); Sirena ($S_C S_C$); Sulmona ($S_C S_C$); Zaposzdlje ($S_C S_C$) <u>Mauricio</u> ($S_C S_1$); Bayoto ($S_C S_2$); Bergeron ($S_C S_2$); Budapest ($S_C S_2$); <u>Canino</u> ($S_C S_2$); Konzervnij Pozdnij ($S_C S_2$); Mamaia ($S_C S_2$); Mandulakajsz ($S_C S_{2m}$); <u>Pepito</u> ($S_C S_2$); Rakovszky ($S_C S_2$); Roxana ($S_C S_2$); Toyuda ($S_C S_2$) <u>Colorao*</u> ($S_C S_5$); <u>Rial Fino</u> ($S_C S_6$); <u>Beliana</u> ($S_C S_7$) Andornaktályai magyarkajsz ($S_C S_8$); Csacsanszko zlato ($S_C S_8$); Crvena ungarska ($S_C S_8$); Darunek malahojeva ($S_C S_8$); Effekt ($S_C S_8$); Gönci magyarkajsz ($S_C S_8$); Kászna ungarska ($S_C S_8$); Krimszkij Amur ($S_C S_8$); Magyarkajsz C. 235 ($S_C S_8$); Marculesti 5/5 ($S_C S_8$); Nagygyümölcsű magyarkajsz ($S_C S_8$); Nyikitszkij ($S_C S_8$); Paksi magyarkajsz ($S_C S_8$); Pisana ($S_C S_8$); Venus ($S_C S_8$) <u>Ceglédi arany</u> ($S_C S_9$); <u>Ceglédi bíborkajsz</u> ($S_C S_9$); <u>Korai piros</u> ($S_C S_{20}$); <u>Mari de Cenad</u> ($S_C S_{19}$); <u>Modesto</u> ($S_C S_{13}$) <u>Ceglédi Piroska</u> ($S_8 S_{20}$), <u>Harmat</u> ($S_{10} S_{11}$); <u>Kecs-psár</u> ($S_{15} S_{18}$); <u>Korai zamatos</u> ($S_{12} S_{13}$); <u>Moniquí</u> ($S_2 S_6$); <u>Priana</u> ($S_2 S_7$); <u>Sunglo</u> ($S_2 S_3$); T-8 ($S_{13} S_{14}$); <u>Voszki</u> ($S_{11} S_{13}$)	

*A 'Colorao' fajtát S-genotípusa alapján Vilanova és mts. (2005) az univerzális pollenadókhöz sorolták, de figyelmen kívül hagyták, hogy a fajta hímsteril (Burgos és mts., 1998)

Albuquerque és mts. (2002) megállapították, hogy a kajszi *S*-lókuszának variabilitása a többi *Prunus* fajhoz képest korlátozott mértékű, hiszen mindössze nyolc allélt tudtak kimutatni mediterrán és észak-amerikai fajtákból. Különösen érdekessé teszi e tényt, hogy almában mindezidáig 29 (Broothaerts és Van Nerum, 2003; Matityahu és mts., 2005), természetett cseresznyefajtákban 14 (Sonneveld és mts., 2003; Békefi és mts. 2003), meggyfajtákban 14 (Hauck és mts., 2002; 2006), mandulában 29 (Ortega és mts., 2005, 2006) *S*-allélt írtak le. Vizsgálataink során tizenhárom új *S*-allélt azonosítottunk a kelet-európai és közép-ázsiai kajszi genotípusokban, mellyel az ismert kajsziállélok számát 21-re növeltük, ráadásul kínai fajtákban további 13 allélt azonosítottunk. Eredményeink ennek megfelelően nem igazolták Albuquerque és mts. (2002) megállapítását, annak érvényessége mindössze az általuk vizsgált amerikai és európai fajták esetében fogadható el, melyek a korlátozott mértékű fenotípusos variabilitást mutató európai ökoföldrajzi csoportba tartoznak (Kosztina, 1970; Mehlenbacher és mts., 1991). A hazai nemesítési programokban kívánatos jellegek (pl. fagyűrűs, korai és kései érés) kialakítása érdekében használt ázsiai szülőpartnerek (Pedryc, 2003) jelentősen megnövelték az *S*-lókusz variabilitását.

Az *S*-RN-áz gén első és második intronjának EM-primerekkel végzett PCR-analízisével 22 fajta teljes és 3 fajta részleges *S*-genotípusa volt meghatározható. A PCR-fragmentumok szekvenálása további 5 fajta esetében segítette a genotípusok tisztázását. Sok esetben azonban a genotípus csak a termékenyülési fenotípus ismeretében volt eldönthető, mivel az *S_C*- és *S₈*-RN-ázok intronméretei azonosak.

6.3. Az öntermékenyülés molekuláris háttere

Mint minden *Rosaceae* családba tartozó gyümölcsfa esetében, a kajszinál is érdekes kérdés, hogy az öntermékenyülő fajták hogyan alakulhattak ki, illetve, hogy az öntermékenység hátterében milyen molekuláris változások húzódnak meg. Mivel izoenzim-vizsgálatokkal egyértelműen kimutatható volt, hogy a heterozigóta öntermékenyülő fajták két különböző *S*-RN-ázzal rendelkeznek, igazolódott, hogy a kajszinál nem az *S*-ribonukleáz enzim aktivitásvesztése okozta az öntermékenyülést, ahogyan a japánkörte és a mandula esetében (Sassa és mts., 1992; Bošković és mts., 1997b).

Vizsgálataink alapján kiderült, hogy az *S_C*- és *S₈*-RN-áz izoenzimek egyetlen NEpHGE-protokoll alapján sem voltak szétválaszthatók, izoelektromos pontjuk egyaránt 9,22-nek adódott. Mindez önmagában nem ad lehetőséget messzemenő következtetések levonására, hiszen mint láttuk, az izoelektromos pontot a szénhidrát oldallánc is

befolyásolhatja. Albuquerque és mts. (2002) például az S_C - és S_7 -RN-ázok esetében megegyező elektroforetikus mobilitást tapasztaltak, de a későbbi DNS-vizsgálatok nem igazolták e két allél azonosságát (Vilanova és mts., 2005).

Az S_C - és S_8 -RN-áz allélok PCR-analízise azonban arra is rávilágított, hogy e két allél mindkét intronrégiójának mérete megegyezik, ráadásul az első intronrégiók szekvenciája is azonos volt. Miután az intronok nem kifejeződő szekvenciariészletek, a funkcionális azonosság igazolásához nélkülözhetetlen volt az S_C - és S_8 -RN-áz allélok cDNS-szekvenciájának meghatározása a szignálpeptidtől a C5 régióig. Ez a szakasz tartalmazza az 5 konzervatív régió közötti 5 variábilis és egy hipervariábilis régiót (Ortega és mts., 2006).

A 'Pannónia' S_C - és a 'Ceglédi óriás' S_8 -RN-ázok mindössze egyetlen aminosavban különböztek a szignálpeptidben, míg a hipervariábilis régióik teljesen megegyeztek. A 'Pannónia' és 'Currot' S_C érett fehérjeterméke (a szignálpeptid nélkül) csak 98,2 %-os homológiát mutatott, de a specifikus felismeréshez nélkülözhetetlen hipervariábilis régióban (Matton és mts., 1997) ezek között sem volt különbség. Az S_C -allélt hordozó spanyol és magyar fajták öntermékenyülési képessége jelentős mértékű (Burgos és mts., 1997a; Nyujtó és mts., 1985), vagyis feltehetően ez a 3 aminosavnyi különbség nem befolyásolja az S_C -RN-áz enzimek funkcióját. Az S_C - és S_8 -RN-ázok cDNS-ének összeillesztése az S_C genomi DNS-szekvenciájával lehetőséget adott az 1. intron méretének (258 bp) és pozíciójának, illetve az exonok aminosavsorrendjének pontos meghatározására. Vilanova és mts. (2006) cDNS-szekvencia ismeretének hiányában az 1. intront 260 bp hosszúnak írták le, ennek következtében a C1 előtti szakaszon helytelen aminosavsorrendet állapítottak meg (19. ábra).

Annak felmérésére, hogy az allélok szekvenciáinak azonossága vagy különbözősége befolyásolja-e az enzimaktivitást, a Cuatrecasas és mts. (1967) alapján kidolgozott gyors és egyszerű ribonukleáz-aktivitás mérést használtuk, kisebb módosításokkal. Ennek alapja, hogy Juárez-Díaz és mts. (2006) egy tioredoxin *h* fehérjét izoláltak, melynek expressziója önméddő dohányokban közel 6-szorosa volt az öntermékenyülőkhöz viszonyítva. Igazolták továbbá, hogy ez a fehérje *in vitro* képes az S -RN-ázok redukálására. Mindez arra utalt, hogy az RN-áz enzim stabilitásához és/vagy aktivitásához bizonyos mértékben redukzív körülményekre lehet szükség. A kivonópuffert 2-merkaptotetanollal, a reakcióelegyet dithiothreitolal kiegészítve a bibekivonatokban jól mérhető ribonukleáz aktivitást kaptunk.

Az egyes fejlődési stádiumokban és a különböző S -genotípusokban jelentős enzimaktivitás-különbséget mértünk. Az aktivitás a virágnyílást közvetlenül megelőzően, fehérbimbós állapotban nagyobb volt, mint a korábbi fázisokban, alátámasztva, hogy a

virágfejlődés során az *S*-RN-áz gén expressziója növekszik (Anderson és mts., 1986; Tao és mts., 1999; Feng és mts., 2006). Egyező *S*-genotípusú fajtákban közel azonos mértékű specifikus aktivitást határoztunk meg, míg a különböző allélokat hordozó fajták összes RN-áz aktivitásában jelentős eltéréseket tapasztaltunk. A *Nicotiana* és *Petunia* bibeszálakból izolált egyes *S*-RN-áz izoenzimek aktivitása allélonként igen eltérőnek bizonyult, a különbség mértéke pedig egyértelműen összefüggött az izoenzimek aminosav-szekvenciájában megmutatkozó eltérés mértékével (McClure és mts., 1989; Singh és mts., 1991). A kajszai bibekivonatokban mért összes specifikus (fehérjemennyiségre vonatkoztatott) RN-áz aktivitás a különböző *S*-genotípusú (legalább az egyik *S*-allél-termékben különböző) kajszifajták esetében eltérő volt. Ezzel szemben az egyező *S*-genotípusú (két azonos *S*-allél-terméket hordozó) fajtáknál közel azonos RN-áz aktivitást mértünk. Ezek alapján feltételezhető, hogy a *Nicotiana* és *Petunia* *S*-RN-ázokhoz hasonlóan a különböző allélok által kódolt kajszai *S*-RN-ázok esetében is összefüggés mutatkozik a szekvencia és enzimaktivitás között, bár a kísérletünkben mért összes ribonukleáz aktivitás mértékét a bibekivonatok nem *S*-specifikus ribonukleázai is befolyásolhatták. Az $S_C S_9$ és $S_8 S_9$ genotípusú bibék azonos enzimaktivitása mégis arra utal, hogy az S_C -RN-ázt az inkompatibilis fajták izoenzimjeihez hasonló nagyságrendű enzimaktivitás jellemzi, továbbá az S_C - és S_8 -RN-ázok megegyező mértékű affinitást mutatnak a szubsztrát *Torula* élesztő RNS iránt, ami további biokémiai bizonyítékot szolgáltat a két allél azonosságához.

Az S_C -haplotípus pollenkomponensében feltételezett mutáció funkcionális bizonyítására irányított szabadföldi keresztezést végeztünk. Ebben segítségünkre volt, hogy az öntermékenyülő 'Ceglédi arany' ($S_C S_9$) egy közös inkompatibilitási allélt (S_9) hordoz az önmeddő 'Ceglédi óriás' ($S_8 S_9$) fajtával. Amikor a 'Ceglédi arany' fajtát a 'Ceglédi óriás' pollenjével poroztuk be, nem kaptunk gyümölcskötődést, és a bibeszálakban a 'Ceglédi óriás' pollentömlői az inkompatibilis pollentömlőkre tipikusan jellemző tüneteket mutattak. A reciprok keresztezés és a 'Gönci magyarkajszai' × 'Ceglédi óriás' keresztezés közel 40 %-os gyümölcskötődést eredményezett, vagyis kizárható, hogy a 'Ceglédi arany' × 'Ceglédi óriás' keresztezés sikertelenségét a 'Ceglédi óriás' hímsterilitása, vagyis életképtelen pollenjei okozzák. Eredményeink továbbá egyértelműen igazolják, hogy az öntermékenyülést okozó S_C -haplotípus az S_8 -haplotípus pollenkomponens SFB génjében bekövetkezett mutáció révén alakult ki, ami az SFB₈-allél funkcióvesztéséhez vezetett.

Az inkompatibilis és kompatibilis keresztezésekből származó gyümölcsök fejlődésében a 21. napon jelentős különbség volt. A megporzott, de termékenyülés nélkül

fejlődő gyümölcsök egy ideig a fán maradnak, szemben a megporzatlan bibékkel, melyek a szíromhullást követően elszáradnak (Peters, 1916). A fejlődő gyümölcsök folyamatos nyomon követésével határoztuk meg a gyümölcskötődési arányok megállapításának optimális idejét (a 60. nap). A tesztkeresztezéseket két egymást követő évben is elvégeztük, mert az időjárási körülmények szintén befolyásolhatják a gyümölcskötődést (Nyujtó és mts., 1985).

A *P. armeniaca* és *P. mume* F-box gén konzervatív szekvenciái alapján degenerált primereket terveztünk a Vaughan és mts. (2006) által cseresznye esetében alkalmazott megközelítés szerint. A 'Ceglédi óriás', 'Ceglédi arany', és 'Pannónia' fajtákban egy vagy két fragmentumot amplifikáltunk. A fragmentumok szekvenálása alapján az SFB₈ és SFB_C 100 %-ban azonosnak bizonyult, kivéve egy, az SFB_C-ben előforduló 358 bp méretű inszerciót, melyet egy spanyol kutatócsoport (IVIA, Valencia) velünk egy időben azonosított az öntermékenyülő 'Currot' fajtában (Vilanova és mts., 2006). Az eredeti allél (SFB₈) és mutáns változatának (SFB_C) összevetésével igazoltuk, hogy a magyar fajták által hordozott SFB_C-allélban az inszerció helye azonos a spanyol kutatók által leírt pozícióval.

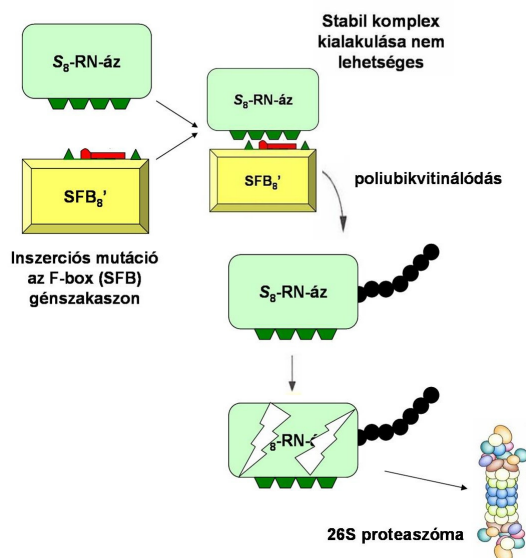
Az inszertált szakasz két szélén a transzpozonokra jellemző ITR (fordítva ismétlődő) szekvenciák találhatók. A BlastN vizsgálat (Altschul és mts., 1990) jelentős mértékű (82 %) homológiát tárt fel egy őszibarack BAC-könyvtárbeli szekvenciával és a *P. salicina* S_n-RN-ázzal (77 %). Érdekes, hogy az öntermékenyülést okozó, az S-allélok funkcióvesztését előidéző spontán mutációk hátterében számos esetben ilyen transzpozonszerű szakaszok beékelődése áll. A japánkajszi SFB_f-alléljában egy 6,8 kbp hosszú inszerció járt hasonló következményekkel, melynek két határán egy-egy, a retrotranszpozonok LTR-szekvenciájára (hosszú terminális ismétlődés) emlékeztető, 396 bp hosszú szakasz található (Ushijima és mts., 2004), míg az egyik őszibarack SFB-allélnál egy 5 bp-os inszerció direkt ismétlődő szekvenciája utal a transzpozíciós eredetre (Tao és mts., 2007).

Az SFB₈ és az OriSFB_C („eredeti”: inszerció nélküli) allélok csak egyetlen, az F-box régióban található aminosavban különböztek egymástól, míg a 'Pannónia' és 'Currot' fajták SFB_C-alléljába ékelődő inszerciók között kétnukleotidos eltérést mutattunk ki. Ezáltal a cseresznyénél használt jelölési rendszer alapján (S₃' és S₄') a kajszi S_C-haplotípusa valójában az S₈'-haplotípusnak felel meg, ahol a vessző a pollenkomponens génben bekövetkezett mutációra utal. Az inszertálódott szakasz legelső tripletjénél megtalálható stop kodon hatására egy funkcióképtelen F-box fehérje transzlálódik, amelyből hiányoznak a specifikus felismerésért felelős HVa és HVb hipervariábilis régiók (Ikeda és mts., 2004a). A cseresznye öntermékenyülését a mutációs nemesítés során röntgensugárzással kezelt pollenanyasejtekből származó pollenszemek örökítették át az

utódokra (Lewis és Crowe, 1954). Az SFB₄'-allélnál egy négybázispáros deléció okozta kereteltolódás, míg az SFB₃'-allélnál a teljes gén deléciója következett be (Ushijima és mts., 2004; Sonneveld és mts., 2005).

Sonneveld és mts. (2005) a cseresznye SFB₃'-allélt hordozó 'Alex' fajta vizsgálatával jelentős mértékben módosították az öntermékenyülés molekuláris modelljéről alkotott képünket. A korábbi modell (Ushijima és mts., 2004) szerint az SFB fehérje felelős az S-RNázok poliubikvitinálásáért és degradálásáért. Ebben az esetben azonban az SFB₃'-allélt hordozó cseresznyefajtát univerzális inkompatibilitás jellemezné, hiszen a mutáció az SFB génszakasz deléciójához vezetett, vagyis az SFB₃ fehérje nem expresszálódik a pollentömlőkben. Miután az SFB₃'-allélt hordozó fajták ezzel szemben öntermékenyülők, a szerzők hipotézise szerint nem az SFB felelős az S-RN-ázok lebontásáért, hanem egy, pollentömlőkben működő általános degradációs mechanizmus. Az új modell szerint valamennyi S-RN-áz lebomlik a pollentömlőben, kivéve azokat, melyeket a saját vagy genetikailag azonos allél által kódolt SFB fehérjékkel történő specifikus kapcsolódás megvéd a degradációtól. A kajszi öntermékenyülése ezen modell működése esetében úgy képzelhető el, hogy a sérült SFB_C fehérje nem ismeri fel az S₈-RN-ázt sajátjaként, nem képes azzal szoros, allélspecifikus kapcsolatot létesíteni, így a szabadon maradt S₈-RN-ázok degradálódnak a 26S proteaszómában (27. ábra). Ennek következtében a fejlődő pollentömlők rRNS-molekulái sértetlenek maradnak, így a fehérjeszintézis és a tömlők növekedése, valamint a termékenyülés genetikailag akadálytalan.

A modell értelmében az SFB az inkompatibilitási reakció specificitását határozza meg, de nem ubikvitin-ligázként működik. Jóllehet az SFB-ben található F-box régió az E3 ubikvitin-ligáz enzimkomplexeknek is része lehet (Vierstra, 2003), az SFB feltételezett ubikvitin-ligáz aktivitását a mai napig nem bizonyították. Az általános degradációs mechanizmus azonban feltehetően az ubikvitin/26S proteaszóma rendszer részvételével valósul meg, amit Qiao és mts. (2004) proteaszóma-inhibitorokkal végzett kísérletei is igazolnak. Sims és Ordanic (2001) *Petunia hybrida* növényből izolált egy pollenben kifejeződő, RING-finger domént tartalmazó fehérjét, mely nem allélspecifikus módon kapcsolódik az S-RN-ázokhoz. Számos RING-finger domént tartalmazó fehérjéről szintén igazolódott, hogy az F-box fehérjékhez hasonlóan szerepük lehet az E3 ubikvitin-ligáz komplexekben. Elképzelhető, hogy a *Prunus* fajokban is létezik egy hasonló, eddig nem azonosított RING-finger domént tartalmazó fehérje, ami az általános degradációs mechanizmus megvalósulásáért felelős.



27. ábra. A kajszi öntermékenyülését irányító folyamatok lehetséges molekuláris modellje. A pollenkomponens SFB₈-allélba ékelődő inszerció hatására a HVa és HVb régiókat nélkülöző, funkcióképtelen SFB₈' fehérje nem ismeri fel sajátként a bibeszálból belépő S₈-RN-ázokat, így azokkal nem képez szoros, allélspecifikus kapcsolatot. A szabadon maradt S₈-RN-áz enzimeket a pollentömlő citoplazmájában működő ubikvitin/26S proteaszóma rendszer lebontja, így a pollen rRNS-e sértetlen marad, a fehérjeszintézis és a tömlő növekedése akadálytalan lesz.

A 'Ceglédi óriás' fajtából izoláltunk két nem *S*-lókusz-specifikus F-box fehérjét is, melyek a *Petunia* SFB fehérjékkel és a *Prunus* SLFL fehérjékkel kicsi (kb. 25 %), a *Prunus* SFB fehérjékkel nagyobb mértékű (>50 %) homológiát mutatnak. Az F-box 1 szekvenciája 99,9 %-ban, az F-box 2 pedig 99,1 %-ban volt azonos a 'Canino' és 'Goldrich' fajtákból azonosított, hasonló fehérjékkel (Vilanova és mts., 2006). A két allél DNS-szekvenciája között 98 %-os homológia volt kimutatható, ami megfelel a Vilanova és mts. (2006) által meghatározott értéknek. Biokémiai funkciójuk jelenleg nem ismert, de mindkét allél esetében mutáció nyomait fedezték fel, ami alapján feltételezhető, hogy eredeti funkciójuk módosult vagy elveszett. Vilanova és mts. (2006) ezek alapján úgy vélik, hogy a kajszi F-box 1 és 2 fehérjék nem játszanak szerepet az inkompatibilitási reakciókban.

6.4. Az F-box gén alapú *S*-genotípus-meghatározás

Az öntermékenyülő magoncok korai kiválogatásához az *S_C*-haplotípusra specifikus primer szükséges. Vilanova és mts. (2005) szerint az általuk tervezett, *S*-RN-áz allélokot amplifikáló primerek alkalmasak lehetnek erre a célra, hasonlóan a mandulánál sikerrel alkalmazott módszerhez (Sánchez-Pérez és mts., 2004). Mindez azonban csak akkor lehetséges, ha bizonyos, hogy az öntermékenyülést előidéző, mutáns allél eredeti, nem

mutáns változata nincs jelen a vizsgált minták között. Ugyanis ha mindkét haplotípus jelen van, azok *S*-RN-áz alléljainak szerkezete, következésképpen PCR-mintázatuk tökéletesen azonos lesz. Ezt a bizonytalanságot úgy küszöbölhetjük ki, ha közvetlenül arra a génre (SFB) tervezünk primert, amelyik az öntermékenyülést előidéző mutációt hordozza ugyanúgy, mint cseresznye esetében (Zhu és mts., 2004; Sonneveld és mts., 2005).

A 3 kajszai és 3 japánkajszai allél szekvenciája alapján tervezett AprSFB-F1/R degenerált primerpár az SFB-gén elejétől a végéig, közel a teljes kódoló részt amplifikálja 27 (18+9) nukleotid kivételével. Miután a mutáns SFB_C-allél egy 358 bp-os inszerciót tartalmaz, a primerek által felszaporított fragmentum mérete 1419 bp, szemben az inszerciót nem tartalmazó, eredeti alléllal, melynek mérete 1061 bp. A PCR-analízist követően a mintákat egy egyszerű, agarózgélben történő szétválasztással értékelhetjük. Az általunk tervezett primerpár valamennyi allél esetében sikeres amplifikációt adott, és a PCR-mintázat alapján következtetett genotípus minden esetben összhangban volt a korábbi szabadföldi gyümölcskötődési vagy pollentömlő-növekedési vizsgálatok során meghatározott termékenyülési fenotípussal (Nyujtó és mts., 1985; Burgos és mts., 1997a). Azokban az esetekben, ahol ilyen adatok nem álltak rendelkezésre, a PCR-vizsgálat ellenőrzése érdekében szabadföldi vizsgálatokat végeztünk az öntermékenyülési képesség meghatározására.

A primerpár kodomináns markerként használható, mert a homozigóta és heterozigóta genotípusok egyaránt kimutathatók. Ez a tény jelentősen fokozza nemesítési programokban történő használhatóságukat, szemben a Zhu és mts. (2004) által tervezett, BFP200 és BFP201 primerekkel, melyek specifikus módon csak az SFB₄'-allélt amplifikálják. Miután számos tényező okozhatja a PCR-amplifikáció sikertelenségét, az ezen primerekkel kapott eredmények csak ún. belső kontrollok használatával lesznek megbízhatóak. A szerzők a Sonneveld és mts. (2003) által az *S*-RN-áz gén allél-specifikus PCR-vizsgálatához használt fenilalanin-ammónia-liáz gént amplifikáló, kontroll primerek használatát javasolták. Mindez azonban lényegesen bonyolultabbá teszi a PCR-analízist, szemben az általunk kidolgozott, egyetlen konszenzus primerpárral elvégezhető, egyszerű vizsgálattal. Az általunk tervezett primerek használhatóságát 35 fajta *S*-genotípus-vizsgálatával támasztottuk alá. A primerek valamennyi fajta esetében jól működtek, ráadásul 32 fajta pontos genotípusának meghatározása csak e primerekkel volt lehetséges.

Különösen fontos, hogy korábban az *S*-RN-áz 1. és 2. intronrégiójának PCR-analízisével csak akkor tudtunk különbséget tenni az *S*_C- és *S*₈-allélok között, ha szabadföldi gyümölcskötődési vizsgálatokkal vagy pollentömlő analízissel ellenőriztük a fajta öntermékenyülési képességét. A kizárólag *S*_C-allél méretű fragmentumot mutató

fajták homo- vagy heterozigóta állapota sem volt eldönthető, így például a ‘Pannónia’, ‘Ceglédi kedves’, ‘Venus’, továbbá a Rózsakajszai és a Magyarkajszai fajtakörbe tartozó fajták esetében (14. és 15. ábrák). Kérdéses volt az is, hogy az NJA-8 S_C - vagy S_8 -allélt hordoz-e és ezenkívül az S_{18} -alléllal azonos méretű, de sokkal halványabb fragmentum PCR-műtermék, vagy valódi allélt reprezentál (14. ábra).

Az SFB-alapú PCR-analízissel kimutatható volt, hogy a Rózsakajszai, a ‘Ceglédi kedves’, a ‘Nyujtó Ferenc emléke’ és a ‘Pannónia’ $S_C S_C$ homozigóták. Ez utóbbi fajta egy Magyarkajszai változat (feltételezhető genotípusa: $S_C S_8$) és a ‘Borsi-féle kései rózsá’ ($S_C S_C$), míg a ‘Nyujtó Ferenc emléke’ a ‘Kései rózsá C.320’ ($S_C S_C$) × ‘Ceglédi bíborkajszai’ ($S_C S_9$) keresztezésből jött létre, mely kombinációk esetén a hibridek 50 %-a lesz $S_C S_C$ genotípusú. Az NJA-8 szintén $S_C S_C$ homozigótának bizonyult, ami igazolta, hogy a 14. ábrán látható, 300 bp-os fragmentum PCR-műtermék. Az ‘Ananasznij cjurpinszkij’ fajta $S_C S_C$ genotípusa arra utal, hogy a Maliga (1966) által önmeddőnek meghatározott ‘Ananász’ fajtától jelentősen különbözik, vagy a terméskötődési vizsgálatok sikertelenségét más tényezők okozták. Ezekkel szemben a ‘Venus’ és a Magyarkajszai klónok $S_C S_8$ heterozigóta genotípusúnak bizonyultak.

A *Solanaceae* fajokban bizonyítottan (Cruz-Garcia és mts., 2003), a *Prunus* fajokban feltehetően léteznek (Wünsch és Hormaza, 2004b; Vilanova és mts., 2006; Hegedűs és mts., 2006) olyan, *S*-lókuszon kívüli gének, melyek meghatározó szerepet töltenek be az inkompatibilitási reakciókban, s melyek funkcióvesztéses mutációja szintén öntermékenyülést okozhat. Mivel azonban minden eddig vizsgált, gazdaságilag jelentős öntermékenyülő kajszifajta esetében az inszerciós mutáció okozta az öntermékenyülő jelleg kialakulását, jelenlegi ismereteink alapján az S_C -haplotípusok kimutatása megbízható módszer az öntermékenyülő genotípusok korai kiválogatására, ami az általunk tervezett AprSFB-F1/R primerpár használatával sikeresen kivitelezhető.

6.5. Az *S*-RN-áz allélok szerkezete és filogenetikai vizsgálata

6.5.1. Az *S*-RN-áz allélok szerkezete

Az S_C - és a tizenhárom új (S_8 – S_{20}) ribonukleáz allél szerkezetét szekvencia és fragmentumhossz adatok alapján határoztuk meg, az intronok méretét ennek megfelelően pontosan vagy becsült értékekkel jellemeztük. Vilanova és mts. (2005) meghatározták az S_{1-7} és S_C -allélok első intronjának, illetve Romero és mts. (2004) az S_1 , S_2 és S_4 -allélok második intronjának DNS-szekvenciáját, a többi allél esetében az intronméreteket agarózgélén történő szétválasztást követően megbecsülték.

Az általunk izolált és leírt S_8 - S_{20} -allélok esetében is a második intron hosszának variabilitása nagyobb mértékű (118–2680 bp) volt, mint az első introné (110–320 bp), hasonlóan az S_{1-7} -allélokhoz, amelyeknél az első intron 151–329 bp, a második intron pedig kb. 110–2500 bp értékek között változtak. A cseresznye S -RN-áz allélok esetében is hasonló mértékű variabilitás figyelhető meg (Sonneveld és mts., 2003; Wiersma és mts., 2001; Wunsch és Hormaza, 2004a). Tamura és mts. (2000) szerint a két intronhossz variabilitásának mértéke összefüggésben van az S -RN-áz génben elfoglalt pozíciójukkal. A nagyobb polimorfizmust mutató második intron a felismerési reakcióban szerepet játszó hipervariábilis régióba ékelődik, míg az első intron egy konzervatívabb szekvenciájú génszakaszon, a szignálpepetid és a C1 régió határán található.

A *Prunus* S -RN-áz allélok nagy többségére igaz, hogy 2. intronjuk mérete meghaladja az 1. intron méretét. A termesztett cseresznyefajtákból és vad cseresznyepopulációkból izolált S -RN-áz allélok közül 21 allél 1. és 2. intron méretét ismerjük pontosan: a 21 allélból mindössze egy allél esetén haladja meg az 1. intron mérete a 2. intronét (Sonneveld és mts., 2003; Wunsch és Hormaza, 2004a; De Cuyper és mts., 2005). Mandulánál 28 allélból 10 (Ortega és mts., 2005; 2006), japánszilvánál 8 allélból 2 (Beppu és mts., 2002; Halász és mts., 2007) esetben bizonyult az első intron nagyobbnak, mint a második. Munkánk eredményeként az ismert kajszii S -RN-áz allélok száma 21-re nőtt, melyek közül 3 allél, az S_3 - (175 bp és ~110 bp) (Vilanova és mts., 2005), az S_{12} - (~170 bp és 169 bp) és az S_{18} -allél (~230 bp és 118 bp) esetében haladta meg az 1. intron mérete a 2. intronét. Az összes többi kajsziallélra azonban a nagyobb méretű második intron jellemző.

6.5.2. Az S -allélok filogenetikai vizsgálata

Az általunk izolált S_C , S_8 , S_9 , S_{11} , S_{13} , S_{15} és S_{16} kajszii S -ribonukleáz allélok cDNS-ből származó aminosav-szekvenciáit meghatároztuk, majd az NCBI adatbázisban található 24 *Prunus* valamint 10 *Malus* és *Pyrus* S -RN-áz, továbbá 3 nem S -specifikus RN-áz és egy T_2 -típusú gomba RN-áz szekvencia bevonásával filogenetikai vizsgálatot végeztünk.

Valamennyi szekvencia közül a *Rhizopus* gombából izolált T_2 -típusú RN-áz került a legtávolabb az UPGMA-eljárással készített törzsfán. A termékenyülési folyamatokban résztvevő S -RN-áz enzimek C2 és C3 konzervatív régiói rendkívül hasonlóak az Rh és T_2 gomba ribonukleázok aktív centrumához (McClure és mts., 1989). E két gomba RN-áz és az elsőként izolált két alma S -RN-áz aminosav-szekvenciájában megegyezik két hisztidin (His-33 és His-90) pozíciója, melyeknek nélkülözhetetlen szerepük van az RNS

bontásában, továbbá négy cisztein (Cys-48, Cys-93, Cys-157 és Cys-195) helyzete, melyek között diszulfidhíd kötés létesül (Kawata és mts., 1988; Broothaerts és mts., 1995).

A *Rosaceae* családon belül a *Maloideae* és *Prunoideae* alcsaládok egymástól jól elkülönülnek, amit e két alcsaládba tartozó fajokból izolált *S*-RN-áz allélok szekvenciáinak csoportosulása is tükröz. A két alcsalád *S*-RN-áz enzimjei valamennyi filogenetikai analízis során a *Prunus* *S*-alléloktól elkülönülő, monofiletikus csoportot alkottak (Ushijima és mts., 1998; Igic és Kohn, 2001; Ma és Oliveira, 2002; Yamane és mts., 2003c). A két alcsalád *S*-RN-áz szekvenciáinak rokonságát az RC4 konzervatív régió jelenléte bizonyítja, míg a köztük fellelhető legjelentősebb különbség, hogy a *Malus* *S*-RN-áz allélokban egy, a *Prunus* allélokban kettő intron található. A közös intron az RHV régióba ékelődik, míg a csak a *Prunus* fajokra jellemző intron a SP és C1 régiók között található (Igic és Kohn, 2001). A *Scrophulariaceae* és *Solanaceae* fajok szintén egyetlen intront tartalmaznak, ugyanabban a pozícióban, mint a *Malus* és *Prunus* fajok közös intronja, így a *Maloideae* alcsaládban valamint a *Scrophulariaceae* és *Solanaceae* családokban az *S*-allélok szerkezete nagyon hasonló. Cheng és mts. (2006) *S*-RN-áz és SFB szekvenciák filogenetikai vizsgálata során úgy tapasztalták, hogy az almafélék *S*-alléljai közelebbi evolúciós kapcsolatban állnak a *Scrophulariaceae* és *Solanaceae* családok *S*-alléljaival, mint a *Prunus* fajok *S*-alléljaival.

A *Prunus* allélok között jelentősebb mértékben elkülönülő csoportot csak a cseresznyéből és mandulából származó, nem a termékenyülési folyamatokban résztvevő, de az *S*-RN-ázokhoz hasonló szerkezetű („*S*-like RNase” = nem *S*-specifikus) ribonukleáz enzimek alkotnak. Ezen enzimek nemcsak a bibeszövetekben fejeződnek ki, és expressziójuk az öregedés, foszforhiány és patogénfertőzés hatására fokozódik (Green, 1994), így biológiai funkciójuk vélhetőleg a foszfor újrahasznosítása lehet (Liang és mts., 2002).

A kladogramon elkülönülő „*S*-like” RN-ázok között a mandulából származó *PD1* (Van Nerum és mts., 2000a) és *PD2* (Ma és Oliveira, 2000), illetve a cseresznye *PA1* (Yamane és mts., 2003c) enzimeket szerepeltettük. A két mandula RN-áz savas, míg a cseresznye RN-áz alkalikus izoelektromos pontú fehérje. A *PD1* három, a *PD2* kettő, míg a *PA1* egy intront tartalmaz, melynek pozíciója azonos az *S*-RN-ázok 2. intronjával. Szemben a többi nem *S*-specifikus RN-ázzal, a *PA1* enzim expresszióját a P-hiány nem indukálja. Ezek alapján Yamane és mts. (2003c) azt a hipotézist fogalmazták meg, mely szerint a *PA1* enzim a *Prunus* *S*-RN-áz enzimek elődjének tekinthető, szemben a *Solanaceae* és *Scrophulariaceae* fajok nem *S*-specifikus RN-ázaival, melyek épp ellenkezőleg, az *S*-RN-ázokból alakulhattak ki (Igic és Kohn, 2001). Ez alapján tehát

elképzelhető, hogy az evolúció során a növényeket a kórokozók ellen védő ribonukleázok egy része új funkciót kapott, a saját pollen elleni védelem biztosítását, mely által elkerülhető az öntermékenyülés okozta genetikai leromlás (Lee és mts., 1992; Yamane és mts., 2003c). E föltételezést alátámasztja, hogy mindkét folyamat alapja a sejtek közötti specifikus felismerés.

Filogenetikai analízisünk tovább erősíti a *Rosaceae* családon belül korábban leírt transz-specifikus evolúció jelenségét (Ushijima és mts., 1998; Sutherland és mts., 2004b). A transz-specifikus evolúció következménye, hogy ugyanazon faj két *S*-allélja között kisebb mértékű a hasonlóság, mint két különböző faj *S*-alléljai között (Richman és Kohn, 1996). A *Prunus* fajokból izolált allélok nem alkottak monofiletikus csoportot: vagyis az interspecifikus hasonlóság nagyobb, mint az intraspecifikus hasonlóság. A *P. armeniaca* allélok egyes cseresznye, *P. pseudocerasus*, japánkajszi vagy mandula *S*-RN-ázokkal mutatják a legnagyobb mértékű homológiát, így a kajsziszekvenciák sem alkotnak elhatárolt, fajspecifikus csoportot. A bootstrap-analízis eredménye szerint a legszorosabb kapcsolat a kajszi S_{11} és japánkajszi S_f (100 %), kajszi S_{15} és *P. pseudocerasus* S_1 (100 %), illetve a kajszi S_1 és cseresznye S_2 -RN-ázok (80 %) között volt kimutatható. Ez csak úgy képzelhető el, ha az *S*-allélok elkülönülése az alcsaládok szétválása után, de a fajok kialakulása előtt következett be (Sassa és mts., 1996; Ishimizu és mts., 1998b).

E jelenség jól ismert mind az alma és körte allélok (Sassa és mts., 1996), mind a *Solanum*, *Petunia* és *Nicotiana* fajok *S*-RN-áz enzimjei esetében (Ioerger és mts., 1990). Az egyetlen kivétel a *Physalis crassifolia* faj, melynek *S*-alléljai a *Rosaceae* fajok alléljaihoz képest óriási mértékű intraspecifikus hasonlóságot mutatnak.

6.5.3. Az *S*-genotípusok és a kajszi kultúrevolúciója

A vizsgált fajták között az $S_C S_2$ genotípus 8 fajta esetében fordult elő, melyek között észak-amerikai (2), nyugat-európai (1), kárpát-medencei (4) és afgán (1) fajták is találhatóak. Az S_2 amerikai és spanyol fajtákban is az egyik leggyakrabban előforduló allél (Albuquerque és mts., 2002; Vilanova és mts., 2005). A mediterrán területeken való gyakori előfordulásáért valószínűleg az észak-afrikai, alacsony hidegigényű 'Canino' ($S_C S_2$) tehető felelőssé, mely számos fajta pedigréjében megtalálható.

A dolgozatban vizsgált két amerikai $S_C S_2$ fajta a Tom Toyama által vezetett Washington állami nemesítési programból származik. A 'Bayoto' fajta pedigréje nem ismert, de a 'Toyudá'-t a 'Goldrich' ($S_1 S_2$) leszármazottjaként tartják számon, így S_2 -allélját is feltehetően attól örökölte. Munkánk során vált ismertté a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetemen nemesített 'Budapest' fajta $S_C S_2$ genotípusa. A 'Budapest' a

‘Nancy’ fajta ‘Akme’, ‘Magyarkajszai’ és ‘Kései rózsá’ pollenkeverékes megporzásából keletkezett. A pollenadó fajták közül a ‘Magyarkajszai’ genotípusa feltételezhetően $S_C S_8$, míg a ‘Kései rózsá’-é $S_C S_C$. Az ‘Akme’ fajta vizsgálatainkban nem szerepelt, így biztosan nem állítható, mégis valószínű, hogy a ‘Budapest’ S_C -allélját a pollenadó fajtáktól örökölte. Ez azt jelenti, hogy az S_2 -allélt feltehetően a ‘Nancy’ hordozta. Mindezt tovább erősíti, hogy egyes feltételezések szerint a szlovák eredetű, szintén $S_C S_2$ genotípusú ‘Rakovszky’ fajta is a ‘Nancy’ leszármazottja (Harsányi, 1981). A ‘Nancy’-t más külföldi fajtákkal együtt a XIX. században hozták be, vagy inkább vissza Magyarországra, hiszen a Franciaországban 1755-ben leírt ‘Nancy’ feltehetően magyar eredetű. A leírások és ábrázolások alapján nagyon hasonlít a Magyarországon termesztett kajszikra (Löschner és Passecker, 1954 cit. in Faust és mts., 1998), továbbá megjelenésének időpontja sem zárja ki, hogy a Törökországból származó, Magyarországon termesztett kajszai leszármazottja legyen. A ‘Nancy’ szinte valamennyi jelentősebb nyugat-európai fajta (‘Moor Park’, ‘Royal’, ‘Blenheim’ stb.) pedigréjében megtalálható, ami jól tükrözi az európai fajták szűk genetikai bázisát (Mehlenbacher és mts., 1991), melyhez — részben épp a ‘Nancy’ fajtán keresztül — a Magyarországon termesztett kajszifajták hozzájárulása igen jelentős mértékű. Érdekes, hogy az ismeretlen eredetű magoncként egy francia ültetvényben talált ‘Bergeron’, a Mediterráneum egyik jelentős fajtája, szintén $S_C S_2$ genotípusú. Mindez ugyan nem igazolja e fajta magyar kajszikkal való kapcsolatát, de ennek lehetősége továbbra sem zárható ki a számos francia fajta esetében valószínűsíthető magyar eredet fényében.

Történelmi és nyelvészeti adatok alapján feltételezhető, hogy a török eredetű fajták Magyarországra kerülése a török hódoltság idején (1526–1680) és az azt követő időszakban is meghatározó volt (Faust és mts., 1998). A jelenlegi magyar fajták kialakulása során az eredeti török fajtáknak jelentős szelekciós folyamaton kellett átesniük, tekintve, hogy ezek számos tulajdonságban (pl. gyümölcsméret, hidegigény) különböznek a napjainkban termesztett török fajtáktól. Azt a feltevést, miszerint a magyar fajták nyugat felé terjedtek tovább, és a kajszai elterjedésének északi határát képezik (Faust és mts., 1998), eredményeink is alátámasztják. Az öntermékenyülő Magyarkajszai fajtakör 5 különböző országból származó 9 fajtája azonos, $S_C S_8$ -genotípussal rendelkezik. Ez a genotípus csak a Magyarkajszai fajtakörbe tartozó klónok vagy az azokkal rokon fajtákban mutatható ki. Ezek alapján feltételezhető, hogy a Magyarkajszai őse $S_8 S_i$ -genotípusú volt (i = tetszőleges inkompatibilitási allél), és a pollenkomponens, SFB_8 -ban bekövetkező mutáció hatására a mutáns S_8 ($S_8' = S_C$) genotípusú pollen képes volt az öntermékenyítésre. A jelenleg ismert $S_C S_8$ -genotípusú Magyarkajszai fajták ezeknek az öntermékenyüléssel létrejött utódoknak a leszármazottjai lehetnek, melyek között az $S_C S_C$ és $S_C S_8$ genotípusok

azonos valószínűséggel fordulhattak elő. A 'Luizet' francia fajtát is a Magyarkajszai fajtakör rokonaként említik (Faust és mts., 1998). Mindezt a leszármazottjai között számon tartott román fajták ('Marculesti 5/5', 'Sirena', 'Sulmona' és 'Venus') genotípusa és pedigrije alapján következtethető $S_C S_C$ vagy $S_C S_8$ genotípusa is megerősíti. A nem mutáns S_8 -allélt magyar, olasz és ukrán fajtákban is megtaláltuk.

A Magyarkajszit, ahogy a többi fajtát is, az 1800-as évek végéig magról szaporították, ami bizonyos fokú heterogenitást biztosított (Pedryc, 1992). A vegetatív szaporításra való áttérés a korabeli variabilitást rögzítette. Magyarországon a klónszelekció az 50-es évek elején indult (Nyujtó, 1960; Brózik, 1960). A Magyarkajszai klónszelekciója Magyarországon és a környező országokban (Ausztria, Szerbia, Ukrajna, Csehország stb.) is sikeres volt (Pedryc, 1992), e nemesítői munka során alakult ki a dolgozatban vizsgált, a Magyarkajszai fajtakörbe tartozó 5 magyar, 1 szerb, 1 ukrán 1 macedón és 1 bolgár fajta.

Crossa-Raynaud (1960) hipotézise szerint a kajszai Oroszországba nyugatról érkezett a XVII. században, míg Ukrajnába közvetlenül a Közel-Keletről (Crossa-Raynaud, 1960 cit. in Faust és mts., 1998). Ukrajnában a kajszai helyi elnevezése zerdeli, ami perzsiai eredetre utal, ugyanakkor a 'Nyikitszkij' annak a 'Krasznoscokij' fajtának a klónja, melynek Magyarkajszival való azonosságát Nyujtó és Kosztina egyaránt elfogadta (Harsányi, 1981). Érdekes kérdés, hogy a Magyarkajszai őse is Közép-Ázsiából jutott-e Ukrajnába és onnan Magyarországra, vagy török közvetítéssel került Magyarország területére, ahonnan elterjedt a környező országokba. Eredményeink alapján egyik lehetőség sem zárható ki, mivel a Magyarkajszikra jellemző, az öntermékenyülést okozó allél nem mutáns változata (S_8) több magyar és ukrán fajtában is megtalálható. A magyar "eredetet" egyelőre inkább csak történelmi adatok valószínűsítik. Tudott, hogy a XVII. században Ukrajnába nyugatról hozták a cárok nemes kajszifajtákat, míg a magyarkajszik őseit Gesner már 1561-ben magyar származásúként említi, és elnevezésében ma is számos európai országban szerepel a magyar jelző. A magyar eredet igazolásához azonban szélesebb mintapopuláción elvégzett, több lókuszra kiterjedő molekuláris vizsgálat lenne szükséges (pl. mikroszatellit-, AFLP-analízis stb.).

A dolgozatban vizsgált 74 kajszifajtában leírt allélokat ahhoz a földrajzi területhez rendelve, ahonnan az adott fajták származnak, érdekes összefüggésekre derülhet fény (28. ábra). Eurázsiai nyugatról keleti irányban haladva egyre növekvő alléldiverzitás tapasztalható, mely legnagyobb értékét a közép-ázsiai térségben, illetve Kínában éri el. A kajszai őshazája, elsődleges géncentruma ÉK-Kína területén található (Mehlenbacher és mts., 1991; Vavilov, 1992 cit. in Faust és mts., 1998). E területen ugyanúgy, mint Közép-Ázsia hegyvidékein (Dzsungária, Afganisztán, Tadzsisztán és Üzbegisztán) a faj vadon

elő populációi is előfordulnak, így az *S*-allélok számában is tükröződő nagymértékű variabilitás nem meglepő. Az előázsiai területet (Irán, Kaukázus, Törökország és Türkmenisztán) Vavilov (1992) másodlagos géncentrumnak tekintette. Miután a közép-ázsiai régióból mindössze 3 fajta állt rendelkezésünkre, ezt a területet összevontuk az irano-kaukázusi régióval. Ez utóbbi régióból nem rendelkezünk közvetlen mintával, de az ukrán nemesítési programból származó ‘Voszki’ és a magyar nemesítésű ‘Harmat’, ‘Korai zamatos’ és ‘T-8’ a ‘Sateni’, ‘Salah’ és ‘Jubilar’ örmény fajták leszármazottjai, így ezek *S*-alléljait helyesebb az irano-kaukázusi csoporthoz sorolni, mint a kelet-európaihoz, ahol más fajtákban nem fordulnak elő. Figyelembe véve, hogy viszonylag kevés fajta genotípusáról van információnk, föltételezhetjük, hogy e terület kajsziültetvényeiben egy részletesebb vizsgálat számos további allélt tárna fel.



28. ábra. A különböző földrajzi régiókból származó, termesztett kajszifajtákban azonosított *S*-allélok összesített száma a fajták származási területére vonatkoztatva. A vizsgált területek balról jobbra: Észak-Amerika, Észak-Afrika, Nyugat-Európa, Kelet-Közép-Európa, irano-kaukázusi régió, Közép-Ázsia és Északkelet-Kína. Kínától, a kajszi elsődleges géncentrumától nyugati irányban egyre kisebb mértékű alléldiverzitás mutatható ki, melyet csak a közép-ázsiai génforrásból merítő nemesítési műhelyek (pl. Magyarország, USA) hatása módosít.

Mintavételezésünk az európai fajták körében tekinthető leginkább reprezentatívnak, miután a kelet-európai régióból 41 fajta genotípusát határoztuk meg, míg a nyugat-európai régióból 15 fajta *S*-genotípusa volt ismert (Burgos és mts., 1998; Vilanova és mts., 2005). Közel azonos mennyiségű (6 illetve 5) allél jelenléte volt kimutatható. Mindez összefüggésben állhat azzal a ténnyel, hogy Kelet-Európából az öntermékenyülő kajszigenotípusok nyugati irányba történő terjedése nyilvánvalóan intenzívebb volt, hiszen ezek termesztése lényegesen egyszerűbb. Eredményeink híven tükrözik az európai fajták szűk genetikai bázisát, továbbá, hogy a kajszai európai ökoföldrajzi csoportja a legkevésbé változékony, a leginkább korlátozott variabilitást mutató csoport (Mehlenbacher és mts., 1991; Faust és mts., 1998).

Az afrikai régióhoz mindössze 3 allél volt rendelkezhető, de e terület igen kevés fajtájáról áll rendelkezésre információ. Érdekesebb az amerikai régió, ahol 7 allélt mutattunk ki. Az amerikai kajszik az európai ökoföldrajzi csoporthoz tartoznak, és az összesen ismert 13 fajtából mégis több allél volt kimutatható, mint az 15 nyugat-európai fajtából. Ennek azonban az a nyilvánvaló oka, hogy az USA-beli New Jersey-ben az NJA-sorozat előállításához az üzbég VIR-intézet fajtáit (pl. 'Zard') és szelekcióit használták fel. Az így született új fajták (pl. 'Auróra', 'Orange red') többsége önmeddő, melyek ráadásul e területeken korábban nem ismert inkompatibilitási allélok (pl. S_{13} , S_{17}) megjelenéséhez vezettek. A kanadai nemesítési programokban a *P. mandshurica* fajt is használják a fagytűrés fokozására ('Morden 604') (Pedryc, 2003), ami szintén hasonló következményeket von maga után. A 'Morden 604' hibrid a szigetcsépi fajtagyűjtemény egyik legérdekesebb tagja. Igazoltuk, hogy hordozza az S_4 -allélt, mely utódjában, a 'Harcot' fajtában is jelen van. Másik allélját mindeztáig nem tudtuk izolálni, de bizonyos, hogy különbözik az S_C -alléltól. Geitonogám öntermékenyítéssel azonban 15 % körüli kötődést adott, melynek tisztázása a jövő feladatai közé tartozik.

Az amerikaihoz hasonló tendencia bontakozik ki Európában is, ahol például a BCE Genetika és Növénynemesítés Tanszékén folyó nemesítési programokba örmény fajtákat vontak be a korlátozott variabilitás szélesítésére (Pedryc, 1996), de ezek használata révén megintcsak önmeddő genotípusok, és új inkompatibilitási csoportok jelenhetnek meg. Mindez tovább hangsúlyozza a dolgozat eredményeinek fontosságát és jövőbeni perspektíváját.

A kínai és közép-ázsiai fajták nagy része (Mehlenbacher és mts., 1991), míg a török fajták 60 %-a (Paydas és mts., 2006), a magyar származású fajták közel 20 %-a önmeddő, a nyugat-európai tradicionális fajták között viszont alig fordul elő önmeddő genotípus (Mehlenbacher és mts., 1991). Ezek alapján az öntermékenyülő jelleget kialakító mutáció

valószínűleg a kajszi elterjedésének útvonalán a Kína és Törökország közötti földrajzi térségben következhetett be. Mind a kajszi, mind az őszibarack kultúrevolúciója során kiemelik a Tien-san vidékét, a Fergánai-medencét és Dzsungária környékét, melyek a magashegyi környezet, erős UV-sugárzás, szélsőséges hőingás és csapadékeloszlás révén jelentősen növelhették a mutációs rátát (Timon, 2000; Surányi, 2003). Ezt támasztja alá, hogy a közép-ázsiai 'Roxana' fajtából szintén ki tudtuk mutatni az S_C -allél jelenlétét, de hipotézisünk igazolásához csak a Közép-Ázsiától Törökorszáig terjedő területeken megtalálható kajszi genotípusok részletes és átfogó vizsgálata szolgáltathat alapot.

A közelmúltban Jie és mts. (2005) kínai fajták S -genotípus-vizsgálata során olyan öntermékenyülő genotípusról is beszámoltak, mely PCR-mintázata alapján föltételezhetően nem az S_C -allélt hordozza. Ezek alapján elképzelhető, hogy a kínai géncentrum nagy variabilitást mutató kajszipopulációiban az S_C -allélon kívül más öntermékenyülést biztosító allélok is találhatóak. Vilanova és mts. (2006) igazolták, hogy a 'Canino' fajta egy eddig azonosítatlan, S -lókuszon kívüli génjének mutációja révén vált képessé az öntermékenyítésre az S_2 -allélt hordozó pollen. Mindez azt mutatja, hogy a nemesítők számára az európai fajtakörön belül és azon kívül is többféle lehetőség áll rendelkezésre ahhoz, hogy az európai fajták variabilitásának fokozásához öntermékenyülő fajtákat használhassanak. Mindezekon kívül, az S -genotípusok meghatározása konkrét gazdasági hasznán túlmenően a termesztett faj kultúrevolúciójáról is igen érdekes és értékes információkat adhat.

6.6. Új tudományos eredmények

1. Nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálási protokollokat és különböző PCR-alapú módszereket adaptáltunk és fejlesztettünk tovább kajszi fajták termékenyülési viszonyainak molekuláris szintű jellemzésére.
2. Tizennégy országból, 4 ökoföldrajzi csoportból származó 74 kajszi genotípusban 13 korábban nem ismert S -haplotípust (S_8 – S_{20}) azonosítottunk, melyek ribonukleáz génjének jellemző intronméreteit is megállapítottuk.
3. Meghatároztuk 51 gazdaságilag jelentős fajta és értékes nemesítési alapanyagként használt hibrid (ezen belül a Magyarkajszi és Óriás fajtacsoportok) korábban leírt, ismert termékenyülési fenotípusát kialakító S -genotípusát. Molekuláris és termékenyülési vizsgálatokkal tisztáztuk 21 ismeretlen vagy vitatott termékenyülésű fajta öntermékenyülési képességét.

4. Vizsgálataink eredményeit a szakirodalmi adatokkal összesítve elkészítettük a kajszifajták kölcsönös termékenyülési viszonyait szemléltető táblázatot, mely 67 fajtát sorol 3 inter-inkompatibilitási csoportba illetve az univerzális pollenadók csoportjába. Az első inkompatibilitási csoportot két fajtaival bővítettük, továbbá a régebről ismert két inkompatibilitási csoport mellett meghatároztunk egy új (III.) inkompatibilitási csoportot, mely két fajtából áll. Ez a fajtatáblázat genetikai információs adatbázisaként közvetlen segítséget nyújthat önmeddő fajtákból létesítendő ültetvények tervezéséhez és a keresztezéses nemesítés szülővonalainak kiválasztásához.
5. Genetikai és molekuláris módszerekkel igazoltuk, hogy a kajszifajták öntermékenyülését a pollenkomponensgénben bekövetkezett inszerciós mutáció okozza. Magyar fajtákból izoláltuk és jellemeztük az öntermékenyülésért felelős allél (SFB₈) nem mutáns, funkcióképes változatát.
6. A kajszi pollenkomponensgénjét amplifikáló konszenzus primereket terveztünk, melyek könnyen és gyorsan alkalmazható, ugyanakkor megbízható rutineljárást kínálnak a nemesítők számára az öntermékenyülő hibridek korai szelekciójához. Ráadásul a primerek kodomináns markerként használhatók, a homo- és heterozitóta genotípusok kimutatását is lehetővé teszik.
7. Az újonnan azonosított kajszi és más csonthéjas fajok ismert S-RN-áz alléljainak aminosav-szekvencián alapuló filogenetikai analízisével igazoltuk a *Prunoideae* alcsalád S-alléljainak transz-specifikus evolúcióját.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban a kajszi (*Prunus armeniaca* L.) termékenyülési viszonyait irányító *S*-lókusz átfogó molekuláris szintű vizsgálatát végeztem el. Eredményeim az alábbiakban foglalhatók össze:

Nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálási protokollokat adaptáltunk és új protokollokat (NEpHGE I-III) dolgoztunk ki, melyekkel 12 kajszifajta teljes és 11 fajta részleges *S*-genotípusát tudtuk meghatározni. Meghatároztuk 16 különböző *S*-allél által kódolt ribonukleáz (*S*-RN-áz) enzim izoelektromos pontját.

Kimutattuk, hogy a cseresznye konzervatív régiókra tervezett, az 1. intronrégiót amplifikáló PCR-primerekkel 16 allél közül 10, a 2. intronrégiót amplifikálókkal 11 allél kimutatására van lehetőség. Ez a közel 70 %-os hatékonyság jól tükrözi, hogy a *Prunoideae* alcsalád fajainak *S*-RN-ázt kódoló DNS-szekvenciái nagymértékben konzervatívak. Egy, 22 *Prunus* faj *S*-RN-áz szekvenciája alapján tervezett degenerált primerpárral a kilenc, NEpHGE és cseresznyeprimerek alapján azonosított allélon (S_8 – S_{16}) kívül további 4 új allél (S_{17} – S_{20}) azonosítása vált lehetővé tizennégy országból, 4 ökoföldrajzi csoportból származó 74 kajszi genotípusban. A 13 korábban nem ismert *S*-ribonukleáz gén jellemző intronméreteit meghatároztuk. A vizsgált fajtákban az S_8 -allél 19, az S_2 -allél 12, az S_1 -allél 4, az S_9 -allél 4, az S_{13} -allél 3, az S_{10} -, S_{11} - és S_{20} -allélok 2-2, az S_{12} - és S_{14-19} -allélok egy-egy fajtában fordultak elő.

Elsőként alkalmaztuk kajszi *S*-genotípusok meghatározására az 1. intronrégiót amplifikáló, fluoreszcens primerekkel kapott fragmentumok automata szekvenátorral végzett pontos méretmeghatározását. Hét *S*-RN-áz allél (S_C ; S_8 ; S_9 ; S_{11} ; S_{13} ; S_{15} ; S_{16}) cDNS-ét, továbbá hat allél (S_C ; S_8 ; S_9 ; S_{11} ; S_{13} ; S_{20}) első intronrégióját, illetve nyolc allél (S_9 ; S_{10} ; S_{12} ; S_{13} ; S_{15} ; S_{17} ; S_{18} ; S_{20}) második intronrégióját klónoztuk és DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. A szekvenciákat benyújtottuk az NCBI nemzetközi adatbázisba. Más *Prunus* *S*-RN-áz, *Maloideae* *S*-RN-áz, ún. nem *S*-specifikus RN-áz és egy gomba T2-típusú RN-áz szekvenciák használatával filogenetikai analízist végeztünk, mely tovább igazolta a *Prunoideae* és *Maloideae* alcsaládok *S*-RN-ázainak különbözőségét és *Rosaceae* allélok transz-specifikus evolúcióját.

Meghatároztuk 51 gazdaságilag jelentős fajta és értékes nemesítési alapanyagként használt hibrid, ezen belül a Magyarkajszi ($S_C S_8$) és Óriás fajtacsoportok ($S_8 S_9$) teljes *S*-genotípusát. Molekuláris és termékenyülési vizsgálatokkal tisztáztuk 21 ismeretlen vagy vitatott termékenyülési fenotípusú fajta öntermékenyülési képességét, továbbá 19 fajta teljes és 2 fajta részleges *S*-allél-összetételét.

Vizsgálataink eredményeit a szakirodalmi adatokkal összesítve elkészítettük a kajszifajták kölcsönös termékenyülési viszonyait szemléltető táblázatot, mely 67 fajtát sorol 3 inter-inkompatibilitási csoportba illetve az univerzális pollenadók csoportjába. Munkánk jelentős eredménye, hogy az első inkompatibilitási csoportot két fajttal bővítettük, továbbá a régebből ismert két inkompatibilitási csoport mellett meghatároztunk egy új (III.) inkompatibilitási csoportot, mely két fajtból áll. Ez a fajtatáblázat genetikai információk adatbázisaként közvetlen segítséget adhat önmeddő fajtákból létesítendő ültetvények tervezéséhez és a keresztezéses nemesítés szülővonalainak kiválasztásához.

Irányított tesztkeresztezés követő gyümölcskötődési és pollentömlő-növekedési vizsgálatokkal és molekuláris módszerekkel kétséget kizáróan igazoltuk, hogy a kajszifajták öntermékenyülését a pollenkomponensgében bekövetkezett inszerciós mutáció okozza. A világon elsőként izoláltuk és jellemeztük az öntermékenyülésért felelős allél (SFB₈) nem mutáns, funkcióképes változatát magyar fajtákból.

A kajszii pollenkomponensgénjét amplifikáló konszenzus primereket terveztünk (AprSFB-F1/R), melyek könnyen és gyorsan alkalmazható, ugyanakkor megbízható rutineljárást kínálnak a nemesítők számára az öntermékenyülő hibridek korai szelekciójára. Ráadásul a primerek a homo- és heterozótiá genotípusok kimutatását is lehetővé teszik. Az általunk tervezett primerek használhatóságát 35 fajta *S*-genotípus-vizsgálatával támasztottuk alá, melyek közül 32 fajta pontos genotípusának meghatározása csak e primerekkel volt lehetséges.

Számos, különböző eredetű kajszifajta vizsgálata révén azt a hipotézist fogalmazzuk meg, hogy a faj kultúrevolúciójának egyik legjelentősebb eseménye, az öntermékenyülési képesség kialakulása valahol a közép-ázsiai régió környékén következhetett be.

Vizsgálataink kimutatták, hogy Eurázsiaiban nyugatról keleti irányban haladva egyre növekvő alléldiverzitás tapasztalható, mely legnagyobb értékét a közép-ázsiai térségben, illetve Kínában, a kajszii géncentrumában éri el. Kimutatható volt továbbá, hogy a közép-ázsiai génforrásból merítő nemesítési programok (pl. Magyarország, USA) segíthetnek a korlátozott variabilitású európai kajszifajtakör változékonyságának növelésében. Az önmeddő genotípusok megjelenésére azonban számítani kell, így dolgozatunk eredményei és a kidolgozott technikák a jövőben egyre fontosabbá válhatnak a termesztők és nemesítők számára.

8. SUMMARY

A comprehensive molecular analysis of self- and mutual compatibility relationships controlled by the *S*-locus was carried out in apricot (*Prunus armeniaca* L.). The results can be summarized as follows:

Non-equilibrium pH gradient electro-focusing protocols were adapted and new protocols (NEpHGE I-III) were worked out, which enabled us to determine complete or partial *S*-genotypes of 12 and 11 apricot cultivars, respectively. We determined isoelectric points of 16 apricot *S*-ribonuclease isoenzymes (*S*-RNase).

It was proved that primers designed for the conservative regions of sweet cherry also recognized apricot sequences; primers amplifying the first intron region could detect 10 from the total of 16 alleles while primers amplifying the second intron region could reveal 11 alleles. Hence, the efficiency of cherry primers reached about 70 %, which properly demonstrates that *S*-ribonuclease sequences of the *Prunoideae* subfamily are particularly conserved. Besides the 9 alleles (S_8 – S_{16}) detected by NEpHGE and cherry PCR primers, a degenerate primer pair designed from *S*-RNase sequences of 22 *Prunus* species could facilitate the identification of 4 additional alleles (S_{17} – S_{20}) in a range of 74 apricot cultivars originated from 14 countries and from 4 eco-geographical groups. The characteristic intron lengths of the 13 new *S*-RNase alleles were determined. Among the tested cultivars, the S_8 -allele occurred in 19; the S_2 in 12; the S_1 and S_9 in 4; the S_{13} in 3; the S_{10} , S_{11} and S_{20} in 2 cultivars, while the S_{12} - and S_{14-19} -alleles were only found in 1 cultivar.

Precise fragment length analysis of the first intron region with automated DNA sequencer was first time applied to determine apricot *S*-genotypes. cDNA of 7 *S*-RNase alleles (S_C , S_8 , S_9 , S_{11} , S_{13} , S_{15} and S_{16}), first intron region of 6 alleles (S_C , S_8 , S_9 , S_{11} , S_{13} and S_{20}) and second intron region of 8 alleles (S_9 , S_{10} , S_{12} , S_{13} , S_{15} , S_{17} , S_{18} and S_{20}) were cloned and sequenced. All sequences were submitted to the NCBI GenBank database. Phylogenetic analysis was carried out using other *Prunus* *S*-RNase, *Maloideae* *S*-RNase, cherry and almond *S*-like RNase sequences and a fungal T₂-type RNase sequence, which revealed two sub-family specific groups (*Prunoideae* and *Maloideae*) of the rosaceous *S*-RNases and provided further evidence on the trans-specific evolution in the *Prunoideae*.

Complete *S*-genotype of 51 economically important apricot cultivars and hybrids of great breeding value was determined, including Magyarakjszi ($S_C S_8$) and Óriás ($S_8 S_9$) cultivar groups. Using molecular analyses and fruit set evaluation, the self-(in)compatibility phenotype of 21 cultivars with previously unknown or doubtful

compatibility properties was clarified; in addition, the full *S*-allele composition of 19 cultivars was determined.

By comparing our results with data published previously, we established a table demonstrating compatibility relationships of apricot cultivars. Sixty seven cultivars were assigned to 3 inter-incompatibility groups and a universal pollen donor group. One of the most important results of our work is that the first incompatibility group was extended with two cultivars and a new incompatibility group (III.) containing two cultivars was established. The information supplied by this table can give direct help for planning orchards with self-incompatible cultivars and selecting parental lines in breeding programs.

Determining fruit set and monitoring pollen tube growth after test crosses and using molecular methods, it was unequivocally proved that self-compatibility in apricot is attributable to an insertion mutation within the pollen component SFB_C gene. The original version of the SFB_C was first time isolated and labelled as SFB_8 and found to be a frequent allele in Hungarian cultivars.

A degenerate primer pair (AprSFB-F1/R) was designed to amplify the pollen component SFB gene. These primers provide an easy to apply, rapid and reliable tool for breeders that enables the early selection of seedlings for self-compatibility and detects both homo- and heterozygote genotypes. Robustness of our primers was checked in an analysis of 35 cultivars, from which the *S*-genotype of 32 cultivars could only be identified with these primers.

Based on the results obtained from the study of several apricot cultivars originated from different areas, we can hypothesize that self-compatibility could have evolved around the Central Asian region.

Our results revealed that allelic diversity increased gradually in Eurasia from west to east, and it reached the highest value in the region of Middle Asia and China, which is regarded as the gene centre of apricot. Breeding programs (e.g. Hungary and USA) using cultivars from the Central Asian gene pool can contribute to increase the variability of the European eco-geographical group. Hence, as a side-effect, self-incompatibility may become more general in the future, which highlights the importance of my PhD work. Growers and breeders may benefit from the newly available molecular methods described in my thesis.

9. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ai, Y., Kron, E., Kao, T.-h. (1991): *S*-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.*, 230: 353–358.
2. Albuquerque, N., Burgos, L., Sedgley, M., Egea, J. (2004): Contributing to the knowledge of the fertilisation process in four apricot cultivars. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 102: 387–396.
3. Albuquerque, N., Egea, J., Pérez-Tornero, O., Burgos, L. (2002): Genotyping apricot cultivars for self-(in)compatibility by means of RNases associated with *S* alleles. *Plant Breeding*, 121: 343–347.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410.
5. 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 glauca*. *Nature*, 321: 38–44.
6. 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 glauca*. *Plant Cell*, 1: 483–491.
7. Andrés, M.V., Durán, J.M. (1998): Self-incompatibility in Spanish clones of apricot (*Prunus armeniaca* L.) tree. *Euphytica*, 101: 349–355.
8. Audergon, J.M., Guerriero, R., Monteleone, P., Viti, R. (1999): Contribution to the study of inheritance of the character self-incompatibility in apricot. *Acta Hort.*, 488: 275–279.
9. Bailey, C.H., Hough, L.F. (1975). *Apricot*. *Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana. pp. 367–383.
10. Ballester, J., Bošković, R., Batlle, I., Arús, P., Vargas, F., de Vicente, M.C. (1998): Location of the self-incompatibility gene on the almond linkage map. *Plant Breeding*, 117: 69–72.
11. Békefi, Zs., Halász, J. (2005): Pollen tube growth in sweet cherry (*Prunus avium* L.) styles in compatible, half compatible and incompatible pollinations. *International Journal of Horticultural Science*, 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. *International Journal of Horticultural Science*, 9: 37–42.
13. Bellini, E., Sansavini, S., Lugli, S., Nini, S., Rivalta, L. (2000): Obiettivi innovatori del miglioramento genetico del pero nel mondo. *Riv. Frutt Ortofloro It.*, 9: 56–69.
14. Ben-Njima, N., Socias i Company, R. (1995): Characterization of some self-compatible almonds. I. Pollen tube growth. *HortScience*, 30: 318–320.
15. Beppu, K., Komatsu, N., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Tao, R., Kataoka, I. (2005): *S_e*-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 80: 760–764.
16. Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., Tao, R. (2003): Determination of *S*-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 78: 315–318.

17. Beppu, K., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., Tao, R. (2002): Diversity of *S*-RNase genes and *S*-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 77: 658–664.
18. Bošković, R., Russell, K., Tobutt, K.R. (1997a): Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphytica*, 95: 221–228.
19. 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.
20. Bošković, R., Tobutt, K.R. (1996): Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica*, 90: 245–250.
21. Bošković, R., Tobutt, K.R. (1999): Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. *Euphytica*, 107: 29–43.
22. Bošković, R., Tobutt, K.R. (2001): Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 475–485.
23. Bošković, R., Tobutt, K.R., Batlle, I., Duval, H. (1997b): Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica*, 97: 167–176.
24. Bošković, R., Tobutt, K.R., Batlle, I., Duval, H., Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M. (2003): Stylar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding*, 122: 70–76.
25. Bošković, R., Tobutt, K.R., Duval, H., Batlle, I., Dicenta, F., Vargas, F.J. (1999): A stylar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 800–810.
26. Bošković, R., Tobutt, K.R., Duval, H., Rovira, M., Romero, M., Batlle, I., Dicenta, F. (1998): Inheritance of stylar ribonucleases in two almond progenies and their correlation with self-compatibility. *Acta Hort.*, 470: 118–122.
27. 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.
28. 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.
29. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
30. 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.
31. 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.
32. Broothaerts, W., Keulemans, J., Van Nerum, I. (2004): Self-fertile apple resulting from *S*-RNase gene silencing. *Plant Cell Rep.*, 22: 497–501.
33. Broothaerts, W., Van Nerum, I. (2003): Apple self-incompatibility genotypes: an overview. *Acta Hort.*, 622: 379–387.
34. Brózik, S. (1960): A tájfajta szelekció eddigi eredményei (kajszi). *Kertészeti Kutató Intézet Közleményei*, Budapest. pp. 77–93.
35. Brózik, S., Nyéki, J. (1975): A kajszi termékenyülési viszonyai. In: Brózik, S., Nyéki, J. (Szerk.). *Gyümölcstermő növények termékenyülése*.

- Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 173–176.
36. Burgos, L., Berenguer, T., Egea, J. (1993): Self- and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience*, 28: 148–150.
 37. Burgos, L., Egea, J., Guerriero, R., Viti, R., Monteleone, P., Audergon, J.M. (1997a): The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *J. Horticult. Sci.*, 72: 147–154.
 38. Burgos, L., Ledbetter, C.A., Pérez-Tornero, O., Ortín-Párraga, F., Egea, J. (1997b): Inheritance of sexual incompatibility in apricot. *Plant Breeding*, 116: 383–386.
 39. Burgos, L., Pérez-Tornero, O. (1999): Review of self-incompatibility in apricot. *Acta Hort.*, 488: 267–273.
 40. Burgos, L., Pérez-Tornero, O., Ballester, J., Olmos, E. (1998): Detection and inheritance of stylar ribonucleases associated with incompatibility alleles in apricot. *Sex. Plant Reprod.*, 11: 153–158.
 41. Carlos, C., Takasaki, T., Saito, T., Yohsimura, Y., Norioka, S. (2001): Reconsideration of *S*-genotype assignments, and discovery of a new allele based on *S*-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars. *Breed. Sci.*, 51: 5–11.
 42. 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.
 43. Certal, A.C., Almeida, R.B., Bošković, R., Oliveira, M.M., Feijó, J.A. (2002): Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Sex. Plant Reprod.*, 15: 13–20.
 44. Channuntapipat, C., Sedgley, M., Collins, G. (2001): Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the *S*₁, *S*₇, *S*₈, and *S*_f alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 1115–1122.
 45. Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramesh, S.A., Batlle, I., Arús, P., Sedgley, M., Collins, G. (2003): Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill) using specific primers based on the introns of the *S*-alleles. *Plant Breeding*, 122: 164–168.
 46. Chaparro, J.X., Werner, D.J., O'Malley, D., Sederoff, R.R. (1994): Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 805–815.
 47. 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.
 48. Cheng, J., Han, Z., Xu, X., Li, T. (2006): Isolation and identification of the pollen-expressed polymorphic F-box genes linked to the *S*-locus in apple (*Malus × domestica*). *Sex. Plant Reprod.*, 19: 175–183.
 49. Clarke, A.E., Newbigin, E. (1993): Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annu. Rev. Genet.*, 27: 257–279.
 50. Cociu, V. (1993): *The apricot (in Romanian)*. Editura Ceres, Bucuresti.
 51. Crane, M.B. (1925): Self-sterility and cross-incompatibility in plums and cherries. *J. Genet.*, 15: 301–322.
 52. Crane, M.B., Brown, A.G. (1937): Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *J. Pomol. Hort. Sci.*, 15: 86–116.
 53. 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.

54. Cresti, M., Went, van J.L. (1976): Callose deposition and plug formation in *Petunia* pollen tubes *in situ*. *Planta*, 133: 35–40.
55. Crossa-Raynaud (1960): Problemas d'arboricultura frutiere en Tunisie. Abricotiers. *Ann. L'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie*, 33: 39–63.
56. Cruz-Garcia F, Hancock CN, McClure B (2003) S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.*, 54: 123–130.
57. Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B. (1967): Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 242: 1541–1547.
58. Cullinan, E.P. (1937): Improvement of stone fruits. *U.S. Dept. Agr. Yearbook*, 1937: 665–748.
59. Currier, H.B. (1957): Callose substances in plant cells. *Am. J. Bot.*, 44: 478–488.
60. Darwin, C. (1877): *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: John Murray.
61. de Cuyper, B., Sonneveld, T., Tobutt, K.R. (2005): Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol. Ecol.*, 14: 945–955.
62. Delmotte, F., Leterme, N., Simon, J.C. (2001): Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique. *Biotechniques*, 31: 810–817.
63. de Nettancourt, D. (1997): Incompatibility in angiosperms. *Sex. Plant Reprod.*, 10: 185–199.
64. 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.
65. de Nettencourt, D. (2001): *Incompatibility in angiosperms*. New York: Springer-Verlag.
66. Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W., Arús, P. (2004): Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 9891–9896.
67. Dirlewanger, E., Pronier, V., Parvery, C., Rothan, C., Guye, A., Monet, R. (1998): Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 888–895.
68. 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.
69. Egea, J., Burgos, L. (1996): Detecting cross-incompatibility of three North-American apricot cultivars and establishing the first incompatibility group in apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121: 1002–1005.
70. Egea, J., García, J.E., Egea, L., Berenguer, T. (1991): Self-incompatibility in apricot cultivars. *Acta Hort.*, 293: 285–293.
71. Egea, L., Berenguer, T., Egea, J., García, J.E. (1988): Origen, situación y características de las variedades de albaricoquero de Murcia. *Anales de Edafología y Agrobiología XLVII* (5–6): 999–1011.
72. 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.
73. Evans, N.A., Hoyne, P.A. (1982): A fluorochrome from aniline blue: Structure, synthesis and fluorescence properties. *Aust. J. Chem.*, 35: 2571–2575.

74. Faust, M., Surányi, D., Nyujtó, F. (1998): Origin and dissemination of apricot. *Hortic. Rev.*, 22: 225–266.
75. Feng, J., Chen, X., Wu, Y., Liu, W., Liang, Q., Zhang, L. (2006): Detection and transcript expression of *S*-RNase gene associated with self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Mol. Biol. Rep.*, 33: 215–221.
76. Fogle, H.W. (1977): Self-pollination and its implications in peach improvement. *Fruit Var. Journ.*, 31: 74–75.
77. Franklin-Tong, V.E. (1999): Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell*, 11: 727–738.
78. Franklin-Tong, V.E. (2002): The difficult question of sex: the mating game. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 14–18.
79. Franklin-Tong, V.E., Franklin, F.C. (2003): Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.*, 8: 598–605.
80. 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.
81. Green, P.J. (1994): The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45: 421–445.
82. Habu, T., Kishida, F., Morikita, M., Kitajima, A., Yamada, T., Tao, R. (2006): A simple and rapid procedure for the detection of self-compatible individuals in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *HortScience*, 41: 1156–1158.
83. Haglund, H. (1971): Isoelectric focusing in pH gradients – a technique for fractionation and characterization of ampholytes. In: Glick, D. (Ed.): *Methods of biochemical analysis*. Vol. 19. pp. 1–104. John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto.
84. Hajilou, J., Grigorian, V., Mohammadi, S. A., Nazemmieh, A., Romero, C., Vilanova, S., Burgos, L. (2006): Self- and cross-(in)compatibility between important apricot cultivars in northwest Iran. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 81: 513–517.
85. Halász, J., Hegedűs, A., Szabó, Z., Nyéki, J., Pedryc, A. (2007): DNA-based *S*-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. *HortScience*, 42: (in press).
86. Harsányi, J. (1981): Fontosabb kajszifajtáink. In: Nyujtó, F., Surányi, D. (Szerk.): *Kajszi-barack, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*. pp. 83–109.
87. Hauck, N.R., Yamane, H., Tao, R., Iezzoni, A.F. (2002): Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Sex. Plant Reprod.*, 15: 39–46.
88. 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.
89. Hegedűs, A., Halász, J., Pedryc, A. (2007): 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 (in press).
90. Hegedűs, A., Szabó, Z., Nyéki, J., Halász, J., Pedryc, A. (2006): Molecular Analysis of *S*-haplotypes in Peach, a Self-compatible *Prunus* Species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131: 738–743.

91. Hershko, A., Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 425–479.
92. Hirata, N. (1989): Self-compatible mutant in Japanese pear. *Gamma Field Symp.*, 28: 71–80.
93. Hiratsuka, S., Kubo, T., Okada, Y. (1998): Estimation of self-incompatibility genotype in Japanese pear cultivars by stylar protein analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 67: 491–496.
94. Horn, J. (1939): Kajszi, cseresznye és meggy termesztése. *Növényvédelem és Kertészet Kiadása, Budapest.*
95. 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.
96. Igic, B., Kohn, J.R. (2001): Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 13167–13171.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. Ishimizu, T., Sato, Y., Saito, T., Yoshimura, Y., Norioka, S., Nakanishi, T., Sakiyama, F. (1996): Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J. Biochem.*, 120: 326–334.
104. 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.
105. 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.
106. Jie, Q., Shupeng, G., Jixiang, Z., Manru, G., Huairui, S. (2005): Identification of self-incompatibility genotypes of apricot (*Prunus armeniaca* L.) by S-allele-specific PCR analysis. *Biotechnol. Lett.*, 27: 1205–1209.
107. Jordan, N.D., Kakeda, K., Conner, A., Ride, J.P., Franklin-Tong, V.E., Franklin, F.C.H. (1999): S-protein mutants indicate a functional role for SBP in the self-incompatibility reaction of *Papaver rhoeas*. *Plant J.*, 20: 119–125.

108. Juárez-Díaz, J.A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J., Cruz-García, F. (2006): A novel thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces *S*-RNase *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 281: 3418–3424.
109. Kao, T.-h., McCubbin, A.G. (1996): How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12059–12065.
110. Kao, T.-h., Tsukamoto, T. (2004): The molecular and genetic bases of *S*-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, 16: S72–S83.
111. 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.
112. Karyiannis, I., Tsaftaris, A. (1999): Investigation on the inheritance of self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) among F₁ generation descendant. *Acta Hort.*, 488: 295–301.
113. Kawata, Y., Sakiyama, F., Tamaoki, H. (1988): Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.*, 176: 683–697.
114. Kester, D.E., Gradziel, T.M., Micke, W.C. (1994): Identifying pollen incompatibility groups in Californian almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119: 106–109.
115. 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.
116. Kiss, Gy.B., Endre, G. (1999): Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. In: Balázs, E., Dudits, D. (Szerk.): Molekuláris növénybiológia. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 37–90.
117. Kitahara, K., Fukui, H., Soejima, J., Matsumoto, S. (1999): Cloning and sequencing of a new *S*-gene '*S*_g-RNase' (Accession No AB019184) from *Malus × domestica* Borkh. 'Indo'. PGR99-046. *Plant Physiol.*, 119: 1567.
118. Kitahara, K., Matsumoto, S. (2002a): Sequence of the *S*₁₀ cDNA from 'McIntosh' apple and a PCR-digestion identification method. *HortScience*, 37: 187–190.
119. 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.
120. Kitahara, K., Soejima, J., Komatsu, H., Fukui, H., Matsumoto, S. (2000): Complete sequences of the *S*-genes '*S*_d' and '*S*_h-RNase' cDNA in apple. *HortScience*, 35: 712–715.
121. Kobel, F., Steinegger, P., Anliker, J. (1938): Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Kirscharten. *Landw. Jahrb. Schweiz*, 52: 564–595.
122. Kobel, F., Steinegger, P., Anliker, J. (1939): Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. *Landw. Jahrb. Schweiz*, 53: 160–191.
123. Komori, S., Soejima, J., Abe, K., Kotoda, N., Kato, H. (2000): Analysis of *S*-allele genotypes and genetic diversity in the apple. *Acta Hort.*, 538: 83–86.
124. Kosztina, K.F. (1970): Self-fertility studies in apricot. *Trud. Gos. Nikit. Botan. Sada*, XLV: 7–17.

125. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150–163.
126. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
127. 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.
128. Lansari, A., Iezzoni, A. (1990): A preliminary analysis of self-incompatibility in sour cherry. *Hort. Sci.*, 25: 1636–1638.
129. Lapins, K.O. (1971): ‘Stella’, a self-fruitful sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.*, 51: 252–253.
130. Larsen, K. (1977). Self-incompatibility in *Beta vulgaris* L. *Hereditas*, 85: 227–248.
131. Lech, W., Tylus, K. (1983): Pollination, fertilization, and fruit set of some sour cherry varieties. *Acta Hort.*, 139: 33–39.
132. Lee, H.-S., Singh, A., Kao, T.-h. (1992): RNase X2, a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with solanaceous *S* proteins. *Plant Mol. Biol.*, 20: 1131–1141.
133. Lewis, D. (1947): Competition and dominance of incompatibility alleles in diploid pollen. *Heredity*, 1: 85–108.
134. Lewis, D. (1949): Structure of the incompatibility gene. II. Induced mutation rate. *Heredity*, 3: 339–355.
135. Lewis, D. (1960): Genetic control of specificity and activity of the *S*-antigen in plants. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 151: 468–477.
136. Lewis, D., Crowe, L.K. (1954): Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutations in *Prunus avium* L. *Heredity*, 8: 357–363.
137. Lewis, D., Modlibowska, I. (1942): Genetical studies in pear IV. Pollen tube growth and incompatibility. *J. Genet.*, 43: 211–222.
138. Liang, L., Lai, Z., Ma, W., Zhang, Y., Xue, Y. (2002): *AhSL28*, a senescence- and phosphate starvation-induced *S*-like RNase gene in *Antirrhinum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1579: 64–71.
139. Lomakin, E.N. (1975): Female sterility of apricot flowers. *Byull. Vsesoyuznogo Ordena Lenina Instituta*, 54: 40–43.
140. López, M., Vargas, F.J., Batlle, I. (2006): Self-(in)compatibility almond genotypes: A review. *Euphytica*, 150: 1–16.
141. Löschnig, J., Passecker, F. (1954): *Die Marille und ihre Kultur*. Öst. Agrarverlag, Vienna.
142. Lundqvist, A. (1956): Self-incompatibility in rye. *Hereditas*, 42: 293–348.
143. 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.
144. Ma, R.-C., Oliveira, M.M. (2000): The RNase *PD2* gene of almond (*Prunus dulcis*) represents an evolutionarily distinct class of *S*-like RNase genes. *Mol. Gen. Genet.*, 263: 925–933.
145. Ma, R.-C., Oliveira, M.M. (2001): Molecular cloning of the self-incompatibility genes *S*₁ and *S*₃ from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sex. Plant Reprod.*, 14: 163–167.
146. Ma, R.-C., Oliveira, M.M. (2002): Evolutionary analysis of *S*-RNase genes from *Rosaceae* species. *Mol. Genet. Genomics*, 267: 71–78.
147. Mády, R., Szalay, L. (2003): Kajszi. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.): *Kajszi*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 85–126.

148. Maghuly, F., Fernandez, E.B., Ruthner, Sz., Pedryc, A., Laimer, M. (2005): Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genet. Genom.*, 1: 151–165.
149. Maliga, P. (1966): Kajszfajták termékenyülési viszonyai. *Szőlő és Gyümölcsstermesztés*, 1: 87–97.
150. Martin, F.W. (1959): Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain. Technol.*, 34: 125–128.
151. Martínez-Gómez, P., Sozzi, G.O., Sánchez-Pérez, R., Rubio, M., Gradziel, T.M. (2003): New approaches to *Prunus* tree crop breeding. *Food, Agriculture & Environment*, 1: 52–63.
152. Matityahu, A., Stern, R.A., Schneider, D., Goldway, M. (2005): Molecular identification of a new apple *S*-RNase –*S*₂₉– cloned from ‘Anna’, a low-chilling-requirement cultivar. *HortScience*, 40: 850–851.
153. Matsumoto, S., Kitahara, K. (2000): Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. *HortScience*, 35: 1329–1332.
154. 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.
155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. McCubbin, A.G., Kao, T.-h. (2000): Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16: 333–364.
162. Mehlenbacher, S.A., Cociu, V., Hough, L.F. (1991): Apricots (*Prunus*). In: Moore, J.N., Ballington, J.R. (Eds.): *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. Cap. 2. pp.: 65–107. Wageningen, International Society for Horticultural Science.
163. Morettini, A. (1957): La coltura del pero in Italia. Il miglioramento genetico. *Riv. Ortofloro-frutt. It.*, 41: 26–40.
164. Nakanishi, T.M., Saeki, N., Maeno, M., Ozaki, T., Kawai, Y., Ichii, T. (1991): Ultrastructural study on the stylar transmitting tissue in Japanese pear. *Sex. Plant Reprod.*, 4: 95–103.

165. Nasrallah, J. B. (2005): Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: comparisons to animal histocompatibility. *Trends Immunol.*, 26: 412–418.
166. 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 self-incompatibility pollen SFB gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) population. *New Phytologist*, 172: 577–587.
167. Nyéki, J., Szabó, Z. (1995): Cross-incompatibility in stone fruits. *Horticultural Science*, 28: 23–31.
168. Nyujtó, F. (1960): Tájékoztató a Duna-Tisza közti kajszibarack-termesztés helyzetéről és a tájszelekció eddigi eredményéről. *Mezőgazdasági Kísérleti Intézet Évkönyve*, Budapest. pp. 103–111.
169. Nyujtó, F., Brózik Jr., S., Brózik, S., Nyéki, J. (1985): Fruit set in apricot varieties. *Acta Agron. Acad. Sci. Hung.*, 34: 65–72.
170. O’Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O’Farrell, P.H. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12: 1133–1141.
171. Ortega, E., Dicenta, F. (2004): Suitability of four different methods to identify self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 79: 747–753.
172. Ortega, E., Egea, J., Cánovas, J.A., Dicenta, F. (2002): Pollen tube dynamics following half- and fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars. *Sex. Plant Reprod.*, 15: 47–51.
173. Ortega, E., Sutherland, B.G., Dicenta, F., Bošković, R., Tobutt, K.R. (2005): Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new *S*-alleles and correlation of reported *S* genotypes. *Plant Breeding*, 124: 188–196.
174. 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.
175. Paydas, S., Eti, S., Derin, K., Gulcan, R., Yilmaz, K.U. (2006): *In vitro* investigations on pollen quality, production and self-incompatibility of some apricot varieties in Malatya – Turkey. *Acta Hort.*, 701: 75–78.
176. Pedryc, A. (1992): A kajszibarack néhány tulajdonságának variabilitása a nemesítés szemszögéből. *Kandidátusi Értekezés*, Magyar Tudományos Akadémia Budapest.
177. Pedryc, A. (1996): New early ripening apricot varieties bred at Faculty of Horticulture in Budapest. *Results of Using the Gene Resources of Apricots and Peaches*, Breclav, Book of Abstracts, pp. 43–48.
178. Pedryc, A. (2003): A kajszibarack nemesítése. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.): *Kajszibarack, Mezőgazda Kiadó*, Budapest.
179. Peters, R.W. (1916): Pollinating fruit trees. *J. Hered.*, 7: 365–369.
180. Pimienta, E., Polito, V.S., Kester, D.E. (1983): Pollen tube growth in cross- and self-pollinated ‘Nonpareil’ almond. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 108: 643–647.
181. Qiao, H., Wang, F., Zhao, L., Zhou, J., Huang, J., Zhang, Y., Xue, Y. (2004): The F-box protein AhSLF-S₂ physically interacts with *S*-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 16: 582–595.
182. Rawes, A.N. (1921): Pollination in orchards (IV.). Self-fertility and self-sterility in plums. *J. Roy. Hort. Soc.*, 39: 353–356.

183. Redalen, G. (1984a): Cross pollination of five sour cherry cultivars. *Acta Hort.*, 149: 71–76.
184. Redalen, G. (1984b): Fertility in sour cherries. *Gartenbauwissenschaft*, 49: 212–217.
185. 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.
186. Richman, A.D., Kohn, J.R. (1996): Learning from rejection: the evolutionary biology of single-locus incompatibility. *Trend. Ecol. Evol.*, 11: 497–502.
187. Roiz, L., Shoseyov, O. (1995): Stigmatic RNase in self-compatible peach (*Prunus persica*). *Int. J. Plant. Sci.*, 156: 37–41.
188. Romero, C., Pedryc, A., Muñoz, V., Llácer, G., Badenes, M.L. (2003): Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome*, 46: 244–252.
189. Romero, C., Vilanova, S., Burgos, L., Martínez-Calvo, J., Vicente, M., Llácer, G., Badenes, M.L. (2004): Analysis of the *S*-locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of *S*-haplotype specific *S*-RNase and F-box genes. *Plant Mol. Biol.*, 56: 145–157.
190. Ryan, C.A., Farmer, E.E. (1991): Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 651–674.
191. Sakurai, K., Brown, S.K., Weeden, N. (2000): Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections. *HortScience*, 35: 116–119.
192. Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Martínez-Gómez, P. (2004): Identification of *S*-alleles in almond using multiplex PCR. *Euphytica*, 138: 263–269.
193. Sanzol, J., Herrero, M. (2002): Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica*, 128: 325–331.
194. Sanzol, J., Sutherland, B.G., Robbins, T.P. (2006): Identification and characterization of genomic DNA sequences of the *S*-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles *S*₁ to *S*₅ in European pear. *Plant Breeding*, 125: 513–518.
195. Sapir, G., Stern, R.A., Eisikowitch, D., Goldway, M. (2004): Cloning of four new Japanese plum *S*-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 79: 223–227.
196. 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.
197. 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.
198. Sassa, H., Mase, N., Hirano, H., Ikehashi, H. (1994): Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus × domestica*). *Theor. Appl. Genet.*, 89: 201–205.
199. Sassa, H., Nishio, T., Kowiyama, Y., Hirano, H., Koba, T., Ikehashi, H. (1996): Self-incompatibility (*S*) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the *T*₂/*S* ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.*, 250: 547–557.
200. Sawamura, Y., Saito, T., Shoda, M., Yamamoto, T., Sato, Y., Hayashi, T., Kotobuki, K. (2002): A new self-incompatibility allele in Japanese pear ‘Shinsei’ and ‘Shinkou’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 71: 342–347.
201. 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. Hort. Sci. Biotech.*, 76: 596–600.

202. Schrauwen, J., Linskens, H.F. (1972): Ribonuclease in styles. *Planta*, 102: 277–285.
203. Schultz, J.H. (1948): Self-incompatibility in apricots. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 51: 171–174.
204. Sims, T.L., Ordanic, M. (2001): Identification of a *S*-ribonuclease-binding protein in *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.*, 47: 771–783.
205. Singh, A., Ai, Y., Kao, T.-h. (1991): Characterization of ribonuclease activity of three *S* allele-associated proteins of *Petunia inflata*. *Plant Physiol.*, 96: 61–68.
206. Socias i Company, R., Kester, D.E., Bradley, M.V. (1976): Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and self-compatible almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101: 490–493.
207. 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.
208. Sonneveld, T., Robbins, T.P., Bošković, R., Tobutt, K.R. (2001): Cloning of six sweet cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 1046–1055.
209. 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.
210. 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.
211. Steinbachs, J.E., Holsinger, K.E. (2002): *S*-RNase-mediated gametophytic self-incompatibility is ancestral in eudicots. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 825–829.
212. Surányi, D. (2003): A kajsz jelentsége, termesztésének története és helyzete. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.): *Kajsz. Mezőgazda Kiadó, Budapest*. pp. 11–29.
213. Surányi, D., Molnár, L. (1981): A kajszibarackfa élettana. In: Nyujtó, F., Surányi, D. (Szerk.), *Kajszibarack. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*.
214. Sutherland, B.G., Robbins, T.P., Tobutt, K.R. (2004a): Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. *Plant Breeding*, 123: 582–584.
215. Sutherland, B.G., Tobutt, K.R., Robbins, T.P. (2004b): Molecular genetics of self-incompatibility in plums. *Acta Hort.*, 663: 557–562.
216. Sutton, I. (1918): Report on tests of self-fertility in plums, cherries and apples at the John Innes Horticultural Institution. *J. Genet.*, 7: 281–300.
217. Szabó, Z. (2003): Plum (*Prunus domestica* L.). In: Kozma, P., Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (Eds.): *Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape. Akadémiai Kiadó, Budapest*. pp. 515–522.
218. Szabó, Z., Nyéki, J. (1991): Blossoming, fructification and combination of apricot varieties. *Acta Hort.*, 293: 295–302.
219. Szabó, Z., Nyéki, J., Andrásfalvy, A., Szalay, L., Pedryc, A. (1999): Evaluation of some Romanian apricot varieties in Hungary. *Acta Hort.*, 488: 211–214.
220. Szabó, Z., Nyéki, J., Soltész, M. (2003): Apricot (*Prunus armeniaca* L.). In: Kozma, P., Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (Eds.): *Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape. Akadémiai Kiadó, Budapest*. pp. 411–423.
221. 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.
222. Takasaki, T., Okada, K., Castillo, C., Moriya, Y., Saito, T., Sawamura, Y., Norioka, N., Norioka, S., Nakanishi, T. (2004): Sequence of the *S₉-RNase* cDNA and PCR-RFLP system for discriminating *S_{I-}* to *S₉*-allele in Japanese pear. *Euphytica*, 135: 157–167.
 223. Tamura, M., Ushijima, K., Sassa, H., Hirano, H., Tao, R., Gradziel, T.M., Dandekar, A.M. (2000): Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 344–349.
 224. Tao, R., Habu, T., Namba, A., Yamane, H., Fuyuhiko, F., Iwamoto, K., Sugiura, A. (2002): Inheritance of *S_f-RNase* in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 222–228.
 225. Tao, R., Habu, T., Yamane, H., Sugiura, A., Iwamoto, K. (2000): Molecular markers for self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *HortScience*, 35: 1121–1123.
 226. Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T.M., Dandekar, A.M., Sugiura, A. (1997): Identification of stilar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol.*, 38: 304–311.
 227. Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A., Murayama, H., Sassa, H., Mori, H. (1999): Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for SRNases in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124: 224–233.
 228. Tao, R., Watari, A., Hanada, T., Habu, T., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Yamane, H. (2007): Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the *S* haplotypes found in self-incompatible *Prunus* species. *Plant Mol. Biol.*, 63: 109–123.
 229. Tehrani, G. (1991): Seventy-five years of plum breeding and pollen compatibility studies in Ontario. *Acta Hort.*, 283: 95–103.
 230. Thomas, S.G., Franklin-Tong, V.E. (2004): Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*, 429: 305–309.
 231. 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.
 232. Thompson, R.D., Kirch, H.-H. (1992): The *S* locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet.*, 8: 381–387.
 233. Timon, B. (2000): Az őszibarack genetikai bázisa, a fajták származása. In: Timon, B. (Szerk.): *Őszibarack*, Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 42–48.
 234. 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.
 235. Tobutt, K.R., Sonneveld, T., Bekefi, Z., Bošković, R. (2005): Cherry (in)compatibility genotypes - an updated cultivar table. *Acta Hort.*, 663: 667–671.
 236. Toldo, L., Kindler, B. (1999): *Biology Workbench 3.2*. University of Illinois, <http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi#>
 237. Tomimoto, Y., Nakazaki, T., Ikehashi, H., Ueno, H., Hayashi, R. (1996): Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases (*S*-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 66: 159–167.

238. 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.
239. Tsukamoto, T., Ando, T., Watanabe, H., Marchesi, E., Kao, T-h. (2005): Duplication of the *S*-locus F-box gene is associated with breakdown of pollen function in an *S*-haplotype identified in a natural population of self-incompatible *Petunia axillaris*. *Plant Mol. Biol.*, 57: 141–153.
240. Tsukamoto, T., Hauck, N.R., Tao, R., Jiang, N., Iezzoni, A.F. (2006): Molecular characterization of three non-functional *S*-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Mol. Biol.*, 62: 371–383.
241. Tufts, W.P., Philp, G.L. (1922): Almond pollination. *California Agricultural Experimental Station Bulletin*, 346: 35.
242. 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.
243. 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.
244. 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.
245. Uyenoyama, M.K. (1995): A generalized least squares estimate for the origin of sporophytic self-incompatibility. *Genetics*, 139: 975–992.
246. Van Nerum, I., Certal, A.C., Oliveira, M.M., Keulemans, J., Broothaerts, W. (2000a): *PDI*, an *S*-like RNase gene from a self-incompatible cultivar of almond. *Plant Cell Rep.*, 19: 1108–1114.
247. 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.
248. Van Nerum, I., Incerti, F., Keulemans, J., Broothaerts, W. (2000b): Analysis of self-fertility in transgenic apple lines transformed with an *S*-allele either in sense or antisense direction. *Acta Hort.*, 538: 625–629.
249. 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.
250. 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.
251. Vavilov, N.I. (1951): *Phytogeographic basis of plant breeding. Chronica Botanica*. pp. 13–54.
252. Vavilov, N.I. (1992): *Origin and geography of cultivated plants*. (tr. L. Storr-Best). Cambridge Press, Cambridge.
253. 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.

254. Vieira, C.P., Charlesworth, D., Vieira, D. (2003): Evidence for rare recombination at the gametophytic self-incompatibility locus. *Heredity*, 91: 262–267.
255. 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.
256. Vilanova S., Badenes M.L., Burgos L., Martínez-Calvo J., Llácer G., Romero C. (2006): Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiol.*, 142: 629–641.
257. Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L. (2003a): An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F₂ progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 239–247.
258. Vilanova, S., Romero, C., Abernathy, D., Abbott, A.G., Burgos, L., Llácer, G., Badenes, M.L. (2003b): Construction and application of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Prunus armeniaca* L. for the identification of clones linked to the self-incompatibility locus. *Mol. Genet. Genomics*, 269: 685–691.
259. 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.
260. Viti, R., Monteleone, P., Guerriero, R. (1997): Incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.): methodological considerations. *J. Hortic. Sci.*, 72: 961–970.
261. Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999): The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 1015–1068.
262. Wassarman, P.M. (1990): Profile of a mammalian sperm receptor. *Development*, 108: 1–17.
263. Weaver, R.F., Hedrick, P.W. (2000): *Genetika*. Panem Könyvkiadó, Budapest.
264. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. ISBN 0-8493-1488-7.
265. Westermeier, R. (1993): *Electrophoresis in practice*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
266. Wiersma, P.A. (2003): Reproductive barriers in tree fruit crops and nuts. *Acta Hort.*, 622: 369–377.
267. 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.
268. 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.
269. Wilson, C.M. (1971): Plant nucleases III. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. *Plant Physiol.*, 48: 64–68.
270. Wilson, C.M. (1975): Plant nucleases. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26: 187–208.
271. Woodward, J.R., Craik, D., Dell, A., Khoo, K.H., Munroe, S.L.A., Clarke, A.E., Bacic, A. (1992): Structural analysis of the N-linked glycan chains from a stylar glyco-protein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Glycobiology*, 2: 241–250.
272. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2004a): Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 108: 299–305.

273. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2004b): Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sex. Plant Reprod.*, 17: 203–210.
274. 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.
275. Yaegaki, H., Shimada, T., Moriguchi, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M. (2001): Molecular characterization of *S*-RNase genes and *S*-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sex. Plant Reprod.*, 13: 251–257.
276. 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 non-functional pistil *S* allele. *J. Exp. Bot.*, 54: 2431–2437.
277. 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.
278. Yamane, H., Tao, R., Mori, H., Sugiura, A. (2003c): Identification of a non-*S* RNase, a possible ancestral form of *S*-RNases, in *Prunus*. *Mol. Gen. Genomics*, 269: 90–100.
279. Yamane, H., Tao, R., Sugiura, A. (1999): Identification and cDNA cloning for *S*-RNases in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). *Plant Biotechnology*, 16: 389–396.
280. 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.
281. Yamane, H., Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R. (2003d): The use of *S* haplotype-specific F-box protein gene, SFB, as a molecular marker for *S*-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1357–1361.
282. Zhang, S.L., Huang, S.X., Kitashiba, H., Nishio, T. (2007): Identification of *S*-haplotype-specific F-box gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sex. Plant Reprod.* (in press)
283. 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 in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 387–398.
284. 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.
285. 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.
286. 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.

M2. Az NCBI nemzetközi adatbázisba benyújtott szekvenciák

LOCUS EF101909 418 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
DEFINITION **Prunus armeniaca self-incompatibility RNase S₈ (S₈-RNase), partial cds.**
ACCESSION EF101909
VERSION EF101909
SOURCE *Prunus armeniaca*
ORGANISM *Prunus armeniaca*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
Amygdaloideae; Prunus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 418)
AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 418)
AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..418
/organism="Prunus armeniaca"
/mol_type="genomic DNA"
/cultivar="Ceglédi óriás"
/db_xref="taxon:36596"
/chromosome="VI"
/note="PCR_primers=fwd_name: PaConsI-F, rev_name:
PaConsI-R"
/translation="LVLGFAFFLCFIMSTGSYVHFQFVQQWPPTTCRVRWKPCSKPRPLQYFTIH"
BASE COUNT 111 a 79 c 74 g 154 t
ORIGIN
1 tacttgttct tggttttgct ttcttcttgt gtttcattat gagcactagt ggtggggtgc
61 attacaatct tttgctcttt atatcatata tgcatataat tagaattacg aaggagaagt
121 aggcaggaaa tgtcattaat tagtacataa ctttctttgg atgagttact atttggaat
181 tatttttctg catggtatct ttcgattact ctggtagtgt ttgaaataag tgcagtattc
241 atcattggaa gctaaaatgg tgttcttcct gcataaaatc cattaacctt ctcacaataa
301 ttttcgcagg atcttatgtc cattttcaat ttgtgcaaca atggccaccg accacctgca
361 gagttcgctg gaaaccttgc tccaaacccc ggccattaca atacttcacc attcatga

LOCUS DQ269996 498 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₉-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ269996
 VERSION DQ269996
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 498)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 498)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..498
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA join(<1..90,398..>498)
 /product="S9-RNase protein"
 CDS join(<1..90,398..>498)
 /codon_start=1
 /product="S9-RNase protein"
 /protein_id="ABB85341"

 /translation="FTIHGLWPSNYSNPRRPSNCNGSRFNFRKVYPQLRNKLIKISWPD
 VEGGNDTKFWEGEWNKHGT"
 exon <1..90
 /number=2
 exon 398..>498
 /number=3

ORIGIN
 1 ttcacaattc atggcctatg gccaaagtaac tattcaaacc caaggaggcc cagtaattgc
 61 aatgggtcgc gatttaactt taggaaagtg gtatgtattg tttttttttt tttttaactt
 121 actcttttagc atttagttct aaaaaattag attgtcatct gatgataata tactttcttg
 181 gtagataaaa ttgtaatggt ggttttctgg ttaggaacat tattttgcat atgtacctaa
 241 gtataaaaatt ggaactaaat tgaaaggata aaaataaaaa ttcaatttaa tactccatt
 301 ttatccgata atgaaaatct gtcctaatag tttttccctt ttttttttct ttttttttct
 361 ttctaaaaat atgttatata tggccttggat gtctcagtac cctcaattgc gaaataaact
 421 gaagatatct tggcccgcagc tgggaaggtgg caacgatata aaattttggg aaggtgaatg
 481 gaacaaacac ggtactta

LOCUS EF101910 267 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* self-incompatibility RNase S₉ (S₉-RNase), partial cds.**
 ACCESSION EF101910
 VERSION EF101910
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 267)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 267)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..267
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /note="PCR_primers=fwd_name: PaConsI-F, rev_name:
 PaConsI-R"
 /translation="LVLGFAFFLCFIMSTGSIYVYFQFVQQWPPTTCRLSSKPSNQHRPLQNFTIH"
 BASE COUNT 71 a 66 c 39 g 91 t
 ORIGIN
 1 tacttgttct tggtttcgct ttcttcttgt gtttcattat gagcactggg gggttgcatt
 61 acaatctttt tgctcgatc ttcaagctaa aactatgtac tttatacatc aaatccttat
 121 ttaagatgcc attaaccttc tcacaataat ttgocgagga tottaoctgt attttcaatt
 181 tgtgcaaca tggccaccga cgacctgcag acttagcagc aaaccttcca accaacaccg
 241 gccattacaa aacttcacca tccatga

LOCUS DQ269997 445 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₁₀-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ269997
 VERSION DQ269997
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 445)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 445)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..445
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Harmat"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA <1..>90
 /product="S10-RNase protein"
 CDS <1..>90
 /codon_start=1
 /product="S10-RNase protein"
 /protein_id="ABB85342"
 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTMP SNCNGSRFKKELS"
 exon <1..90
 /number=2

ORIGIN
 1 ttcacatcc atggcctatg gccaaagtaatt tattcaaacc caacgatgcc cagtaattgc
 61 aatggatcgc gatttaagaa agagctatcg gtaggtattg tttcttttgt tttttgtttt
 121 ttttccattt actcttaagc atttagtttt taggaaatta gtttgtcacc tgaagataat
 181 atgctttttt tcaataaacc ttgcgagatg gataaaattt tgatgctagt tctctgatta
 241 ggcacgttat tttgactata tacataagga cagaattaca aatgagcaat gctaggcata
 301 tcacatttac aaatgtggta tgactagcat tttttattac aaatatatgt atattagtag
 361 atatattaat gtacataatt tcagttatca tataagatgg tatagaatat ggtaaaaata
 421 gcatttgtac ctaataaaat ggtaa

LOCUS DQ269998 360 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₁₂-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ269998
 VERSION DQ269998
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 360)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 360)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..360
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Korai zamatos"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA join(<1..90,260..>360)
 /product="S12-RNase protein"
 CDS join(<1..90,260..>360)
 /codon_start=1
 /product="S12-RNase protein"
 /protein_id="ABB85343"

 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTRPSNCVGSFNFESKLSPLISKLRIISWPD
 VESGNDTQFWEGEWNKHGT"
 exon <1..90
 /number=2
 exon 260..>360
 /number=3

ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagcaat tattcaaatc caacgaggcc cagtaattgc
 61 gttgggtcgc attttaacga aagtaaattg gatatgattg tttcattatt ttttcaatta
 121 ctctagcatt ttgtaaaaaa aaaatatatt acaaaatgat aggtatTTTT tcaattactt
 181 tatccaaaat tgaatatcta accatagcct gagtttctac tttttctcaa aaaatgtata
 241 tattgcttgg atgtctcagt cccctcaatt gatatccaaa ttgaggatat cttggcctga
 301 cgtggaaagt ggcaatgaca cacaattttg ggaaggcgaa tggaacaaac acggcacata

LOCUS DQ269995 1259 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₁₃-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ269995
 VERSION DQ269995
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1259)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1259)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1259
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Korai zamatos"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA join(<1..90,1159..>1259)
 /product="S13-RNase protein"
 CDS join(<1..90,1159..>1259)
 /codon_start=1
 /product="S13-RNase protein"
 /protein_id="ABB85340"

/translation="FTIHGLWPSNYSNPTMPSNCSNGSKFEDRKVSPQLRSKLRKRSWPD
 VESGNDTKFWEGEWNKHGT"

exon <1..90
 /number=2
 exon 1159..>1259
 /number=3

ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaat tattcaaacc caacgatgcc cagtaattgc
 61 aatgggtcaa aatttgagga caggaaagtg gtatgtattg tttcattatt ttgtcactt
 121 accgtattta gtattatagt tcttaattag agaatctaca atgagcttct tacaccatct
 181 acaatgaact caatgatgct ccctttatat atttatgtat ctgatcatcg aattaaagga
 241 cctagctttt ctattgaaag gacccaaaatc gagattcaat ttaaaacttc cttcaatttt
 301 attattattg tttctgccaa gttataccac catctttcta aataaaaaag aaaaatcatt
 361 gtaatgactt tcattgagcc ccaccaccag caacacaatt gatttttact ttattttcat
 421 cttttaaagg agttgtgttc aaccatcaaa tgtttctctc tcttctctc tactcagttc
 481 ttctgtatc atttggcttt tgatcgaaga aagagaaata atccacaagg agccatataa
 541 taaacataaa gctgggaaac taacaaacta tataatctaa taaagaaaat agtagaattg
 601 acttgatcct aaaatttcaa gtctcatcta atgtggcctt taaactttgt atatcgtcac
 661 ttatgatgaa cttgatcaag gaaagagtgg aggtattttg acccaaatct ggggcaaatc
 721 ctccccaaat ttggaagaag taattagatt atctaacta tcatcttctc catattgtag
 781 tgttatatgg cctcaaataa acttgggatt tccaggacat gaggaaccag caaaagagat
 841 aagccatatc gtatctatag acgtttgtca atggcggaat cgcgcccgtt ctggtagtgc
 901 agcgatgaca gtgttgctgc tagaatgata ttattagggg ttgtttgtta aactaattaa
 961 tcaataaaat tttaaaaaca ttataaataa ataaaagctg attaaattca aatagattat
 1021 gtgtcacacg gcatatgaca tggattgcca tgtcacacat cagttgctaa caaaaagttg
 1081 gtgtttaagt tactgttaat gaaaagtgtt gttcaaaaaa gaaattttat cactgaaatt
 1141 ttacttttga tgtttcagtc ccctcaatta cgatccaaat tgaagaggtc ttggcccagc
 1201 gtggaaagtg gcaatgatac aaaattttgg gaaggtgaat ggaacaaaca cggcacata

LOCUS DQ269999 665 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₁₅-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ269999
 VERSION DQ269999
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..665
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Kech-pshar"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA join(<1..90,565..>665)
 /product="S15-RNase protein"
 CDS join(<1..90,565..>665)
 /codon_start=1
 /product="S15-RNase protein"
 /protein_id="ABB85344"

 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSNGSQFDARKVSPKMRIKLLKKSYPD
 VESGNDTRFWKDEWNKHGT"
 exon <1..90
 /number=2
 exon 565..>665
 /number=3

ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaat tattcaaacc caacgaagcc cagtaattgc
 61 aatgggtcgc aatttgatgc aaggaaagtg gtatgtattg tttcattatt ttttcacttt
 121 ctcttttagt ttttagaaaa ttagattgtc atatgaagat ttaaaaaaaa aaactacttt
 181 caataagtct tgggtgccag ataaattttt tgtggtggtt cttagctttt gttttgtttt
 241 tggggatggg ggttcttagt tagacacatt attttgaata tataagtaca aaatggtaag
 301 tatattatat ttatatgcat attaatgtac ttaagaaaat ataatggatc tgctcatcta
 361 attatatgac ctacccttg accaaaaaaa atgatgtacc atttttgtac tttaaaaaaa
 421 aaagggata atataaatca aaattcaatt taatgaancc aaaaaaaaaa aaaaaaattt
 481 attcaataat gaaaatctaa ttatcactta ttaaaattac tttttccaaa aatatgtata
 541 tattgcttgg atttgatgtc tcagtcccct aaaatgcaa tcaagctgaa gaaatcttgg
 601 ccagacgtgg aaagtggcaa tgatacaaga ttttggaag acgaatggaa caaacacggc
 661 acata

LOCUS DQ270001 659 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₁₇-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ270001
 VERSION DQ270001
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 659)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 659)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..659
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Aurora"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA join(<1..87,559..>659)
 /product="S17-RNase protein"
 CDS join(<1..87,559..>659)
 /codon_start=1
 /product="S17-RNase protein"
 /protein_id="ABB85346"

 /translation="FTIHGLWPSNYSNPRLPSNCIGSQFKGILSPQLRSKCLKTSWPDV
 EGGNDTKFWEGEWNKHGT"
 exon <1..87
 /number=2
 exon 559..>659
 /number=3

ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaat tattcaaacc caaggttgcc cagtaattgc
 61 attgggtcgc aatttaaggg aatattggta tgtattgggt ttgtttttca catgctcttt
 121 agcttttagt ttttaca aaa tttgattgct atatggagct aataaatttt ttcactaac
 181 cttggctttt aggtaaaagt ttgatggttg tcctttgggt cgacacactt gaaaatgcat
 241 ctaagcacga aattgtatat ttatattatc catgtatata tttataatat tggatttgat
 301 gatctaatta agggacttaa aatggtgtac ttatgtatat atattcaaaa aattgtgctc
 361 actgaaagga tatcaaggtc aaaattcaat ttaatactca ggcttaatga aaaaaaatc
 421 ttatctaaaa atgaaaatgt aactatccct aaaggttgta cttttttctt tggccaaaaa
 481 atgaaaaaag gctttaactt tttttctcaa actatgtctt catttttttt tcctcaata
 541 tttgcttggg tgtctcagtc ccctcaattg cgggtccaaac tgaagacatc atggccggac
 601 gtggaagggt gcaatgatac aaagtttttg gaaggcgaat ggaacaaaca cggcacata

LOCUS DQ270000 309 bp DNA linear PLN 22-NOV-2005
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S₁₈-RNase protein gene, partial cds.**
 ACCESSION DQ270000
 VERSION DQ270000
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 309)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE S-RNase sequence diversity in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 309)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2005) Department of Genetics and Plant
 Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi ut 44.,
 Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..309
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Kech-pshar"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="6"
 mRNA join(<1..90,209..>309)
 /product="S18-RNase protein"
 CDS join(<1..90,209..>309)
 /codon_start=1
 /product="S18-RNase protein"
 /protein_id="ABB85345"

 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSIGSQFNESKLSPKLRSKLKI SWPD
 VESGNDTKFWEGEWNKHGT"
 exon <1..90
 /number=2
 exon 209..>309
 /number=3

ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaa tattcaaacc caacgaagcc cagcaattgc
 61 attgggtcgc aatttaacga aagtaaattg gtacgtattg tttcattatt taatgaaaaa
 121 aattagtatc caagaatgaa aatttaacta tcccttaatt acgttttttag tttttctcaa
 181 aatatttcta tattgctgga tgtcacagtc ccctaaattg cgatccaaac tgaagatatac
 241 ttggccggac gtggaaagtg gcaacgatac gaagttttgg gaaggcgaat ggaacaaaca
 301 cggcacata

LOCUS EF173402 764 bp DNA linear PLN 07-DEC-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca partial S₂₀-RNase allele**
 ACCESSION EF173402
 VERSION EF173402
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 764)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Molecular analysis of self-(in)compatibility in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 764)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-DEC-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..764
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi Piroska"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /translation="GSYEYFQFVQWPPINCRVRNKKKPCSNRPLQYFTIIHGLWPSNYSNPTMPSNCNGSQFE
 DRKVYPQLRTRKLLKKS WPDVEDGNDTKFWEGEWN"

BASE COUNT 240 a 133 c 124 g 266 t
 ORIGIN
 1 tacttgttct tggttttgct ttcttctttt gttacgttat gagcagtggt gggttgcatt
 61 acaatatttc ttttgctctt tatatcctat acgcatataa taataagcat tgcgtttttc
 121 tacttgattt ttttgttcag agaaaatttt gtctattcat cacaataatt ttggcaggat
 181 cttatgaata ttttcaattt gtgcaacaat ggccaccgat caactgcaga gttcgcaaca
 241 agaaacctg ctccaacccc cggccattac aatacttcac cattcatggc ctatggccaa
 301 gtaattattc aaaccacaag atgcccagta attgtaatgg gtcgcaattt gaggacagga
 361 aagtggatg catcgtttat ttgtttctact tactctttag catttagttt tcagaaaatt
 421 agattatcgt ctgaggataa tatacttttt ttcaataagc ctttgggtat gctagatgaa
 481 attttgagga taatatctaa ttaaagaacc taccattttg tacttatgta tatcttgaaa
 541 atattgtcct taaataaatc aaaatcaaaa ttcaatttaa tactcagatt taatgttcga
 601 aaaaaccaat ctcatccaag aatgaaaatc taattatttc tcaaaaatag tatgtatctc
 661 aagtaccctc aacttcggac caaactgaag aaatcttggc ccgacgtgga agatgggaat
 721 gatacaaaat tttgggaagg tgaatggaac nagcacggca cata

LOCUS DQ386735 391 bp DNA linear PLN 03-MAR-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* Sc-RNase gene, exons 1, 2 and partial cds.**
 ACCESSION DQ386735
 VERSION DQ386735
 SOURCE *Prunus armeniaca* (apricot)
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 391)
 AUTHORS Halász,J., Hegedűs,A. and Pedryc,A.
 TITLE S-allele diversity in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 391)
 AUTHORS Halász,J., Hegedűs,A. and Pedryc,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-FEB-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44, Budapest 11180, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..391
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Borsi-féle kései rózsza"
 /db_xref="taxon:36596"
 /note="PCR_primers=fwd_name: PaConsI-F, rev_name:
 PaConsI-R"
 mRNA join(<1..21,283..>391)
 /product="Sc-RNase"
 CDS join(<1..21,283..>391)
 /codon_start=3
 /product="Sc-RNase"
 /protein_id="ABD63248"

 /translation="VFIMSTRSYVYFQFVQQPPTTCRVRWKPCSKPRPLQNFTIH"
 exon <1..21
 /number=1
 exon 283..>391
 /number=2
 ORIGIN
 1 ttgtgttcat tatgagcact agtgggtgggt tgcattacaa tcttttgctc tttatatcat
 61 atatgcatat aattagaatt acgaaggaga agtaggcagg aaatgtcatt aattagtaca
 121 taactttcct tggatgagtt actatctggg aattatcttt ctgcatggta tctttcgatt
 181 actctgatag ttggtgaaat aagtgcagta ttcattcattg gaagctaaaa tgggtgttctt
 241 cctgcataaa atccattaac cttctcacia taattttcgc aggatcttat gtctatcttc
 301 aatttggtgca acaatggcca cgcaccacct gcagagttcg ctggaaacct tgctccaaac
 361 cccggccatt acaaaacttc accatccatg a

LOCUS EF101911 418 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca self-incompatibility RNase S_c (S_c-RNase), partial cds.**
 ACCESSION EF101911
 VERSION EF101911
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 418)
 AUTHORS Halász,J., Hegedűs,A. and Pedryc,A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 418)
 AUTHORS Halász,J., Hegedűs,A. and Pedryc,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..418
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Gönci magyar kajszai"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /note="PCR_primers=fwd_name: PaConsI-F, rev_name:
 PaConsI-R"
 BASE COUNT 113 a 79 c 73 g 153 t
 /translation="LVLGFAFFLCFIMSTSGSYVYFQFVQWPPTTCRVRWKPCSKPRPLQNFTIH"
 ORIGIN
 1 tacttgttct tggttttgct ttcttcttgt gtttcattat gagcactagt ggtgggttgc
 61 attacaatct tttgctcttt atatcatata tgcataataat tagaattacg aaggagaagt
 121 aggcaggaaa tgtcattaat tagtacataa ctttctttgg atgagttact atttgggaat
 181 tatttttctg catggtatct ttcgattact ctgatagttg ttgaaataag tgcagtattc
 241 atcattggaa gctaaaatgg tgttcttctc gcataaaatc cattaacctt ctcaataa
 301 ttttcgcagg atcttatgtc tattttcaat ttgtgcaaca atggccaccg accacctgca
 361 gagttcgctg gaaaccttgc tccaaacccc ggccattaca aaacttcacc atccatga

LOCUS EF101905 897 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* self-incompatibility RNase S₂ (S₂-RNase), partial cds.**
 ACCESSION EF101905
 VERSION EF101905
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 897)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 897)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..897
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Bergeron"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /note="PCR_primers=fwd_name: EM-PC2consFD, rev_name:
 EM-PC3consRD"
 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTMPSNCSNGSKFEARKV
 YPQLRSDLKISWADVESGNDTKFWEGEWNKHGT"

BASE COUNT 286 a 157 c 167 g 287 t
 ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtatg tattcaaacc caacgatgcc tagtaattgc
 61 aatgggtcga aatttgaggc aaggaaagtg gtatgtattg tttttattta tttatttatt
 121 aataaatgta tatataggta tacctatgta tagatccctt tataataatg tatgtatcat
 181 ctaattaaag gcatataaat tttcctgcaa cggaatgctt ggtagctctt ttatataatt
 241 gtccccttcc aataagatgg tgccatcacc atttcataca aatTTTTtcta cttaaaaacc
 301 tcctagttgt tggatatggg ttacaaaatg gcaccatctt attggaaagg agatgattat
 361 gtggagagct gacctggcat tcccgtgcc atgaaagttt ctatcacttt agaggagaga
 421 aagtaggtat ggcaatggaa catcacttag ggtgtgttcc ggtagagat ataaccgaac
 481 accatgctcg aaagtttcc gcaaaactcat cgcctcttat attcgacttc tagtttttat
 541 aaccattag atcgaagccc tgcaactcgt ggagaaattt gtcaccccta ggaaaaaggg
 601 ataacctatc attttgtact tacgtagaca ttcagtattt aaaatatact atttatgaaa
 661 ggatcaaaat caaaagtcaa tttaatactc aggttcaatg ggaaaaagag atccaagaat
 721 gaaagtctaa tcattccttt agctttactc ttttttattt aggaatttct gaataaatat
 781 tgcttgtatg actcagtacc ctcaattgcg atccgatctg aagatatctt ggccggacgt
 841 gaaagtggc aatgacaaa aatTTTggga aggcgaatgg aacaaacacg gcacata

LOCUS EF101906 897 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* self-incompatibility RNase S₂ (S₂-RNase), partial cds.**
 ACCESSION EF101906
 VERSION EF101906
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 897)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 897)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 11180, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..897
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Konserniyi Pozdnii"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /note="PCR_primers=fwd_name: EM-PC2consFD, rev_name:
 EM-PC3consRD"
 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTMLSNCSNGSKFEARKV
 YPQLRSDLKISWPDVESGNDTKFWEGEWNKHGT"

BASE COUNT 288 a 158 c 164 g 287 t

ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaatt tattcaaacc caacgatgcc tagtaattgc
 61 aatgggtcga aatttgaggc aaggaaagtgt gtatgtattg tttttattta tttatttatt
 121 aataaatgta tatataggta tacctatgta tagatccctt tataataatg tatgtatcat
 181 ctaattaaag gcatataaat tttcctgcaa cggaatgctt ggtagctctt ttatataatt
 241 atccccttcc aataagatgg cgccatcacc atttcataca aatttttcta cttaaaaacc
 301 tcctagttgt tggatatggg tttacaaatg gcaccatctt attggaaagg agatgattat
 361 gtggagagct gacctggcat tcccgtgcc atgaaagttt ctatcacttt agaggagaga
 421 aagtaggtat ggcaatggaa catcacttag ggtgtgttcc ggtagagat ataaccgaac
 481 accatgctcg aaaattttcc gcaaactcat cgcctcttat attcgacttc tagtttttatt
 541 aaccattag atcgaagccc tgcaactcgt ggagaaattt gtcaccccta ggaaaaaggg
 601 ataacctatc attttgact tacgtagaca ttcagtattt aaaatatact atttatgaaa
 661 ggatcaaaat caaaagtcaa tttataactc aggttcaatg ggaaaaagag atccaagaat
 721 gaaagtctaa tcattccttt agctttactc ttttttattt aggaatttct gaataaatat
 781 tgcttgatg actcagtacc ctcaattgcg atccgatctg aagatatctt ggccggacgt
 841 gaaagtggc aatgacaaa aattttggga aggcgaatgg aacaaacacg gcactta

LOCUS EF101907 897 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* self-incompatibility RNase S₂ (S₂-RNase), partial cds.**
 ACCESSION EF101907
 VERSION EF101907
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 897)
 AUTHORS Halász, J., Hegedés, A. and Pedryc, A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 897)
 AUTHORS Halász, J., Hegedés, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..897
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Mamaia"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /note="PCR_primers=fwd_name: EM-PC2consFD, rev_name:
 EM-PC3consRD"
 /translation=" FTIHGLWPSNYSNPTMLSNCNGSKFEARKV
 YPQLRSDLKISWPDVESGNDTKFWEGEWNKHGT"

BASE COUNT 288 a 157 c 164 g 288 t
 ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaat tattcaaacc caacgatgcc tagtaattgc
 61 aatgggtcga aatttgaggc aaggaaagtg gtatgtattg tttttattta tttatttatt
 121 aataaatgta tatataggta tacctatgta tagatccctt tataataatg tatgtatcat
 181 ctaattaaag gcatataaat tttcctgcaa cggaatgctt ggtagctctt ttatataatt
 241 atccccttcc aataagatgg tgccatcacc atttcataca aatTTTTtcta cttaaaaacc
 301 tcctagttgt tggatatggg ttacaaatg gcaccatctt attggaaagg agatgattat
 361 gtggagagct gacctggcat tcccgtgcc atgaaagttt ctatcacttt agaggagaga
 421 aagtaggtat ggcaatggaa catcacttag ggtgtgttcc ggtagagat ataaccgaac
 481 accatgctcg aaaatTTtcc gcaaactcat cegtccctt attcgacttc tagTTTTtatt
 541 aaccattag atcgaagccc tgcaactcgt ggagaaattt gtcaccccta ggtaaaaggg
 601 ataacctatc atTTTgtact tacgtagaca ttcagtattt aaaatatact atTTatgaaa
 661 ggatcaaaat caaaagtcaa tTTaatactc aggttcaatg ggaaaaagag atccaagaat
 721 gaaagtctaa tcattccttt agctttactc ttttttattt aggaatttct gaataaatat
 781 tgcttgatg actcagtacc ctcaattgcg atccgatctg aagatatctt ggccggacgt
 841 gaaagtggc aatgacaaa aatTTTggga aggcgaatgg acaaacacg gcacata

LOCUS EF101908 895 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* self-incompatibility RNase S_{2m} (S_{2m}-RNase), partial cds.**
 ACCESSION EF101908
 VERSION EF101908
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 895)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 895)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..895
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Mandulakajszai"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /note="PCR_primers=fwd_name: EM-PC2consFD, rev_name:
 EM-PC3consRD"
 /translation="FTIHGLWPSNYSNPTMPSNCSNGSKFEARKV
 YPRLRSDLKISWPDVESGNDTKFWEGEWNKHGT"
 BASE COUNT 286 a 157 c 166 g 286 t
 ORIGIN
 1 ttcaccattc atggcctatg gccaaagtaat tattcaaacc caacgatgcc tagtaattgc
 61 aatgggtcga aatttgaggc aaggaaagtg gtatgtattg tttttattta tttatattt
 121 aataaatgta tatataggta tacctatgta tagatccctt tataataatg tatgtatcat
 181 ctaattaaag gcatataaat tttcctgcaa cggaatgctt ggtagctctt ttatataatt
 241 atccccttcc aataagatgg tgccatcacc atttcataca aatTTTTtcta cttaaaaacc
 301 tcctagttgt tggatatggg tttacaaatg gcacatctt attggaaagg agatgattat
 361 gtggagagct gacctggcat tcccgtgcc atgaaagttt ctatcacttt agaggagaga
 421 aagtaggtat ggcaatggaa catcacttag ggtgtgttcc ggtagagat ataaccgaac
 481 accatgctcg aaaatTTtcc gcaaaactcat cgtccttat attogacttc tagTTTTt
 541 aaccattag atcgaagccc tgcaactcgt ggagaaattt gtcaccccta ggaaaaagg
 601 ataacctatc atTTTgtact tacgtagaca ttcagtattt aaaatatact atTTatgaa
 661 ggatcaaaat caaaagtcaa tTTaatactc aggttcaatg ggaaaaagag atccaagaat
 721 gaaagtctaa tcattccttt agctttactc tttttattt aggaatttct gaataaatat
 781 tgcttgtatg actcagtacc ctcgattgag atccgatctg aagatatctt ggccggacgt
 841 ggaaagtggc aatgacacaa aatTTTggga aggcgaatgg aacaagcacg gcaca

LOCUS EF053410 564 bp mRNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* mRNA for *S₉-RNase partial cds.***
 ACCESSION EF053410
 VERSION EF053410
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 564)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility in apricot is attributable to a pollen-
 part mutation within the *S₈*-haplotype
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 564)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..564
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /translation="SLVLGFAFFLCFIMSTGSYVYFQFVQQWPPTTCRLSSKPSNQHRPLQRFTIHGLWPSNY
 SNPRKPSNCGSRFNFVRKVYPQLRNKLKISWPDVEGGNDTKFWEGEWNKHGTCSEERLNQMQYFERSHNIWMS
 YSIAEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVSPIKTATGRTPLLRCKYDKSTQLLHEVVF"

BASE COUNT 177 a 133 c 111 g 143 t
 ORIGIN
 1 tcccttggtc ttggttttgc tttcttcttg tgtttcatta tgagcactgg atcttacgtg
 61 tattttcaat ttgtgcaaca atggccaccg acgacctgca gacttagcag caaaccttcc
 121 aaccaacacc ggccattaca aagattcacc atccatggcc tatggccaag taactattca
 181 aaccaagga agcccagtaa ttgcaatggg tcgcgattta actttaggaa agtgtaccct
 241 caattgcaa ataaactgaa gatatcttgg cccgacgtgg aaggtggcaa cgatacaaaa
 301 ttttggaag gtgaatgaa caaacatggc acatggtccg aagagagact taaccaaagt
 361 caatactcg aacgatccca caacatttgg atgtcgtaca gtattgcaga gatccttaa
 421 aacgcttcaa tcgtaccgca tccgacacaa acatggaagt actcggacat agtatcacc
 481 attaaaacag caactggaag aacaccctc cttcgttgca aatacgataa gagcactcag
 541 ctgttacatg aagtgtatt ttga

LOCUS EF053409 583 bp mRNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca mRNA for S_C-RNase partial cds.**
 ACCESSION EF053409
 VERSION EF053409
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 583)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility in apricot is attributable to a pollen-
 part mutation within the S₈-haplotype
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 583)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..583
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Pannónia"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /translation="LAFLVLAFAFFLCLIMSTSGSYVYFQFVQWPPPTTCGVRWKPCSKPRPLQIFTIHGLWP
 SNYSNPTMPSYCTGSQFNDRKVYPQLRSKLRSWPNVESGNDTKFWEGEWNKHGTCSEQTLSQMQYFERSHAM
 WYSHNITNILKSASIVPHPTQTWKYSDIVSAIKTDTQRTPLLRCKRDPAPNSQLLHGSGIL"

BASE COUNT 167 a 148 c 115 g 153 t
 ORIGIN
 1 ctcgctttcc ttgttcttgc ttttgctttc ttcttgtgtc tcattatgag cactagtgga
 61 tcttatgtct attttcaatt tgtgcaacaa tggccaccga ccacctgcgg agttcgctgg
 121 aaaccttgct ccaaaccg gccattacaa atcttcacca tccatggcct atggccaagt
 181 aattattcaa acccaacgat gccagttat tgcactgggt cgcaatttaa cgacaggaaa
 241 gtgtaccctc aattgcggtc caaactgaag aggtcttggc ccaacgtgga aagtggcaat
 301 gatacaaaat tttgggaagg cgaatggaac aaacatggta catgttccga acagacactt
 361 agccaaatgc agtacttcga gcgatcccat gcaatgtggt actgcacaaa tattacaaat
 421 atccttaaga gcgcttcaat cgtaccacat ccgacacaga catggaagta ttcggacata
 481 gtatcagcta ttaaaacaga cactcaaaga acaccctcc ttcggtgcaa acgtgatcca
 541 gcacagccga actctcagct gttacatgga agtggatttt tga

LOCUS EF053408 575 bp mRNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* mRNA for *S*₈-RNase partial cds.**
 ACCESSION EF053408
 VERSION EF053408
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 575)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility in apricot is attributable to a pollen-
 part mutation within the *S*₈-haplotype
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 575)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..575
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /translation="LVLGFAFFLCLIMSTSGSYVYFQFVQWPPTTCGVRWKPCSKPRPLQIFTIHGLWPSNY
 SNPTMPSYCTGSQFNDRKVYPQLRSKLRSWPNVESGNDTKFWEGEWNKHGTCSEQTLSQMQYFERSHAMWYS
 HNITNILKSASIVPHPTQTWKYSDIVSAIKTDTQRTPLLRCKRDPAPNSQLLHEVVF"

BASE COUNT 149 a 114 c 144 g 168 t
 ORIGIN
 1 tcaaaatacc acttcatgta acagctgaga gttcggctgt gctggatcac gtttgcaacg
 61 aaggaggggt gttctttgag tgtctgtttt aatagctgat actatgtccg aatacttcca
 121 tgtctgtgtc ggatgtggta cgattgaagc gctcttaagg atatttgtaa tattgtgcca
 181 gtaccacatt gcatgggatc gctcgaagta ctgcatttgg ctaagtgtct gttcgggaaca
 241 tgtaccatgt ttgttcatt cgccttccca aaattttgta tcattgccac tttccacggt
 301 gggccaagac ctcttcagtt tggaccgcaa ttgagggtac actttcctgt cgtaaattg
 361 cgaccctagt caataactgg gcatcgttgg gtttgaataa ttaactggcc ataggccatg
 421 gatggtgaag atttgtaatg gccggggttt ggagcaaggt ttccagcgaa ctccgcaggt
 481 ggtcgggtgc cattgttgca caaattgaaa atagacataa gatccactag tgctcataat
 541 gagacacaag aagaaagcga aaccaagaac aagta

LOCUS EF173398 565 bp mRNA linear PLN 04-DEC-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca mRNA for S₁₁-RNase, partial cds.**
 ACCESSION EF173398
 VERSION EF173398
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 565)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Molecular analysis of self-(in)compatibility in apricot
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 565)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-DEC-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..565
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Harmat"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI:"

/translation="LAFLVLAFAPFFCYVMSTGSDYDFQFVQWPPTNCKFRKCSKPRPLQRFTIHGLWPSNY
 SNPSRPSNCTGLQFEARKVYPQLQSDLKISWPDVESGNDTKFWEDEWNKHGKCSEQTLNQRQYFERSHAMWTS
 FNITEILKNASIVPHPKKTWSYSDIVAPIKTATGRTPLLRCKLDKKTQLLHEVVVF"

BASE COUNT 174 a 132 c 108 g 151 t
 ORIGIN

```

1 tctcgctttc cttgttcttg cttttgcttt cttcttttgt tacgttatga gcaactggatc
61 ttatgactat tttcaatttg tgcaacaatg gccaccaacc aactgcaaat ttcgcaaatg
121 ctcaaacc cggcctttac aaagattcac catccatggc ctatggccaa gtaattattc
181 aaaccatcg aggcccagta attgcactgg attgcaattt gaggcaagga aagtgtacc
241 tcagttgcaa tctgatctga agatatcttg gcccgacgtg gaaagtggca atgatacaaa
301 attttgggaa gacgaatgga acaaacatgg taagtgttcc gaacagacac ttaatcaaag
361 gcagtacttc gagcgatecc acgcaatgtg gacctcgttc aatattacag aaatccttaa
421 aaacgcttca atcgtaccac atccgaaaaa aacatggagc tattcggaca tagtagcacc
481 cattaaaaca gcaactggaa gaacaccctt ccttcgttgc aaactggata agaagactca
541 gctggtacat gaagtggat tttga
  
```

LOCUS EF173399 609 bp mRNA linear PLN 04-DEC-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca mRNA for S₁₃-RNase, partial cds.**
 ACCESSION EF173399
 VERSION EF173399
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 609)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Molecular analysis of self-(in)compatibility in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 609)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-DEC-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..609
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Korai zamatos"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /tissue_type="style"
 /translation="LVLGFAFFLCFIMSTGDGSYDYFQFVQWPPTNCRVRTKCANPRPLQIFTIHGLWPSNY
 SNPTMPSNCGSKFEDRKVSPQLRSKLRKRSWPDVESGNDTKFWEGEWNKHGTCSEQTLNQMQYFERSHSMWYS
 FNITEILRNASIVPSATQTRTYSDIVSAIKTATQRTPLLRCKPQPKTKSQTKSQPKSQANSLLLHEVVVF"

BASE COUNT 189 a 149 c 119 g 152 t
 ORIGIN
 1 tacttgttct tggttttgct ttcttcttgt gtttcattat gagcaactggt gatggatctt
 61 atgactatth tcaatttgtg caacaatggc caccgaccaa ctgtagagtt cgaacgaaat
 121 gcgccaaccc cgggccatta caaatcttca ccatccatgg cctatggcca agtaattatt
 181 caaacccaac gatgcccagt aattgcaatg ggtcaaaatt tgaggacagg aaagtgtccc
 241 ctcaattacg atccaaattg aagaggtctt ggcccgcagt ggaaagtggc aatgatataa
 301 aatthttggga aggtgaatgg aacaaacacg gtacatgttc cgaacagaca ttaaaccaaa
 361 tgcaataact cgagcgatcc cactcaatgt ggtactcgtt caatattaca gaaatcctta
 421 gaaacgcttc aatcgtacca agtgcgacac aaacacggac ctactccgac atagtatcag
 481 ccattaaaac tgcaactcaa agaacacccc tccttcggtg caaacctcag cctaagacta
 541 agagccagac gaagtctcag cccaagagcc aggcgaactc tctgctgtta catgaagtgg
 601 tattttgaa

LOCUS EF173400 575 bp mRNA linear PLN 04-DEC-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca mRNA for S₁₅-RNase, partial cds.**
 ACCESSION EF173400
 VERSION EF173400
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 575)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Molecular analysis of self-(in)compatibility in apricot
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 575)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-DEC-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..575
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Kech-pshar"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /tissue_type="style"
 /translation="SLFLVLAFAFFLFCFIMSTGYSYVYFQFVQWPPTNCRVRIKRPCSNRPLQYFTIHGLWP
 SNYSNPTKPSNCNGSQFDARKVSPKMRIKLLKSWPDVESGNDTRFWKDEWNKHGTCSEERLNQMQYFERSHDM
 WLSYNITEILKNASIVPHPTQWTWYSDIVSPLKTATGRTPTLRCKQDKKTQLLHEVVF"
 BASE COUNT 177 a 137 c 111 g 150 t
 ORIGIN
 1 tctcgcgtttt ccttggttctt gcttttgctt tcttcttggtg tttcattatg agcactggat
 61 cttatgtcta ttttcaattt gtgcaacagt ggccaccgac caactgcaga gttcgcacatca
 121 agcgaccttg ctccaatccc cggccattac aatatttcac catccatggc ctatggccaa
 181 gtaattattc aaacccaacg aagcccagta attgcaatgg gtcgcaattt gatgcaagga
 241 aagtgtcccc taaaatgcca atcaagctga agaaatcttg gccagacgtg gaaagtggca
 301 atgatacaag attttgaaa gacgaatgga acaaacatgg tacatgttcc gaagagagac
 361 ttaaccaaata gcaatacttc gagcgatccc acgatatgtg gttgtcgtac aatattacag
 421 agatccttaa aaacgcttca atcgtaccac atccgacaca aacatggaca tactcggaca
 481 tagtatcacc ccttaaaaca gcaactggaa gaacaccac ccttcgctgc aaacaggata
 541 agaagactca gctgttacat gaagtggat tttga

LOCUS EF173401 563 bp mRNA linear PLN 04-DEC-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca mRNA for S₁₆-RNase, partial cds.**
 ACCESSION EF173401
 VERSION EF173401
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 563)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Molecular analysis of self-(in)compatibility in apricot
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 563)
 AUTHORS Halász, J., Pedryc, A. and Hegedűs, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-DEC-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..563
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Zard"
 /db_xref="taxon:36596"
 /tissue_type="style"
 /translation="LVLAFAFFLCFIMSTGSYVYFQFVQQWPPTNCRVRSKPCSKPRPLQNFTIPGLWPSNYS
 NPRAPSNCNGSRFNDGKLSPELRALKKISWPDVESGNDTKFWEGEWNKHGTCSEGMLNQMQYFERSYAMWMSY
 NITEILKNASIVPHPTKTKWKYSDIVAPIQTATGRTPLLRCKWNYNNQLLHEVVF"
 BASE COUNT 171 a 128 c 114 g 150 t
 ORIGIN
 1 tacttgttct tgcttttgct ttcttcttgt gtttcattat gaggactgga tcttatgtct
 61 attttcaatt tgtgcaacaa tggccaccga ccaactgcag agttcgctcg aaaccttgct
 121 ccaaaccg gccattacaa aacttcacca tccctggcct atggccaagt aattattcaa
 181 acccaagggc gccagtaat tgcaatgggt cgcgatttaa tgacgggaaa ttgtctcctg
 241 aattacgggc caaactgaag atatcttggc cggacgtgga aagtggcaat gatacaaagt
 301 ttgggaagg agaatggaat aaacatggta catgttctga agggatgctt aaccaaatgc
 361 aatacttcca gcgatcctac gcaatgtgga tgtcgtacaa tattacagaa atacttaaaa
 421 acgcttcaat cgtaccacat ccgacaaaaa catggaagta ctcgacata gtagcaccca
 481 ttcaaacagc cactggaaga acaccctcc tccgttgcaa atggaattac aataatcagc
 541 tgttacatga agtggattt tga

LOCUS EF053405 1068 bp DNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* F-box 1 gene partial cds.**
 ACCESSION EF053405
 VERSION EF053405
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1068)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility in apricot is attributable to a pollen-
 part mutation within the S8-haplotype
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1068)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1068
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /note="PCR primers=fwd_name: AprSFB-F2, rev_name: AprSFB-R"
 /translation="SLVRFICACKSWSDLINSSSFITTLQNRNVTKHLHVSLLCLHYPDLKRPFEFYENYEDY
 PDLKRELEWSLFSNETFEHCSKLNHPLGIKKDYRVYVYSSNGLVCI SDDKLDTKSPIHIWNPSVRKFRITLPMST
 NVKFRYIALQFGFHPGVNDYKVVRLRVHKDDAFAVEVYSLSTDSWKKG"

BASE COUNT 307 a 213 c 228 g 320 t
 ORIGIN
 1 ttctcttggt cggtttattt gtgcatgcaa gtcattggagt gatttgatta acagctcgag
 61 ttttatcacc acacagctta acaggaatgt caccaaacac ctccatgtct ctctactttg
 121 cctccactac cccgatctca aacgtccttt cgagttctac gaaaactacg aggactacc
 181 agatcttaaa cgagaattgg aatggtcact tttctccaac gaaacatttg agcattgctc
 241 caagttaaac catcccttgg ggatcaagaa agattatagg gtatatggct caagcaatgg
 301 cctagtatgc atttcggatg acaaattgga caccaagagc cctatacaca tatggaacc
 361 ctcggttagg aaatttagaa cccttccaat gagcaccaac gttaaatttc gctatattgc
 421 tctccaattc gggttccacc cgggggttaa tgactacaag gttgtaagga tgttgcgct
 481 ccacaaagat gatgctttcg cagtcgaagt ttatagtctc agcacagact cttggaagaa
 541 gggttgaaga acatcctctt tggttaaaat gcaactggca gaaccacagg ggtacatttt
 601 ataatggagt agcataccac attattgaga aatttcctct attcagcgtt atgtcattcg
 661 attcgggcag cgaaaaattc gaagagttca tagcaccgga tgccattaga ttttggtcgc
 721 tgctgtatat tgaggtttac aaggatcaaa tttgcttgc tttattttg agattgtttc
 781 attgtgagga agaaggcattg tcacaaattg agttttgggt tctgcaagaa aaacgatgga
 841 aagaaatgcg tccttttctt tctcctttcg actactacaa tgtagttggg ttcagtatag
 901 ataatgaact attaatggag agaagtgggt atggcaatgc tctgtatttg tgcaactatg
 961 aatccaagca aggtcgtgag acagggattg agttggccat ctcgagaaat gaccctgagc
 1021 agctcttggt tgtatttacc tacatagaaa gtatggtttt actcaata

LOCUS EF053407 1067 bp DNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca F-box 2 gene partial cds.**
 ACCESSION EF053407
 VERSION EF053407
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1067)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility analysis in apricot
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1067)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1067
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /note="PCR primers=fwd_name: AprSFB-F2, rev_name: AprSFB-R"
 /translation="SLVRFICACKSWSDLINSSSFITTLNRNVTKHLHVSLLCLHYPDLKRPFEFYENYEDY
 PDLKRELEWSLFSNETFEHCSKLNHPLGIKKDYRVYGSSNGLVCSDDKLDTKSPIHIWNPSVRKFRITLPMST
 NVKFRYIALQFGFHPGVNDYKVVRLRVHKDDAFAVEVYSLSTDSWKMVVEEHLWLKCTWQNHRTFYNGVTY
 HIIIEKFPLFSVMSFDGSEKFEEFIAPDAIRCWSLLYIEVYKDQICLLYLRFLFHCEEEGMSQIEFWVLQEKR
 WKEMRPFLLYPFKNYNVVGFSIDNELSMERSGYGNALYLCNYESKQDRETGIELAISRNDPEQLLFVFTYIESL
 VLLN"

BASE COUNT 310 a 218 c 224 g 315 t
 ORIGIN
 1 ttctcttggt cgatttattt gtgcatgcaa gtcattggagt gatttgatta acagctcgag
 61 ttttatcacc acacagctta acaggaatgt caccaaacac ctccatgtct ctctactttg
 121 cctccactac cccgatctca aacgtccttt cgagttctac gaaaactacg aggactacc
 181 agatcttaaa cgagaattgg aatggtcact tttctccaac gaaacatttg agcattgctc
 241 caagttaaac catcccttgg ggatcaagaa agattatagg gtatatggct caagcaatgg
 301 ctagtttgc atttcggatg acaaattgga caccaagagc cctatacaca tatggaacc
 361 ctcggttagg aaatttagaa cccttccaat gagcaccaac gtcaaatttc gctacattgc
 421 tctccaattc gggttccacc ccgggggtaa cgactacaag gttgtaagga tggtagcgt
 481 ccaaaagat gatgctttcg cagtcgaagt ttatagtctc agcacagact cttggaaaat
 541 ggttgaagaa catcctcttt ggttaaaatg cacttggcag aaccacaggg gtacatttta
 601 taatggagta acataccaca ttattgagaa atttctctta ttcagcgtta tgtcattcga
 661 ttcgggcagc gaaaaattcg aagagttcat agcaccggat gccattagat gttggctcgt
 721 gctgtatatt gaggtttaca aggatcaaat ttgcttgctt tattatttga gattgtttca
 781 ttgtgaggaa gaaggcatgt cacaaattga gttttgggtt ctgcaagaaa aacgatggaa
 841 agaaatgcgt ctttttcttt atcctttcaa gaactacaat gtagttgggt tcagtataga
 901 taatgaacta tcaatggaga gaagtgggta tggcaatgct ctgtatttgt gcaactatga
 961 atccaagcaa gatcgtgaga cagggatcga gttggccatc tcgagaaatg accctgagca
 1021 gctcttggtt gtatttacct acatagaaag cttgggttta ctcaata

LOCUS EF053404 1061 bp DNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca S-locus F-box 8 (SFB₈) protein partial cds.**
 ACCESSION EF053404
 VERSION EF053404
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1061)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility in apricot is attributable to a pollen-part mutation within the S₈-haplotype
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1061)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1061
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi óriás"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /note="PCR primers=fwd_name: AprSFB-F2, rev_name: AprSFB-R"
 /translation="SLVRFLCTCKSWSDLIGSSIFVSTHLCRNVTKHTHVYLLCLHHPNFERLVDPNDPYLKK
 EFQWSLFPKETFEECYKLSHPLGMTEHYGIYSSNGLVCISDEILNFDSPIHIIWNPSVRKFRALPMSTNINIK
 FSCVALQFGFHPGVNDYKAVRMMRTNKSALAVEVYSLKRDSWKMIEAIPPWLKCTLEHHRGTFSSGVAYHIIQ
 KGPMLSIMSFDSGSEKFEEIIAPDAICSLWGLYIDVYKEQICLLFCYGCSEEGMEKADLWVLQEKRWKQLSP
 FIYPPDYCYCTTGISMDNKILMLRVDDIRGIRNLDLDCYESNQVLETGIELATMKYGEIEFLFSITYVESMVL
 LN"
 BASE COUNT 306 a 190 c 232 g 333 t
 ORIGIN
 1 ttctcttggt cggtttattt gcacatgcaa gtcttggagt gatttgattg gcagctcgag
 61 ttttgtagc acacaccttc ataggaatgt cacaaaacat gcccatgtct atttactctg
 121 cctccgccac ccaaatggtg aacgtcaggc tgatcctgac gacccgatg ttgaacaaga
 181 atttcaatgg tctctatatt ccaatgaaac atttgaggat tgctccaagt taagccatcc
 241 cttggggagc acaaaacatt atgtgatata tggctcaagc aatgggttag tttgcatttc
 301 ggatgagatg ctgaattttg atagtcctat acacatatgg aacctatcgg ttaggaaact
 361 tagaaccgct ccaatcagca gcaacattaa cattaaattt agccatggtg ctctccaatt
 421 cgggttccac cccgggggta atgactaaa ggctgtcagg ctgatgcgca ccaacaacg
 481 tgccttggca gttgagggtt atagctcag aacagactct tggagatga ttgaagcaat
 541 tcctccttgg ttaaagtgca cttggcagca ttataagggg acatttttta atggagtagc
 601 ataccacatc attgagaaag gtcctatatt cagcattatg tcctttgatt taggcagtga
 661 acaattcgaa gaattcatag caccagatgc catttgcagt tcatgggggt tatgtattga
 721 cgtttacaag ggacaaattt gcttgctttt aaaatgttat gggtgtgagg aggagggcat
 781 ggagaaaatt gacttatggg ttctgcaaga aaaactgtgg aaacaattgt ttctttttat
 841 ttatcctttt ggttattggt atgatataat cggtattaat atagatgatg aactgttaat
 901 gggaagaaca gatatagcta agggcgtagc agatctattt ttgtgtaatt acgaatccaa
 961 gcaagttcgt gaaacaggaa tcaagttggg cctgatgtca tatggggaaa tcgaatcctt
 1021 gtgttcaatt acttacatag aaagtatggt ttactcaat a

LOCUS EF053403 1061 bp DNA linear PLN 06-OCT-2006
 DEFINITION ***Prunus armeniaca* S-locus F-box protein 9 (SFB₉) gene partial cds.**
 ACCESSION EF053403
 VERSION EF053403
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1061)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Self-compatibility in apricot is attributed to a pollen-part
 mutation within the S₈-haplotype
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1061)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi 44., Budapest 1118, Hungary
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1061
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Ceglédi arany"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI."
 /note="PCR primers=fwd_name: AprSFB-F2, rev_name: AprSFB-R"
 /translation="SLVRFICTCKSWSDLIGSSSFVSTHLHRNVTKHAHVYLLCLRHPNVERQADPDDPYVEQ
 EFQWSLFSNETFEDCSKLSHPLGSTKHYVIYGSSNGLVCISDEMLNFDSPIHWNPSVRKLRTAPISSNINIK
 FSHVALQFGFHPGVNDYKAVRLMRTNKRALAVEVYSLRTDSWKMI EAI PPWLKCTWQHYKGTFFNGVAYHII E
 KGPIFSIMSFDLGSEQFEEFIAPDAICSSWGLCIDVYKGQICLLLLKCYGCEEEMGEKIDLWVLQEKLWKQLFP
 FIYPFGYCYDIIGINIDDELLMGRTDIAGKVADLFLCNYESKQVRETGIKLG LMSYGEIESLCSITYIESMVL
 LN"
 BASE COUNT 305 a 194 c 233 g 329 t
 ORIGIN
 1 ttctcttggt cggtttattt gcacatgcaa gtcttggagt gatttgattg gcagctcgag
 61 ttttgtagc acacaccttc ataggaatgt cacaaaacat gcccatgtct atttactctg
 121 cctccaccac ccgaatggtg aacgccaggc tgatcctgac gacccgatg ttgaacaaga
 181 atttcaatgg tctctatatt ccaatgaaac atttgaggat tgctccaagt taagccatcc
 241 cttgggggagc acaaaacatt atgtgatata tggctcaagc aatgggttag tttgcatttc
 301 ggatgagatg ctgaattttg atagtcctat acacatatgg aacctatcgg ttaggaaact
 361 tagaaccgct ccaatcagca gcaacattaa cattaaattt agccatggtg ctctccaatc
 421 cgggttccac cccgggggta atgactaaa ggctgtcagg ctgatgcgca ccaacaacg
 481 tgccttgga gttgagggtt atagtctcag aacagactct tggagatga ttgaagcaat
 541 tcctccttgg ttaaagtgca cttggcagca ttataagggg acatttttta atggagtagc
 601 ataccacatc gttgagaaag gtcctatatt cagcattatg tcctttgatt taggcagtga
 661 acaattcgaa gaattcatag caccagatgc catttgcagt tcatgggggt tatgtattga
 721 cgtttacaag ggacaaattt gcttgctttc aaaatggtat gggtgtgagg aggagggcat
 781 ggagaaaatt gacttatggg ttctgcaaga aaaactgtgg aaacaattgt ttctttttat
 841 ttatcctttt ggttattggt atgatataat cggtattaat atagatgatg aactgttaat
 901 gggaagaaca gatatagcta agggcgtagc agatctattt ttgtgtaatt acgaatccaa
 961 gcaagttcgt gaaacaggaa tcaagttggg cctgatgtca tatggggaaa tcgaatcctt
 1021 gtgttcaatt acttacatag aaagcatggt ttactcaat a

LOCUS EF101912 1464 bp DNA linear PLN 03-NOV-2006
 DEFINITION **Prunus armeniaca S-locus SFB_c, partial cds.**
 ACCESSION EF101912
 VERSION EF101912
 SOURCE *Prunus armeniaca*
 ORGANISM *Prunus armeniaca*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 core eudicotyledons; rosids; eurosids I; Rosales; Rosaceae;
 Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1464)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Analysis of self-compatibility in *Prunus armeniaca*
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1464)
 AUTHORS Halász, J., Hegedűs, A. and Pedryc, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-NOV-2006) Genetics and Plant Breeding, Corvinus
 University of Budapest, Menesi ut 44., Budapest 1118, Hungary

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1464
 /organism="Prunus armeniaca"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Pannónia"
 /db_xref="taxon:36596"
 /chromosome="VI"
 /translation="KKEILIDILVRLPAKSLIRFLSTCKSWSDLIGSSIFVSTHLCRNVTKHHTHYLLCLHHP
 NFERLVDPNDPYLKKEFQWLSLFPKETFEECYKLSHPLGMTEHYGIYSSNGLVCISDEILNFDSPIHWNPSV
 RKFRALPMSTNINIKFSCVALQGFHFGVNDYKAVRMMRTNKSALAVEVYSLKRDSWKMIEAIPPWLKCTLEH
 HRGTFFSGVAYHIIQKGPMLSIMSFDSGSEKFEEIIAPDAICSLWGLYIDVYKEQICLLFCYGC EEGMEKA
 DLWVLQEKRWKQLSPFI"

BASE COUNT 450 a 236 c 290 g 488 t
 ORIGIN
 1 taagaaagaa atcttaatcg acatcctagt aagactacct gcaaaatccc ttattcgctt
 61 tctgagtaca tgcaagtcgt ggagtgattt gattggaagc tcaatTTTTg ttagcacaca
 121 cttttagtag aatgtgacaa aacataccca tgtttatcta ctttgccctc accacccaaa
 181 ttttgagcgt ttggtcgacc ctaatgacc atactttaa aaggaatttc aatggctctc
 241 ttttcccaa gaaacatttg aggagtgcta caaactaagc catcccttag ggatgactga
 301 acattatggg atatatggtt caagcaatgg tttagtttgc atttcggatg agatcctgaa
 361 tttcgatagt cctatacaca tatggaaccc atcggttagg aaatntaggg cccttccaat
 421 gagcaccaac attaacatta aatntagctg tgttgctctc cagttcgggt tccaccctgg
 481 ggtaaatgac tacaaggctg taaggatgat gcgtaccaat aaaagtgcct tggcggttga
 541 ggtttatagt ctcaaagag actcttgga gatgattgaa gcaattcctc cttggttaa
 601 atgcactttg gaacatcata ggggtacgtt tttcagtgga gtagcatacc acatcattca
 661 gaaagtcct atgctcagca ttatgtcatt cgattcaggc agtgaaaaat tccaagaaat
 721 catagcacca gatgccattt gcagtttatg ggggttatat attgacgttt acaaggaaca
 781 aatttgcttg ctttttatat gttatgggtg tgaggaggag ggcattgaaa aagctgactt
 841 atgggttctg caagaaaaac ggtggaaca attgagtcct tttatttaga gatatttagt
 901 gatataccca ttcttaacac taatattata gataaacct ccatcattga atttctataa
 961 acaaacccaa aaaaaacca aaaaatgaca actggcctta ttgaatctaa tattgattat
 1021 taaattactt taatgccta ttgagtgttt tgggtatttt tatgagattt tggggttggg
 1081 cttgttttta gaaatattat gtagttttgt aatttctaag aagttaaagc ctttttggtt
 1141 tattgtaaat gggttttggg tgtgtttata aagttcattt catatagggg atttttataa
 1201 tttgggtcct catattgggt atattagtaa atctccctt tatttatcct cgggattatt
 1261 attattgtac aacagggatt agtatggata acaaaatcct aatgctaaga gtagatgaca
 1321 ttagaggcat aagaaatctg gatttatgtg attacgaatc caaccaagtt cttgaaacag
 1381 gaattgagtt ggccaccatg aaatatggcg aaatcgaatt cttgttttca attacttacg
 1441 tagaaagttt ggttttactc aata

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőm, **Dr. Pedryc Andrzej** segítségét és a munkám feltételeinek, nyugodt háttérének biztosítását, külön kiemelve, hogy lehetővé tette eredményeim számos nemzetközi konferencián történő bemutatását.

Köszönöm **Dr. Hegedűs Attilának** a fehérjemunkákban, a kísérletek tervezésében és értékelésében, valamint az eredmények publikálásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Megköszönöm **Hermán Ritának** a mintabegyűjtésben, a szabadföldi munkákban és a kísérletek során felmerülő feladatokban nyújtott precíz segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Palkovics Lászlónak**, akihez a molekuláris technikák alkalmazása során felmerülő kérdéseimmel bármikor fordulhattam.

Köszönöm **Bacs kainé Papp Annának** és **Tóth Verának** a laboratóriumi munkákban nyújtott sokoldalú segítségüket.

Köszönettel tartozom **Dr. Békefi Zsuzsannának** és **Dr. Kiskó Gabriellának** a mikroszkópos munkák megtanításáért.

Megköszönöm **Dr. José Miguel Sorionak**, **Szegő Anitának** és **Szathmáry Erzsébetnek** a klónozásban, és a laboratóriumi munkák során felmerülő problémák megoldásában nyújtott segítségüket, illetve **Stefanovitsné Dr. Bányai Éva** hasznos tanácsait.

Köszönet illeti a növényanyag rendelkezésünkre bocsátásáért **Szani Zsoltot** (Tordas), **Dr. Boris Krskát** (Lednice), **Dr. Erdős Zoltánt** (Cegléd) és **Dr. Szabó Zoltánt** (Boldogkőváralja).

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



Good luck
in your PhD
Maria

Maria Luisa Badenes

Don't forget us!
It has been a pleasure to know you
I hope we will keep in contact
and, who knows, perhaps collaborating
together. Best Regards

CRomero
Carlos Romero

It's been a pleasure
to have you here.
I hope all the things we
teach you will be useful
in the future

SANTI
**Santiago
Vilanova**

Burgos
Dr. L. Burgos

Con amistad
Gerardo Llacer
Gerardo

*Regards from
Felipe Cruz*
Felipe Cruz-Garcia



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

Dr. Pedro Martínez-Gómez



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA
APLICADA DEL SEGURO

Júlia Halász
Department of Plant Genetics
Faculty of Horticultural Science
Corvinus University of Budapest

December 4th, 2006

Dr. Pedro Martínez-Gómez Responsible of the Laboratory of Molecular Markers in the Department of Plant Breeding at the CEBAS-CSIC of Murcia (Spain), attending the quality of publications, responds that the scientific work of **Ms. Júlia Halász** (PhD student at the Faculty of Horticultural Science at the Corvinus University of Budapest) is of an **excellent quality**.

She has been researching in the study of flower self-incompatibility in *Prunus* species (mainly apricot, peach and plum) and the use of molecular markers for the selection of this trait in breeding programs. The results obtained and published in international horticultural journal of high impact including *Euphytica*, *HortScience* and *Journal of the American Society for Horticultural Science*, represent a **great international contribution to this field**.



[Signature]
Dr. Pedro Martínez Gómez.
Department of Plant Breeding
CEBAS-CSIC, Murcia, Spain

e-mail: pmartinez@cebas.csic.es
www.cebas.csic.es

APARTADO DE CORREOS 164
30100 - ESPINARDO. MURCIA.
ESPAÑA
TEL: 968 39 62 00
FAX: 968 39 62 13

To the front with simplicity
[Signature]

Carlo Fideghelli

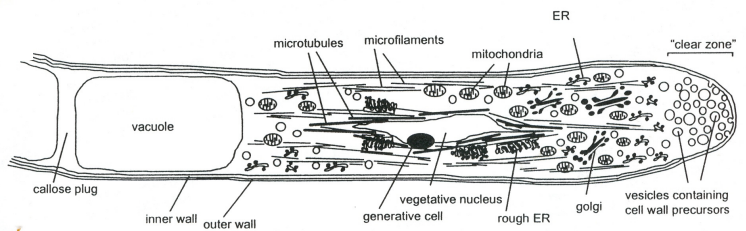


Figure 1. Generalized Diagrammatic Representation of a Pollen Tube.
Features and components generally considered to be present at the growing tip of pollen tubes. For details, see the text.

*Julia - Best wishes -
Noni Franklin-Tong*

Vernonica Franklin-Tong