

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



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

Szikriszt Bernadett

Kertészettudományi Doktori Iskola

Budapesti Corvinus Egyetem
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest

2012

A Doktori Iskola

Megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, D.Sc.

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezetők: Dr. Halász Júlia
egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Hegedűs Attila
egyetemi docens, Ph.D.

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Genetika és Növénynevelés Tanszék

A doktori iskola és a témavezetők jóváhagyó aláírása:

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

.....
Dr. Tóth Magdolna

A doktori iskola vezetőjének
jóváhagyása

.....
Dr. Halász Júlia

.....
Dr. Hegedűs Attila

A témavezetők jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

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

A cseresznye (*Prunus avium* L.) elsődleges vélt géncentruma Nyugat-Ázsia területére tehető, a mérsékelt égövi régióra (De Candolle, 1894). Ezen belül a Fekete-tenger déli partvidéke, a nyugat-anatóliai régió szerepét mint elsődleges géncentrumot erősen vélelmezték annak köszönhetően, hogy a latin *Cerasus* szó feltehetően a hajdani pontuszi Kerasun város nevéből származik. Ez a régió jelenleg Törökországban található, mai elnevezése Giresun (Faust és Surányi, 1997). Más rokon fajok mellett a csepleszmegegy (*Prunus fruticosa*) és a meggy (*Prunus cerasus*) is megtalálható az anatóliai régióban (Ercisli, 2004). A meggy feltehetően a *P. fruticosa* és *P. avium* (Iezzoni és Hancock, 1996; Tavaud és mts., 2004) természetes hibridének tekinthető.

A *Rosaceae* növény család *Prunoideae* alcsaládjába sorolható valamennyi csonthéjas gyümölcsfaj, többek között a cseresznye önmeddősége is gametofitikus típusú. A természetben az idegentermékenyülés evolúciós léptékekben szelektív előnyt jelent az adott faj számára, a termesztők azonban jobban kedvelik az öntermékenyülő fajtákat. Önmeddő fajta monokultúrában nem termesztendő, ezért a sikeres ültetvénytársítás tervezésekor a genetikailag meghatározott, ivari összeférhetőséget kiemelt szempontként kell kezelni. A termékenyülés viszonyait a multiallélikus *S*-lókusz szabályozza (de Nettancourt, 2001). Az *S*-lókuszban található két gén, melyek közül az egyik a bibében expresszáldó ribonukleáz (*S*-RN-áz) enzimet (McClure és mts., 1989), míg a másik a pollentömlőben kifejeződő, ún. *S*-haplotípus-specifikus F-box fehérjét kódolja (Lai és mts., 2002; Entani és mts., 2003; Ushijima és mts., 2003). Abban az esetben, ha a haploid pollenszem *S*-allélja a bibe *S*-alléljai közül bármelyikkel azonos, gametofitikus önmeddőség alakul ki, a pollenszemek ugyan kicsíráznak a bibe felületén, de a pollentömlő-növekedés a bibeszál felső harmadában megáll. Így a pollentömlő nem képes eljutni az embriózsákig, a termékenyülés meghiúsul.

Az *S*-RN-áz gén öt konzervált (C1-C3, RC4 és C5) és egy hipervariábilis régiót (RHV) tartalmaz, amely a gömb térszerkezetű fehérje felszínén helyezkedik el, és fontos szerepet

játszik a saját/idegen felismerésben (Ushijima és mts., 1998). A csonthéjas gyümölcsök *S-RN-áz* génjére két, allélspecifikusan változó méretű intron jelenléte jellemző.

A cseresznyefajták önmeddőségét és kölcsönös meddősége régóta ismert (Crane és Lawrence, 1929). Matthews és Dow (1969) teszt-keresztezésekre alapozva, hat cseresznye *S*-allélt azonosítottak (S_1 - S_6), majd később izoenzim és molekuláris vizsgálatokkal további 10 allél jelenléte volt igazolható (Bošković és mts., 1997; Bošković és Tobutt, 2001).

Később azonban kimutatták, hogy az S_8 és S_3 , S_{15} és S_5 illetve az S_{11} és az S_7 szinonim allél elnevezések (Sonneveld és mts., 2003). Spanyol fajtákban három további allélt (S_{23} - S_{25}) azonosítottak (Wünsch és Hormaza, 2004), bár az S_{23} az S_{14} -alléllal, míg az S_{25} az S_{21} -alléllal feltehetően azonos (Vaughan és mts., 2008). Belgiumi és angol vadcsesznyékben további 12 allélt (S_{17} - S_{22} és S_{27} - S_{32}) azonosítottak (De Cuyper és mts., 2005; Vaughan és mts., 2008). Bizonyos vadcsesznye allélok (S_{17} , S_{19} , S_{21} és S_{22}) szicíliai, német és magyar árufajtákban is kimutattak (Békefi és mts., 2003; Marchese és mts., 2007; Schuster és mts., 2007).

Nyolc cseresznye *S*-allélt (S_1 , S_4 , S_6 , S_9 , S_{12} , S_{13} , S_{14} - és S_{16}) meggyben is kimutattak (Tsukamoto és mts., 2006; 2008), melyek közül több funkcióvesztéses mutációt szenvedett. Ezenkívül számos meggy allélt (S_{26} , S_{33} - S_{35} , S_{36a} , S_{36b} , S_{36b2} , és S_{36b3}) nem található meg cseresznyében, így feltételezték, hogy azok a cseplezsmeggyből származnak (Tsukamoto és mts., 2008).

Az azonos *S*-genotípusú fajták kölcsönösen inkompatibilisak, közös inkompatibilitási csoportot (CIG) alkotnak. Napjainkban 44 inkompatibilitási csoportot tartunk számon. Tobutt és mts. (2005) 26 inkompatibilitási csoportot írt össze a klasszikus és molekuláris adatok feldolgozásával. A csoportok számát később Schuster és mts. (2007) 36-ra bővítették. Nem sokkal később Marchese és mts. (2007) leírták a XXXVII-XL, majd Gisbert és mts. (2008) a XLI és Ipek és mts. (2011) a XLII-XLIV inkompatibilitási csoportokat. Békefi és mts. (2010) egy évvel korábban szintén publikáltak egy csoportot, melynek a XLII. csoport elnevezést javasolták, így tulajdonképpen 45 csoport ismert. Az egyedi *S*-genotípussal rendelkező fajták univerzális pollenadókként használhatók.

Míg több száz európai és észak-amerikai cseresznye fajta *S*-genotípusa ismert, a géncentrum területére vonatkozó adatok korlátozott mértékben állnak csak rendelkezésre (Ipek és mts., 2011). Vizsgálataink során ezért a törökország területén termesztett régi tájfajták és vadon termő állományokból szelektált egyedek *S*-lókuszának vizsgálatát tűztük ki célul.

2. CÉLKITÚZÉS

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

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

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növényanyag

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

3.2. DNS-alapú vizsgálatok

3.2.1. DNS-kivonás

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

3.2.2. Konszenzus PCR analízis

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

Az *S₁₃-RN-áz* esetében az első illetve második intronrégióon belül megtalálható mikroszatellit régió kimutatását a Marchese és mts. (2010) által kifejlesztett primerpárok segítségével végeztük el.

Az *S-RN-áz* gén harmadik exonjának – a gén C3 és C5 közötti régiójának – amplifikációjához az EM-PC3consRD primer (Sutherland és mts., 2004) reverz komplementer oligonukleotidját használtuk – melyet EM-PC3consFD primernek neveztünk el – az EM-PC5consRD primerrel párosítva.

A PCR-reakciókhoz körülbelül 20-80 ng DNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban. A 10x Dream *Taq* puffer (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) KCl-ot és (NH₄)₂SO₄-ot is tartalmazott a Dream*Taq*TM DNS-polimeráz enzim (Fermentas-Thermo

Scientific, Burlington, Kanada) megfelelő működéséhez szükséges arányban. A PCR-reakcióelegy végső koncentrációja 4,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 μM a megfelelő primerekből és 0,06 U DreamTaq DNS-polimeráz enzim. A PCR-reakciók PTC 200 (MJ Research, Quebec, Kanada) típusú készülékben futottak. A reakciók során alkalmazott programok a primerektől függően eltérőek voltak (Sonneveld és mts., 2003).

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

3.2.3. Allélspecifikus PCR-vizsgálatok

Az allélspecifikus PCR-vizsgálatot minden fajta esetében a rendelkezésre álló összes allélra (*S*₁-*S*₇, *S*₉, *S*₁₀, *S*₁₂-*S*₁₄ és *S*₁₆) nézve elvégeztük, belső kontrollként egy minden genotípusban megtalálható *fenilalanin ammónia-liáz* (PAL) szekvenciát felszaporító primerpárt használtunk. A reakciók Sonneveld és mts. (2001, 2003) alapján futottak. Új allélspecifikus primereket terveztünk az *S*₁₇-*S*₁₉, *S*₂₅, *S*₃₄ és *S*₃₇ allélok kimutatására.

Az allélspecifikus PCR-eket DreamTaq polimeráz enzim (Fermentas) felhasználásával végeztük, a reakció lépései 3 perc 94 °C-os kezdeti denaturációs lépés, ciklusonkénti lépések: 30 másodperc 94 °C denaturáció, 30 másodperc 50-63 °C (a primer olvadáspontjától függő hőmérsékleten), 1,5 perc 72 °C polimerizációs lépés, melyet 35 ciklus után egy 5 perces 72 °C-os végső extenziós lépés követ.

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

Az *S*-RN-áz gének első intronrégiójára irányuló vizsgálatok esetében kapott PCR-fragmentumok pontos méretének meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) elnevezésű automata DNS-szekvenátorral történt.

Az *S*-RN-áz második intronrégiójának PCR-fragmentumait 1,2 %-os TAE agaróz gélből izoláltuk vissza EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Kanada) segítségével, majd klónoztuk pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) illetve pTz-57R/T (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) plazmid vektorokba. A

klónozott fragmentumokat JM109 valamint DH5 α kompetenssé tett *E. coli* baktériumsejtekbe transzformáltuk, melyeket a Z-CompetentTM *E. coli* Transformation Kit (Zymo Research Corp., Irvine, Kalifornia, USA) segítségével preparáltunk.

A plazmidokat EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham Ontario, Kanada) izoláltuk. Szekvenciájuk meghatározása szintén ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) automata DNS-szekvenátorral történt. Minden fragmentum esetében két vagy három klón szekvenálását végeztük el M13 preimerrel, mindkét irányban.

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

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

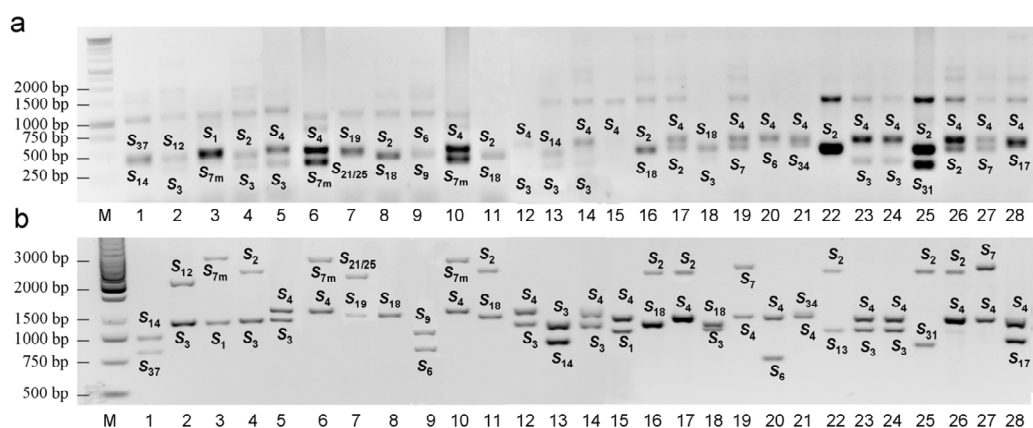
Három genotípus: ‘Artvin-45’, ‘Eryataği Amasya 0849’ and ‘Turfanda Kara’ esetében 376 bp méretű első intron fragmentum, a második intron PCR-analízise során pedig egy kb. 3000 bp méretű fragmentum keletkezett. Mivel méretei alapján egy eddig ismert alléllal sem azonos, feltehetően egy új alléllal állunk szemben.

A gén harmadik exonját amplifikáltuk C3 és C5 közötti régiókban EM-PC3consFD és EM-PC5consRD primerpárok segítségével. Az eddig ismeretlen *S*-RN-áz allél (későbbiek során S_{7m} -ként jelölt) harmadik exonjának ‘Turfanda Kara’ (S_4S_{7m}) esetében transzformált fragmentumát kolónia-PCR-t követően *EcoRV* (Fermentas-Thermo Scientific, Burlington, Kanada) restriktív enzimmal hasítottuk. Kizárólag azokból a kolóniákból izoláltunk plazmid DNS-eket, amelyek nem hasítódtak az S_4 -RN-áz jelenlétére utaló méretnél (81 és 165 bp).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A török cseresznyék *S*-lókuszának variabilitása

A 47 vizsgált török cseresznyéből tizenkét ismert, termesztett cseresznyefajtából leírt *S*-*RN*-áz allélt (S_1 - S_7 , S_9 , S_{10} és S_{12} - S_{14}) mutattunk ki (1. ábra). Összesen 26 különböző *S*-genotípust határoztunk meg a 47 törökországi cseresznye vizsgálatával. Tekintettel arra, hogy az S_8 , S_{15} és S_{11} -alléljelöléseket használaton kívül helyezték, mert azok az S_3 , S_5 és S_7 -alléloknak felelnek meg (szinonim elnevezések), a Sonneveld és mts. (2001; 2003) által termesztett cseresznyefajtákból azonosított, összesen 13 *S*-*RN*-áz (S_1 - S_7 , S_9 - S_{10} , S_{12} - S_{14} és S_{16}) allél közül csak az S_{16} -os allélt nem mutattuk ki. Az S_{16} -os allél a szicíliai fajtákban fordult elő a legnagyobb relatív gyakorisággal (Marchese és mts., 2007). A török cseresznyékben a leggyakrabban előforduló allélok az S_3 - és S_4 -allélok voltak.



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

A vadcsesznyékből azonosított allélok közül néhányat, pl. S_{17} - S_{19} (De Cuyper és mts., 2005), $S_{21/25}$ (Wünsch és Hormaza, 2004) és S_{31} (Vaughan és mts., 2008) szintén kimutattunk. Az S_{18} -allél jelenlétét termesztett cseresznyében azonban első ízben sikerült igazolnunk. Ezenkívül olyan allélokat is sikerült kimutatnunk, melyeket korábban sem vadcsesznyében,

sem termesztett cseresznyében nem azonosítottak (S_{34} , illetve általunk S_{37} -nek és S_{7m} -nek elnevezett allélok). Azonosítottunk egy cseresznyében eddig ismeretlen, új *S-RN-áz* allélt (S_{37}) és egy új inkompatibilitási csoportot (XLV. csoport, S_2S_{18}).

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

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

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

Ipek és mts. (2011) a 'Kara Gevrek' fajta esetében egy triploid *S*-genotípust javasoltak ($S_3S_5S_6$), eredményeink azonban csak két allél (S_3S_5) jelenlétét igazolták; harmadik fragmentum nem amplifikálódott egyik konszenzus primerpárral sem, illetve az S_6 -allélspecifikus primer is negatív eredményt adott. A triploid genotípust a szerzők elképzelhetőnek tartották, és a belga vadcsesznye populációkban leírt hasonló jelenséggel (De Cuyper és mts., 2005) támasztották alá eredményüket. A ploidia szintet azonban sem mikroszatellit analízissel, sem flow citométerrel nem erősítették meg, szemben De Cuyper és mts. (2005) vizsgálatával, ahol mindkét analízist elvégezték. Az általunk megállapított diploid

genotípus valószínűbb egy tájfajta esetében, melynek szelekciója során a termésbiztonság és a hozam nyilvánvalóan fontos szempontok voltak.

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

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

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

nukleotidos eltérést mutatott, a belga vadcserezsnye S_{21} -allélja (De Cuyper és mts., 2005) ezektől jelentős mértékben különbözött: számos mutáció (indel és SNP) mutatkozott a második intron jelentős szakaszán. Tekintettel arra, hogy az $S_{21/25}$ -allélspecifikus primert is olyan intronrégió alapján terveztük, mely a belga és német allél esetében nagyon eltérő (számos SNP és egy négy nukleotidos indel is található ezen a szakaszon), az általunk tervezett primer feltehetően csak az S_{25} -allélt és a német S_{21} -allélt mutatja ki, a belga S_{21} -allél kimutatására azonban nem lesz használható. Ehhez új primer tervezése javasolható.

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

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

4.3. Az S - RN -áz allélok evolúciós kapcsolatai

A transz-specifikus evolúció jelenségét (két különböző faj bizonyos S -alléljainak szekvenciája nagyobb mértékben hasonlíthat egymáshoz, mint amennyire egy faj két különböző funkciójú S -allélja) a *Solanaceae* családban és a *Maloideae* és *Prunoideae*

alcsaládokban egyaránt kimutatták (Ioerger és mts., 1990; Sassa és mts., 1996; Sutherland és mts., 2008). Vizsgálataink során két transz-specifikus *S-RN-áz* allélt azonosítottunk.

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

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

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

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

Az *S-RN-áz* allélok jelentősebb evolúciós megváltozása leginkább az S_{7m} -allél esetében volt megfigyelhető. A konszenzus PCR vizsgálatok illetve az első intron DNS-szekvenciája új *S-RN-áz* allélnak mutatták. A C3 és C5 régiók közötti exonszakasza azonban megegyezett az S_7 -allél szekvenciájával. A második intron feltehetően szintén jelentős mértékben különbözik az *S₇-RN-áz* második intronjától, mivel az S_{7m} -allél második intronrégiójának mérete közel 3 kb, szemben az S_7 -alléllal jellemző 2385 bp mérettel (Sonneveld és mts., 2003). Ráadásul az S_7 -allélspecifikus primer is negatív eredményt adott. Jóllehet az *S-RN-áz* gén C1 és C2 régiói között számos aminosavcsere okozó, nem szinonim mutációt azonosítottunk, mindezidáig nincs kísérletes eredmény arra vonatkozóan, hogy ez a régió szerepet játszik az allélspecificitás kialakításában. A *Pyrus pyrifolia S₃-RN-áz* enzim négy régiójában (PS1-PS4) mutatták ki a pozitív szelekció hatását (Ishimizu és mts., 1998), melyek egyike sem felel meg a C1 és C2 régiók közti szakasznak. A pozitív szelekció a fehérjekódoló gének azon szakaszán jelentkezik, ahol a nem szinonim mutációk száma meghaladja a szinonim mutációk számát, vagyis ahol a fehérje aminosav-sorrendjének változása feltehetően evolúciós, adaptív előnyt jelent az élőlény számára. Az S_{7m} -allél a későbbiekben ahhoz is felhasználható lehet, hogy jellemezni tudjuk a *Prunus S-RN-áz* gén C1-C2 régiójának hozzájárulását az allélspecificitás kialakításához.

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

Törökország fekete-tenger-melléki partvidékét csapadékos éghajlat jellemzi. A keleti régió éves csapadékmennyisége átlagosan 2200 mm (Sensoy, 2003). Török kutatók és cseresznyenemesítők 2003-ban expedíciót szerveztek a területre, hogy a gyümölcsrepedéssel szemben ellenálló genotípusokat találjanak. Munkájuk során mintegy negyven vadcsereznye egyed szaporítottak le, és helyeztek ültetvénybe további vizsgálatok céljával. Ezek közül emelték ki a Coll. sorozattal jelölt klónokat, melyeket nemesítési alapanyagként a leginkább perspektivikusnak tartottak.

Tekintettel arra, hogy a klónokat vadcsereznye állományokból szelektálták, nem meglepő, hogy számos olyan allélt (S_{17} , S_{18} és S_{31}) hordoztak, melyet korábban elsősorban

vadcseresznyéből mutattak ki (De Cuyper és mts., 2005; Vaughan és mts., 2008). Ugyanakkor vadcsesznye allélokot (S_{18} , S_{19} és $S_{21/25}$) a török tájfajtákban is kimutattunk. Az S_{18} -allél jelenlétét első ízben igazoltuk termesztett cseresznyében ('Tezce 0912' és 'Yakacık'), ami sok egyéb tényező között önmagában is arra utal, hogy a török cseresznyét sokkal szélesebb genetikai háttér jellemzi, mint a fő árufajtákat.

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

A meggyből azonosított S_{34} -*RN-áz* (Tsukamoto és mts., 2008) és a cseresznye S_{34} -*RN-áz* allél között számos SNP-t mutattunk ki, melyek zöme szelekciós szempontból semleges hatású. Érdekes megfigyelni, hogy a meggy és cseresznye allél között sokkal nagyobb mértékű szekvencia-eltérés volt kimutatható, mint akár a *Cerasus* és *Prunophora* alnemzetségekbe tartozó egyedek által hordozott S_{31} transzspecifikus testvérallélok között, amelyek független evolúciós múltja bizonyosan hosszabb időt ölel fel. Mindez összefügg a meggy tetraploid genomjával.

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

Az általunk vizsgált minták közül mindössze a Coll. 43 hordozta az S_{13} -allélt. Az első intronrégió SSR mérete 251 bp, a második intronban található SSR mérete 310 bp. Ezeket a

méretváltozatokat Marchese és mts. (2010) kizárólag meggyben mutatták ki. Ez az eredmény újabb bizonyítékot ad arra, hogy a cseresznye és a meggy allélkészlete átfedő a fekete-tenger-melléki régióban, és a fajok elkülönítésére javasolt, az S_{13} - RN -áz SSR polimorfizmusán alapuló rendszer félrevezető lehet, ha a géncentrumhoz közeli területeken használjuk.

Az első intronrégió 251 bp-os SSR variánsát mindössze két meggyfajta hordozta, ezek egyike volt a 'Favorit' magyar fajta (Marchese és mts., 2010). A fajta pedigében ('Pándy' × 'Montreuilli') szereplő 'Pándy' meggy eredetével kapcsolatosan számos hipotézis született, ezek egyike szerint a fajta őst egy török katona hozta Magyarországra a török hódoltság idején (Faust és Surányi, 1997). A törökországi eredet magyarázatot adhat a rendkívül ritka SSR változat együttes jelenlétére egy magyar meggyfajtában és egy török vadcsereznyében, ugyanakkor ennek igazolása további vizsgálatot igényel.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Bailey, L.H. (1927): The standard cyclopedia of horticulture. Macmillan, London.
2. Békefi, Z., Vaughan, S., Tobutt, K. (2010): Determination of incompatibility (*S*) genotypes of sweet cherries in the Hungarian gene-bank by a PCR-based method. *Acta Agron. Hung.*, 58: 377–384.
3. Békefi, Zs., Tobutt, K.R., Sonneveld, T. (2003): Determination of (in)compatibility genotypes of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions by PCR based methods. *Int. J. Hort. Sci.*, 9: 37–42.
4. Bošković, R., Tobutt, K.R. (2001): Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stilar ribonucleases. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 475–485.
5. Bošković, R., Russell, K., Tobutt, K.R. (1997): Inheritance of stilar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphytica*, 95: 221–228.
6. 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.
7. De Candolle, A. (1894): *Termesztett növényeink eredete*. K.M. Természettudományi Társulat, Budapest.
8. De Cuyper, B., Sonneveld, T., Tobutt, K.R. (2005): Determining selfincompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol. Ecol.*, 14: 945–955.
9. de Nettancourt, D. (2001): *Incompatibility in angiosperms*. Springer-Verlag, New York.
10. 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.
11. Ercisli, S. (2004): A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genet. Res. Crop Evol.*, 51: 419–435.
12. Faust, M., Surányi, D. (1997): Origin and dissemination of cherry. *Hort. Rev.*, 19: 263–317.
13. Gisbert, A.D., Badenes, M.L., Tobutt, K.R., Llacer, G., Romero, C. (2008): Determination of the *S*-allele composition of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in the southeast of Spain by PCR analysis. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 83: 246–252.
14. Halász, J. (2007): *A kajszi önmeddőségét meghatározó S-allél-rendszer molekuláris háttere*. Doktori Értekezés, BCE KTK, Budapest (Kézirat).
15. Halász, J., Fodor, Á., Hegedűs, A., Pedryc, A. (2008): Identification of a new self-incompatibility allele (*S*₃₁) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Sci. Hortic.-Amsterdam*, 116: 448–451.
16. Halász, J., Pedryc, A., Ercisli, S., Yilmaz, K.U., Hegedus, A. (2010): *S*-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 135: 410–417.
17. Iezzoni, A.F., Hancock, A.M. (1996): Chloroplast DNA variation in sour cherry. *Acta Hort.*, 410: 115–120.
18. Ioerger, T.R., Clark, A.G., Kao, T.H. (1990): Polymorphism at the selfincompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9732–9735.
19. Ipek, A., Gulen, H., Akcay, M.E., Ipek, M., Ergin, S., Eris, A. (2011): Determination of self-incompatibility groups of sweet cherry genotypes from Turkey. *Gen. Mol. Res.*, 10: 253–260.
20. Ishimizu, T., Endo, T., Yamaguchi-Kabata, Y., Nakamura, K.T., Sakiyama, F., Norioka, S. (1998): 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.
21. Kato, S., Iwata, H., Tsumura, Y., Mukai, Y. (2007): Distribution of *S*-alleles in island populations of flowering cherry, *Prunus lannesiana* var. *speciosa*. *Genes Genet. Syst.*, 82: 65–75.
22. 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.

23. Marchese, A., Bošković, R., Caruso, T., Tobutt, K. (2010): Intra-allelic variation in introns of the *S₁₃-RNase* allele distinguishes sweet, wild and sour cherries. *Tree Genet. Genomes*, 6: 963–972.
24. Marchese, A., Tobutt, K.R., Raimondo, A., Motisi, A., Bošković, R.I., Clarke, J., Caruso, T. (2007): Morphological characteristics, microsatellite fingerprinting and determination of incompatibility genotypes of Sicilian sweet cherry cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 82: 41–48.
25. 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.
26. 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.
27. Rehder, A. (1958): *Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America*. Macmillan, New York.
28. 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 T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.*, 250: 547–557.
29. Schueler, S., Tusch, A., Scholz, F. (2006): Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Mol. Ecol.*, 15: 3231–3243.
30. Schuster, M., Flachowsky, H., Köhler, D. (2007): Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions and cultivars of the German Fruit Gene Bank and from private collections. *Plant Breeding*, 126: 533–540.
31. Sensory, S. (2003): *Climate of Turkey*. Turkish State Meteorological Service. <http://213.139.210.130/2003eng/general/climate/climateofturkey.htm>.
32. 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.
33. 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.
34. Sutherland, B.G., Robbins, T.P., Tobutt, K.R. (2004): Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. *Plant Breeding*, 123: 582–584.
35. Sutherland, B.G., Tobutt, K.R., Robbins, T.P. (2008): Trans-specific *S-RNase* and *SFB* alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Mol. Genet. Genomics*, 279: 95–106.
36. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.
37. Tavaud, M., Zanetto, A., David, J.L., Laigret, F., Dirlewanger, E. (2004): Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus x gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity*, 93: 631–638.
38. Tobutt, K.R., Sonneveld, T., Bekefi, Z., Bošković, R. (2005): Cherry (in)compatibility genotypes - an updated cultivar table. *Acta Hort.*, 663:667–671.
39. Tsukamoto, T., Hauck, N., Tao, R., Jiang, N., Iezzoni, A. (2006): Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Mol. Biol.*, 62: 371–383.
40. Tsukamoto, T., Potter, D., Tao, R., Vieira, C.P., Vieira, J., Iezzoni, A.F. (2008): Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *J. Exp. Bot.*, 59: 3169–3185.
41. 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.

42. 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.
43. Vaughan, S., Bošković, R., Gisbert-Climent, A., Russell, K., Tobutt, K. (2008): Characterisation of novel *S*-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genet. Genomes*, 4: 531–541.
44. Wunsch, A., Hormaza, .JI. (2004): Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 108: 299–305.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ FŐBB PUBLIKÁCIÓK

Impaktfaktoros folyóiratcikk:

Szikriszt B., Dogan A., Akcay M.E., Ercisli S., Hegedűs A., Halász J. (2012): Molecular typing of the self-incompatibility locus of Turkish sweet cherry genotypes reflects phylogenetic relationships among cherries and other *Prunus* species. *Tree Genet. Genomes* (11 July 2012), pp. 1-11, ISSN 1614-2942, DOI:10.1007/s11295-012-0543-2. **IF 2,335**

Lektorált folyóiratban megjelent cikkek:

Szikriszt B., Papp, N., Taller, D., Halász, J., Nyéki, J., Szabó, Z., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2011): Preliminary evaluation of breeding perspectives of Ukrainian sweet cherry cultivars: nutraceutical properties and self-incompatibility. *International Journal of Horticultural Science*, 17: 7–11.

Szikriszt B., Hegedűs, A., Halász, J. (2011): Review of genetic diversity studies in almond (*Prunus dulcis*). *Acta Agron. Hung.*, 59(4): 379–395. DOI: 10.1556/AAgr.59.2011.4.9

Szikriszt B., Hegedűs A., Halász J. (2011): A mandula (*Prunus dulcis*) genetikai sokféleségének összefoglaló áttekintése. *Kertgazdaság*, 43.(4): 77-87.

Pfeiffer, P., Szikriszt B., Hegedűs, A. (2012): Valós idejű PCR alkalmazása a növénybiológiai kutatásokban. *Kertgazdaság*, (in press)

Szikriszt B., Ercisli, S., Hegedűs, A., Halász, J. (2012): Self-incompatibility alleles in Eastern European and Asian almond (*Prunus dulcis*) genotypes: a preliminary study. *International Journal of Horticultural Science*, 18(2): 23-26.

Konferencia-kiadványok (Abstract):

Szikriszt B., Hegedűs A., Halász J. (2011): Ukrán cseresznyefajták *S*-genotípusának DNS-alapú vizsgálata. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2011. április 27., Összefoglalók (Szerk.: Óvári, J.), BCE, KeTK, Budapest, p. 99. ISBN 978-963-08-1235-1.

Szikriszt B., Dogan A., Ercisli S., Hegedűs A., Halász J. (2011): Török cseresznyefajták *S*-genotípusának molekuláris jellemzése. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2011. április 27., Összefoglalók (Szerk.: Óvári, J.), BCE, KeTK, Budapest, p. 95. ISBN 978-963-08-1235-1.

Halász, J., Szikriszt B., Ercisli, S., Yilmaz, K.U., Dogan, A., Szabó, Z., Nyéki, J., Pedryc, A., Hegedűs, A. (2011): *S*-locus genotyping on stone fruits. Flower biology and *S*-incompatibility in fruit species, 22–25 June 2011, San Michele all'Adige (Trento) and Bologna, Italy. Abstract book, 2 pages.

Szikriszt B., Dogan A., Akcay M. E., Ercisli S., Hegedűs A., Halász J. (2012): Az *S*-lókus variabilitása a géncentrumban: török cseresznye genotípusok termékenyülési kapcsolatának molekuláris jellemzése. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2012. március 6., Összefoglalók (Szerk.: Veisz, O.), Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, p. 52. ISBN: 978-963-8351-38-8.

Halász J., Szikriszt B., Ercizli S., Pedryc A., Hegedűs A. (2012): Az *S*-lókuszt variabilitásának jellemzése egy vadon élő török kajszipopulációban. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2012. március 6., Összefoglalók (Szerk.: Veisz, O.), Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, p. 86. ISBN: 978-963-8351-38-8.

J. Halász; B. Szikriszt, S. Ercisli, Z. Szabó, J. Nyéki, M. Tóth, A. Pedryc, A. Hegedűs (2012): The self-incompatibility locus provides insight into the evolution of cultivated fruit trees, 15–18 April 2012, 2nd Global Congress on Plant Reproductive Biology (PRB-2012), Pécs, Hungary. Abstracts, p. 34.

A. Hegedűs, B. Szikriszt, A. Dogan, E. M Akcay, S. Ercisli, J. Halász (2012): self-incompatibility analysis of turkish *Prunus avium* germplasm: information from the centre of origin of cherries, 15–18 April 2012, 2nd Global Congress on Plant Reproductive Biology (PRB-2012), Pécs, Hungary. Abstracts, p. 35.

B. Szikriszt, S. Ercisli, A. Hegedűs, J. Halász (2012): The latest achievements in almond (*Prunus dulcis*) self-incompatibility studies, 15–18 April 2012, 2nd Global Congress on Plant Reproductive Biology (PRB-2012), Pécs, Hungary. Abstracts, p. 66.

J. Halász, B. Szikriszt, S. Ercizli, Z. Szabó, J. Nyéki, M. Tóth, A. Pedryc, A. Hegedűs (2012): Recent progress in fruit tree self-incompatibility studies, 4–6 June 2012, Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Advances in plant breeding and plant biotechnology in Central Europe, Debrecen, Hungary. Book of Abstracts and programme: p. 16.

B. Szikriszt, S. Ercizli, A. Pedryc, A. Hegedűs, J. Halász (2012): Self-incompatibility RNase alleles in a wild-growing Turkish apricot population, 4–6 June 2012, Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Advances in plant breeding and plant biotechnology in Central Europe, Debrecen, Hungary. Book of Abstracts and programme: p. 60.

B. Szikriszt, S. Ercizli, A. Hegedűs, J. Halász (2012): Variations in almond (*Prunus dulcis*) self-incompatibility alleles: from Eastern Europe to Western Asia. 1–5 July 2012, 2nd Symposium on Horticulture in Europe, Angers, France. Book of abstracts: p. 235.

TDK-dolgozat vezetése:

TDK-dolgozat: Tallér Dénes (Mezőgazdasági Biotechnológus MSc. I. évf.): Ukrán cseresznyefajták funkcionális nemesítési programbeli felhasználhatóságának értékelése. 2011. BCE Genetika és Növénynevelési Tanszék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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