

**Akadémiai Doktori Értekezés**

**KAJSZIFAJTÁK GENETIKAI JELLEMZÉSE  
MIKROSZATELLIT ÉS S-LÓKUSZ POLIMORFIZMUS  
ALAPJÁN**

**Pedryc Andrzej**

**BCE Genetika és Növénynevelés Tanszék**



BUDAPESTI  
**CORVINUS**  
EGYETEM  
Kertészettudományi Kar

**Budapest, 2008**

# TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés .....	7
2	Irodalmi áttekintés .....	8
2.1	Kajszi fajták csoportosítása .....	8
2.2	A kajszi termékenyülése .....	11
2.2.1	A <i>Prunus</i> fajok önmeddőségét meghatározó molekuláris rendszer .....	13
2.2.2	Az <i>S</i> -RN-áz alapú inkompatibilitási rendszer működésének molekuláris modellje 17	
2.2.3	A gyümölcsfák öntermékenyülési képességének molekuláris háttere .....	18
2.2.4	DNS-alapú <i>S</i> -genotípus-vizsgálatok.....	19
2.2.5	A japánkajszi <i>S</i> -allél-rendszere .....	20
2.2.6	Az európai kajszi <i>S</i> -allél-rendszere .....	21
2.3	A molekuláris markerezés technikái.....	23
2.3.1	Bevezetés.....	23
2.4	A molekuláris markerek általános jellemzői .....	24
2.5	Az izoenzimek általános jellemzése .....	26
2.5.1	Az izoenzimek alkalmazása a csonthéjas gyümölcsfajok kutatásában .....	27
2.5.1.1	Izenzimek a kajszi barack kutatásában .....	29
2.6	Az RFLP módszer általános jellemzése .....	30
2.7	RFLP alkalmazása <i>Prunus</i> fajoknál.....	30
2.7.1	RFLP módszer alkalmazása a kajszi barack kutatásban .....	31
2.8	RAPD-polimorfizmus kimutatása .....	32
2.8.1	A RAPD-polimorfizmus kimutatása a csonthéjas gyümölcsfajoknál .....	33
2.8.1.1	Kajszi barack elemzése RAPD-technikával .....	34
2.9	Az AFLP-technika általános jellemzése .....	35
2.9.1	Az AFLP alkalmazása <i>Prunus</i> fajoknál .....	35
2.9.1.1	Őszibarack .....	35

2.9.1.2	Cseresznye és meggy .....	36
2.9.1.3	Szilva .....	37
2.9.1.4	Mandula .....	38
2.9.1.5	Kajszi .....	38
2.10	Mikroszatellit (SSR) markerek .....	39
2.10.1	Mikroszatellitek a növényi genomokban .....	44
2.10.2	A mikroszatellitek evolúciója .....	46
2.10.3	A mikroszatellit polimorfizmus kutatása <i>Prunus</i> fajoknál .....	48
2.10.3.1	Primerfejlesztés .....	48
2.10.4	Mikroszatellitek alkalmazása a <i>Prunus</i> nemzetségben .....	50
2.10.4.1	Őszibarack .....	50
2.10.4.2	Cseresznye, meggy .....	50
2.10.4.3	Mandula .....	51
2.10.4.4	Szilva .....	51
2.10.4.5	Alanyok .....	51
2.10.4.6	Kajszi .....	52
3	A kutatás közvetlen előzményei .....	56
3.1	A kutatási munka a következő tudományos célok köré szerveződött: .....	58
4	Anyag és módszer .....	59
4.1	Növényanyag .....	59
4.2	Szabadföldi tesztkereszteзések .....	59
4.2.1	Szabadföldi öntermékenyülés-vizsgálat .....	59
4.2.2	Szabadföldi kompatibilitási vizsgálat .....	65
4.3	Az S-ribonukleáz izoenzimek vizsgálata .....	65
4.3.1	Minta-előkészítés az izoelektromos fókuszáláshoz .....	65
4.3.2	Izoelektromos fókuszálás (IEF) és nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálás (NEpHGE) .....	66

4.3.3	<i>S</i> -ribonukleáz izoenzimek kimutatása specifikus festéssel .....	66
4.4	DNS-alapú vizsgálatok .....	67
4.4.1	DNS-kivonás .....	67
4.4.2	SSR-analízis .....	67
4.4.3	Statisztikai analízis .....	67
4.4.4	<i>S</i> -PCR-analízis .....	69
4.4.4.1	Az <i>S</i> -RN-áz gén PCR-vizsgálata .....	69
4.4.4.2	Az F-box gén PCR-vizsgálata .....	69
4.4.4.3	A PCR-termékek fragmentumhossz-analízise, klónozása, szekvenálása és a szekvenciák vizsgálata .....	70
5	Eredmények .....	71
5.1	<i>S</i> -genotípus meghatározása ribonukleáz izoenzimek kimutatásával .....	71
5.2	<i>S</i> -RN-áz gén alapú, DNS-szintű genotípus-meghatározás .....	75
5.3	Az öntermékenyülés molekuláris háttere.....	81
5.4	F-box gén alapú <i>S</i> -genotípus-meghatározás .....	82
5.5	Az őszibarackra tervezett SSR-primerkészlet alkalmazásának vizsgálata kajszi mikroszatellit régiók variabilitásának kimutatására (1. kísérlet).....	88
5.5.1	Klaszteranalízis .....	90
5.6	Az őszibarack és kajszi genomokra tervezett SSR-primerek által amplifikált mikroszatellit markerek variabilitásának elemzése egy nagy diverzitású és genotípuszámú kajszi fajta csoporton (2. kísérlet).....	93
5.6.1	Mikroszatellitek diverzitása .....	93
5.6.2	A fajták közötti genetikai viszonyok vizsgálata.....	94
5.6.3	Az ökoföldrajzi csoportok közötti genetikai kapcsolat .....	97
5.7	SPECIFIKUS KAJSZI SSR-MARKEREK ALKALMAZÁSA A FAJ KULTÚR-EVOLUCIÓJÁNAK TANULMÁNYOZÁSÁRA (3. kísérlet).....	99
6	Eredmények megvitatása .....	105
6.1	<i>S</i> -genotípus meghatározása izoelektromos fókuszálással.....	105

6.2	<i>S</i> -RN-áz gén alapú, DNS-szintű genotípus-meghatározás .....	108
6.3	Az öntermékenyülés molekuláris háttere.....	112
6.4	Az F-box gén alapú <i>S</i> -genotípus-meghatározás .....	114
6.5	Primerek tesztelése a polimorfizmus kimutatás hatékonysága tekintetében.....	117
6.6	A polimorfizmus populációgenetikai jellemzői.....	119
6.7	A fajták egyedi azonosítása .....	121
6.8	A vizsgált fajták és fajok genetikai kapcsolatainak elemzése klaszteranalízissel ...	121
6.8.1	1. kísérlet.....	121
6.8.2	2. kísérlet.....	122
6.8.3	A <i>Prunus armeniaca</i> termesztett fajtáinak, plumcot és néhány rokon faj genetikai kapcsolatának elemzése klaszteranalízissel.....	125
6.9	Az öko-földrajzi csoportok közötti genetikai viszony.....	125
6.10	Milyen információkat adhatnak a molekuláris vizsgálatok (SSR és <i>S</i> -genotípus) a kajszi kultúrevolúciójáról?.....	128
7	Új tudományos eredmények.....	137
8	Felhasznált irodalom.....	139

### Az értekezésben használt rövidítések

AFLP	amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus
bp	bázispár
C1–3 és C5	Az <i>S</i> -RN-áz gén 1–3. és 5. konzervatív régiója
cDNS	komplementer DNS
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
RAPD	véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS
RC4	A <i>Rosaceae</i> <i>S</i> -RN-ázokra jellemző 4. konzervatív régió
RFLP	restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
RHV	A <i>Rosaceae</i> <i>S</i> -RN-ázokra jellemző hipervariábilis régió
RNS	ribonukleinsav
SCAR	szekvencia szinten jellemzett marker
SFB	<i>S</i> -haplotípus-specifikus F-box protein
SP	szignálpeptid
<i>S</i> -RN-áz	<i>S</i> -ribonukleáz
SSR	mikroszatellit régió

# 1 BEVEZETÉS

Magyarország az európai kajszibarack-termesztés őshazájának tekintő. Innen származtatják Európa legértékesebb fajtakörei közül a Magyar kajszit és a Rózsa barackot. Feltételezhetően a Kárpát-medence az egyik közbülső állomása volt a kajszit Közép-Ázsiától Nyugat-Európa felé vezető terjeszkedési útvonalának. Magyarország egyes területein évtizedeken keresztül ez a gyümölcs biztosította sok falun és tanyán élő család megélhetését. A magyar kajszit gyümölcsminőségének, változatos felhasználhatóságának köszönhetően jellegzetes helyet foglal nem csak a magyar agrárszférán belül, hanem kihagyhatatlan része a magyar kulináris hagyományoknak is.

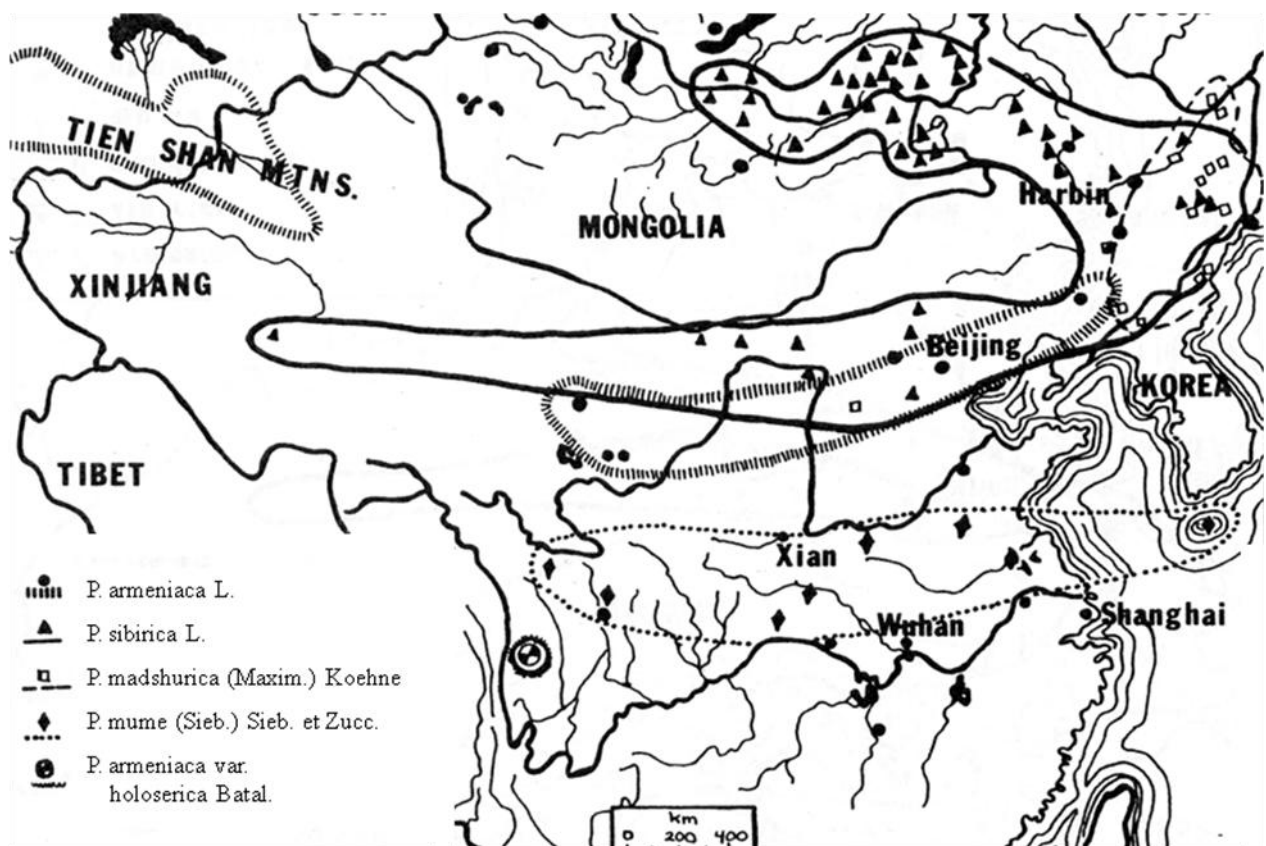
A termelés volumenét tekintve az utóbbi három évtizedben jelentős fluktuációk mellett Magyarország a világ első 15 legnagyobb termelő országa között foglalt helyet. A magyar termeszítők rendelkezésére álló fajták választéka viszont csak lassan bővül. Az utóbbi években a hazai fajtabejelentések száma drasztikusan csökkent, miközben az új sarkavírus rezisztens és a kereskedelmi céloknak megfelelő fajták megjelenésével egy időben a világon jelenleg jelentős mértékű fajtaváltás zajlik. Három államilag elismert fajtaival és három új bejelentett fajtajelölttel a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszék hosszú évek óta az egyik legfontosabb hazai kajszifajta-előállító nemesítési műhelynek tekinthető.

A gyümölcsnemesítés intenzitásának és hatékonyságának növelése ma már nem nélkülözheti az adott faj genetikájára vonatkozó kutatásokat. A növénynevelésben a markerek kutatása mindig szervesen kapcsolódott magához a nemesítési tevékenységhez. Kezdetben morfológiai megfigyelések, később pedig számos molekuláris szintű technikával kimutatott fehérje- és DNS-marker segítette a genotípusok elemzését. A viszonylag egyszerűen és egyértelműen azonosítható, változatos allélösszetételű, ismert szabályok szerint öröklődő markerlókusok segítségével megvalósítható a fajtákban rejlő genetikai polimorfizmus kutatása, a fajták eredetének és rokonsági kapcsolatainak vizsgálata, fajták azonosítása. A markerzési technikákban rejlő lehetőségek célszerű kiaknázásával ezek az eljárások minden bizonnyal fontos kiegészítő eszközzé válnak a gyümölcsfajok nemesítésében a keresztezések tervezésénél és a hibridek szelekciójánál.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Kajszifajták csoportosítása

A kajszi a *Rosaceae* család, *Prunoideae* alcsalád *Prunus* L. nemzetségébe tartozik. A legtöbb termesztett kajszifajtát a *Prunus armeniaca* L. faj adja. Vavilov (1926; 1951) a kajszi 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).



1. ábra. A termesztett kajszibarack és rokonfajok elsődleges géncentruma (Vavilov, 1926;1951).

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-

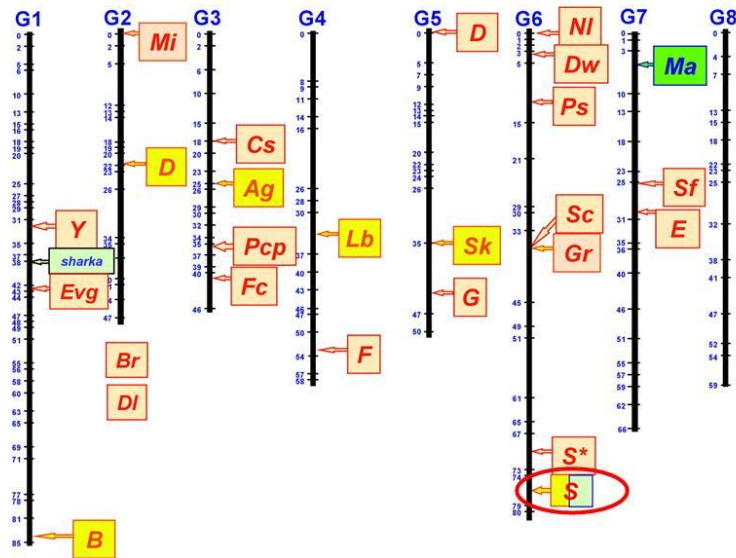


India területeiről származó közép-ázsiai csoport a legöregebb és leginkább formagazdag. Örményország, Grúzia, Azerbajdzsán, Dagesztán, Irán, Irak, Szíria, Törökország és Észak-Afrika fajtái a kaukázusi csoport nagyobb gyümölcsű, kisebb hidegigényű fajtakörébe tartoznak. A dzsungáriai-altaji csoportba a dzsarszkenti, a taldikurgáni, a kazahsztáni és xinjiangi kis gyümölcsű helyi fajták 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.

1. táblázat. A kajszibarack öko földrajzi csoportjai (Mehlenbacher és mts., 1991).

Csoport	Alcsoport	Fajták	
1. Dzsungár - Zaili	Dzsungári	helyi fajták	
	Zailij	helyi fajták	
2. Közép - ázsiai	Fergani	Boban, Kecs-psar, Khurmai, Kandak, Suphani, Isfarak, Mirsandshali	
	Zerevsani	Badami, Ahrori, Arzami, Sadifak, Iska- dari, Tuliaki, Khosravshai	
	Szamarkandi,	Kok - psar, Szamarkandszkij szamji rannij	
	Sahrisyabzi,		
	Horezmi,	Kizil-nukul, Ak-nukul, Kizil-Palvan;	
	Kopet - dagi	Ashkhabad	
	3. Irano - kaukázusi	Iráni - kaukázusi,	Salah, Spitak, Malayer, Damavand, Hacihalioglu
		Dagesztáni	Hekobrash, Honobah
	Észak - afrikai	Hamidi, Bedri, Baour, Amor Leuch, Laribi	
4. Európai	Nyugat - európai	Canino, Rouge du Rousillon, Montedoro, Veecot, Royal, Moniqui	
	Kelet - európai	Magyar kajszai	
	Észak - európai	Zserdeli magoncok	
5. Észak - kínai		<i>P. armeniaca</i>	
6. Tibeti		<i>P. armeniaca var. holosericea</i>	
7. Észak - kelet kínai		<i>P. armeniaca</i> , <i>P. sibirica</i> , <i>P. mandshurica</i>	
8. Kelet kínai		<i>P. armeniaca var. ansu</i>	

A diploid *Prunus* fajok ( $2n=16$ ) genetikai térképezése során eddig 28, a természetesi értékek szempontjából jelentősnek tartott gén pozícióját határozták meg őszibarack [*Prunus persica* (L.) Batsch], kajszsi (*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 kajszsi 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: kajszsi, 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 héjke-ménység; *DI* teltvirágúság; *Dw* törpenövés; *E* levélmirigy alakja; *Evg* folytonnövekvő habitus; *F* maghozkötöttség; *Fc* virágszín; *G* a gyümölcshéj szőrözöttsége; *Gr* levélszín; *Lb* virágzási idő; *Mi* és *Ma* nematódarezisztencia; *NI* levélalak; *Pcp* több termőlevelűség; *Ps* hímsterilitás; *S\** gyümölcshalak; *Sc* gyümölcshéj színe; *Sf* lisztharmat-rezisztencia; *sharka* plum pox vírusrezisztencia; *Sk* keserű mag; *Y* gyümölcshús színe, (Dirlewanger és mts., 2004)

## 2.2 A kajszii termékenyülése

Magyarországon a kajszit hagyományosan öntermékenyülőnek ismerik. Mahácsy (Mohácsy) Mátyás 1922-ben megjelent könyvében még nemhogy a kajszii, de más gyümölcs-fajok (pl. cseresznye, mandula) kapcsán sem esik szó önmeddőségről. Mindössze annyi megjegyzést tesz a szerző, hogy a terméketlenségnek oka lehet a virágporszemcsék „tökéletlensége”, amit az amerikai gyümölcsstermesztők nem hagynak figyelmen kívül, és több fajtát keverve ültetnek, mert így megbízhatóbb a kötődés. Az első magyar közlemény a magyar kajszii fajták öntermékenyülését állapítja meg (Horn, 1939). Szóts Sándor (1941) Kajszibarack termesztés című szakmunkájában a fajtaleírásakor mindössze egy rövid bekezdést szentel a fajták termékenyülésének, melyben megállapítja, hogy a Magyarországon „termesztett fajták kivétel nélkül öntermékenyek és így nem szorulnak idegen fajták által történő megtermékenyítésre a jó terméskötés végett”. Megjegyzi azonban, hogy egyes vizsgálatok szerint a ‘Holub cukor’ és az ‘Ananász kajszii’ idegen beporzásra szorul. Ez utóbbi fajtát Maliga (1966) is önmeddőként határozta meg. Később az 1971 óta előzetes fajta-elismerésben részesített ‘Szegedi mammut’-ról is kiderült, hogy önmeddő (Brózik és Nyéki, 1975), amit néhány év elteltével az Óriás fajtacsoport többi tagjáról is igazoltak (Nyujtó és mts., 1985; Szabó és Nyéki, 1991).

A magyar fajtákhoz hasonlóan az európai földrajzi csoportba tartozó többi fajta, így például a spanyol, francia, olasz fajták túlnyomó többsége is öntermékenyülő. 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. Más vizsgálatok (Kosztina, 1970) alapján az európai csoport fajtáinak 88 %-a, a közép-ázsiai fajtáknak viszont csak 18 %-a, míg az iráni-kaukázusi csoportnak mindössze 6 %-a volt öntermékenyülő.

A piac igényeinek megfelelő fajták előállítására feltétlenül megköveteli a keresztezésekbe 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 New Jersey nemesítési programból származó ‘Jerseycot’ fajta egy francia és a közép-ázsiai ‘Zard’ fajta későn virágzó hibridje (Mehlenbacher és mts., 1987), de számos új szlovák fajta pedig pedigréjében is helyet kapott (Benediková és mts., 2004). Az öntermékenyülő magyar kajszii és a ‘Zard’ hibridjei között több önmeddő genotípus azonosítottak. Ezen nemesítési programok hatására Eu-

rópában is egyre több, széles körben elterjedt, önmeddő fajtát hoztak forgalomba az utóbbi 15 év során (Burgos és mts., 1993; Pedryc, 2003).

Már a múlt század közepén bebizonyosodott két észak-amerikai fajtáról ('Riland' és 'Perfection') 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). Ha két különböző önmeddő fajta egymást kölcsönösen nem képes termékenyíteni, kölcsönös inkompatibilitásról beszélünk, és ezeket a fajtákat azonos, ún. inkompatibilitási csoportokba soroljuk. Ez a jelenség az olyan tipikus önmeddő gyümölcsfajok esetében, mint a cseresznye (Crane és Lawrence, 1929; Crane és Brown, 1937; Matthews és Dow, 1969) és mandula (Tufts és Philp, 1922; Pimienta és mts., 1983; Ben-Njima és Socias i Company, 1995; Kester és mts., 1994) igen régóta jól ismert, ugyanakkor kajszinál korábban teljesen ismeretlen volt.

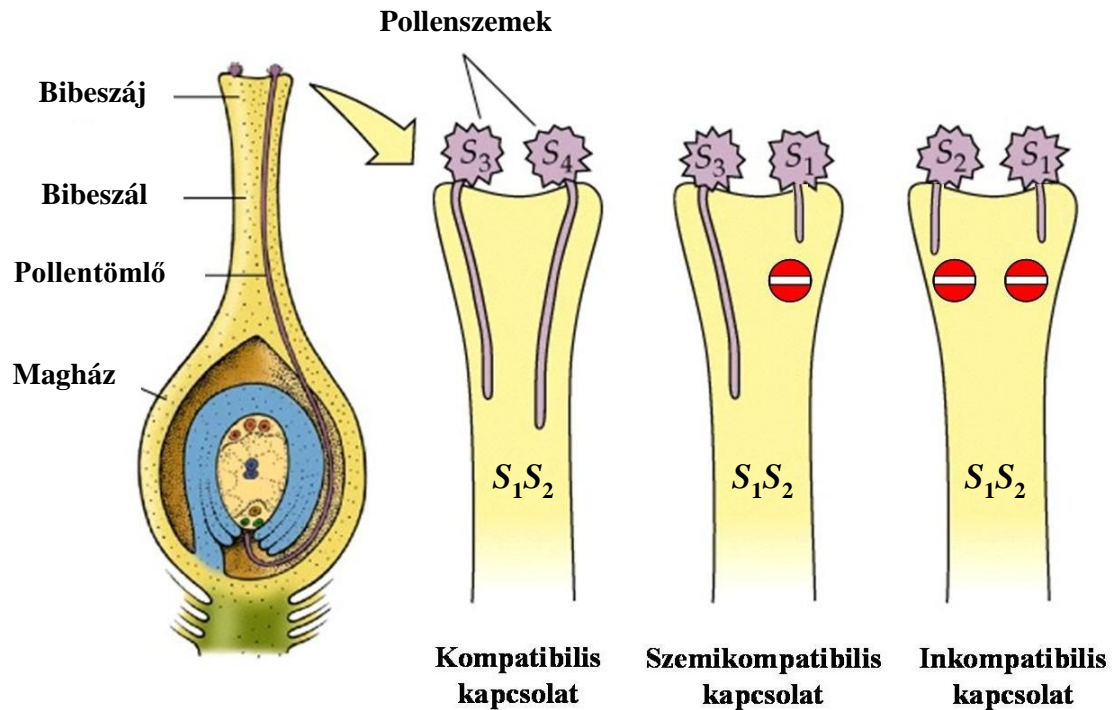
Szabó és Nyéki (1991) szabadföldi tesztkereszteзések alapján megállapították, hogy az Óriás fajtakör tagjai ('Ceglédi óriás', 'Szegedi mammut', 'Nagykőrösi óriás' és 'Ligeti óriás') egymást kölcsönösen nem termékenyítik. Így e fajták alkotják a kajszi elsőként leírt inter-inkompatibilitási csoportját. 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 genetikai azonosságuk természetes, és így nem tekinthetők önálló csoportnak. Burgos és mts. (1993) nyolc spanyol fajta tesztkereszteзése alapján nem találtak kölcsönösen inkompatibilis fajtákat. A spanyol fajták többsége észak-amerikai (önmeddő) és európai (ön-termékenyülő) fajták kereszteзéséből származik (Egea és mts., 1988), ezért nagymértékű heterozigotáság jellemzi őket. Egea és Burgos (1996) pollentömlő-analízissel és szabadföldi kereszteзésekkel észak-amerikai fajták kompatibilitási viszonyait vizsgálva megállapították, hogy a 'Lambertin-1', 'Goldrich', 'Hargrand' és 'Harcot' fajták önmeddőek, 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 jelöltek meg. A spanyol szerzők e fajtacsoportot helytelenül a kajszi első inkompatibilitási csoportjaként írták le, figyelmen kívül hagyva az öt évvel korábban ismertetett, Óriás fajtakörbe tartozó fajták kölcsönös inkompatibilitását (Szabó és Nyéki, 1991). A 'Harcot' ( $S_1S_4$ ) fajta e csoport tagjaival kompatibilisnek bizonyult.

### 2.2.1 A *Prunus* fajok önmeddőségét meghatározó molekuláris rendszer

A hermafrodita virágokban a reprodukzív szervek egymás közelében helyezkednek el, az öntermékenyülés mégsem lehetséges, mert azt genetikailag meghatározott mechanizmusok akadályozzák. A tulajdonságot egy multiallélikus lókuszt kódolja, amit a sterilitás szóról *S*-lókusznak neveztek el (de Nettancourt, 2001). Ez a genetikai inkompatibilitás további két nagy csoportot foglal magába: a sporofitikus és a gametofitikus önmeddőséget (Clarke és Newbiggin, 1993).

A gametofitikus inkompatibilitást (GSI) szabályozó mechanizmus többféle is lehet, melyek közül a leginkább tanulmányozott és legrégebb óta ismert GSI rendszer az *S*-ribonukleáz enzimek (*S*-RN-ázok) részvételén alapul, és létezését mindeztáig négy növény-családban igazolták: a *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Campanulaceae* és a *Prunus* fajokat is magába foglaló *Rosaceae* családokban (de Nettancourt, 2001; Franklin-Tong és Franklin, 2003).

A GSI során a pollen fenotípusát saját haploid genotípusa határozza meg (3. ábra). Inkompatibilis 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*-lókuszt a bibében kifejeződő ribonukleáz enzimet kódolja (*S*-RN-áz) (McClure és mts., 1989), illetve a pollentömlőben expresszáldó, a közelmúltban azonosított *S*-haplotípus-specifikus F-box (SFB) fehérjét (Lai és mts., 2002; Entani és mts., 2003; Ushijima és mts., 2003). A sajátidegen felismerési reakció tehát e két molekula részvételével, az *S*-RN-áz és az F-box fehérjék között zajlik le (McCubbin és Kao, 2000).



3. ábra. A magasabbrendű növények gametofita típusú 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 (Halász, 2007a)

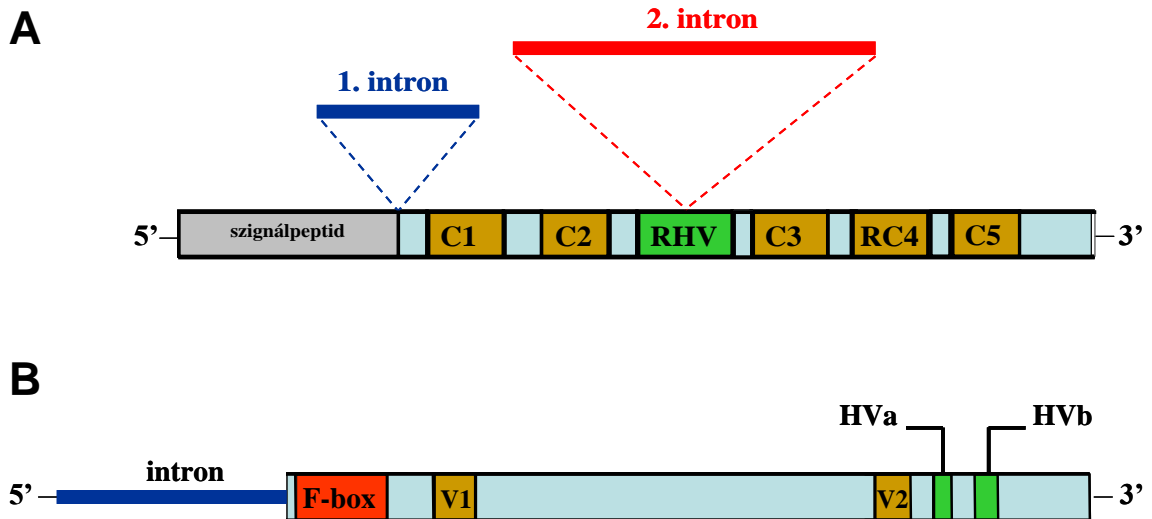
A termékenyülési folyamatok háttérében álló molekuláris mechanizmusok tisztázása terén a Melbourne-i Egyetem Adrienne E. Clark által vezetett kutatócsoportja igen jelentős aktivitást fejtett ki az 1980-as évek kezdetétől. A csoport kezdetben cseresznyén, később dohányon végezte kísérleteit. Jelentős áttörést akkor értek el, amikor felfedezték, hogy a *Nicotiana glauca* 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). Ez esetben tehát a pollentömlő nem képes saját fehérjéinek előállítására, vagyis fejlődése, növekedése leáll.

A *Solanaceae* családból származó, 12 különböző DNS-szekvencia összehasonlításával kiderült, hogy az *S*-RN-áz gén öt konzervatív (C1–C5) és két hipervariábilis (HV<sub>a</sub>, HV<sub>b</sub>) régiót tartalmaz (Ioerger és mts., 1991; Tsai és mts., 1992). Transzgénikus *Solanum chacoense*

növényen bizonyították, hogy a HV régió felelős az allélspecifikus felismerésért (Matton és mts., 1997).

A *Rosaceae* családba tartozó fajok közül elsőként az alma esetében közöltek *S*-RN-áz cDNS szekvenciákat (Broothaerts és mts., 1995). Kiderült, hogy a gén öt konzervatív (C1–C5) és egy hipervariábilis (RHV) régiót tartalmaz. Ushijima és mts. (1998) 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. A C2 és a C3 régiók a gomba T<sub>2</sub>-RN-ázokban is megtalálható, igen konzervatív szekvenciamotívumok, melyek az RN-áz fehérje aktív centrumait alkotva részt vesznek az RNS-lánc hidrolízisében (Kawata és mts., 1988; Broothaerts és mts., 1995). A hipervariábilis régió többségben hidrofíl aminosavakból áll, ez a szakasz a globuláris fehérje felszínén helyezkedik el, ami előfeltétele annak, hogy szerepe legyen a bibe–pollen közötti allélspecifikus felismerési reakcióban. Az RHV régió mellett az RN-áz fehérje más szakaszairól is igazolták, hogy részt vehetnek az allélspecifikus felismerési reakciókban (Zisovich és mts., 2004; Ortega és mts., 2006).

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 (4A. 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.



4. ábra. A: 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. B: 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. (2004) és Nunes és mts. (2006) adatai alapján.

Régóta ismert volt, hogy a termékenyülést szabályozó lókusznak a bibeszálakban kifejeződő termékén túlmenően kell legyen egy, a pollentömlőben kifejeződő fehérjeterméke 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.

*Petunia* és *Antirrhinum* növényekben azonosítottak egy *SLF* nevű gént (S-lókuszs F-box), melynek F-box fehérjeterméke 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 gén tulajdonságai alapján mindenben



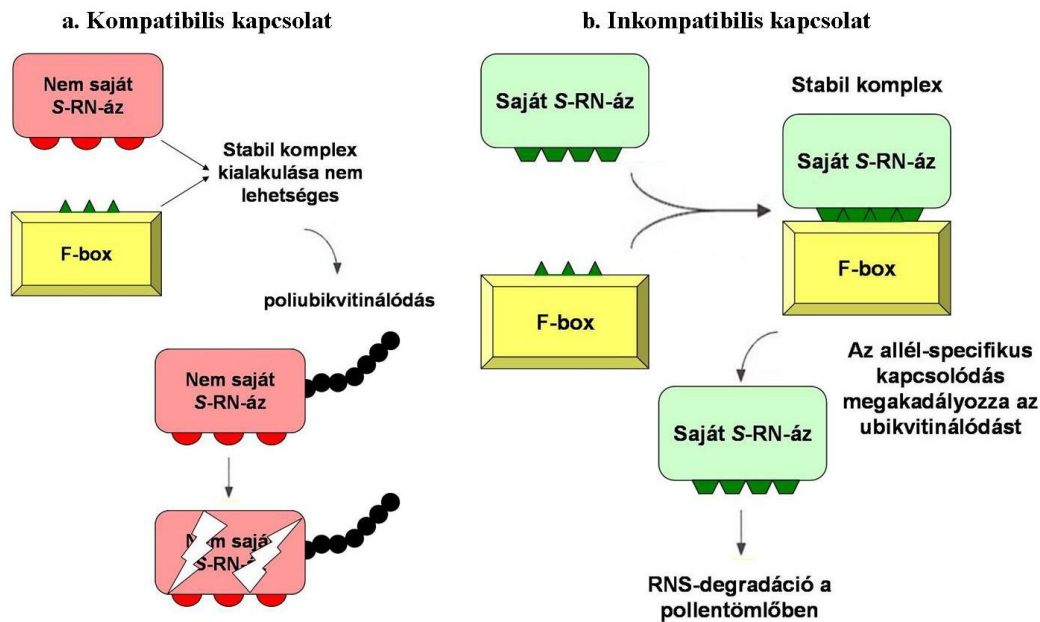
megfelelt a pollenkomponenssel szemben támasztott követelményeknek. Az *S*-lókusz tehát egy multigén komplex, ez alapján a „haplotípus” kifejezés a lókusz valamennyi génváltozatára együttesen értendő, míg az „allél” csak az egyik gén változataira használandó (McCubbin és Kao, 2000).

Entani és mts. (2003) írtak le a japánkajszai (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) F-box génjét, míg Ushijima és mts. (2003) mandula F-box géneket azonosítottak, melyeket SFB-nek (*S*-haplotípus-specifikus F-box fehérje) neveztek el. A gén egy intront tartalmaz. Cseresznye (*Prunus avium* L.) F-box motívumokat vizsgálva Ikeda és mts. (2004) két variábilis (V1, V2) és két hipervariábilis (HVa, HVb) régiót találtak. Ezek a régiók többségben hidrofil aminosavakból állnak, így a fehérje felületén helyezkednek el, és valószínűleg az allélspecifikus felismerésért felelősek (4B. 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 írtak le *S*-haplotípus-specifikus F-box fehérjét (Romero és mts., 2004).

### **2.2.2 Az *S*-RN-áz alapú inkompatibilitási rendszer működésének molekuláris modellje**

Az inkompatibilitási kapcsolat jelenleg elfogadott molekuláris modellje 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 (Sonneveld és mts., 2005). Ezen általános degradációs folyamat az ubikvitin / 26S proteasóma 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*-lókusz által kódolt, bibeszálban expresszáldó ribonukleáz enzim (*S*-RN-áz) és a pollentömlőben kifejeződő F-box fehérje közötti molekuláris felismerési reakció kompatibilis kapcsolat (a) és inkompatibilis (b) kapcsolat esetében.

### 2.2.3 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, 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 öntermékenyülését irányító genetikai, molekuláris biológiai folyamatok feltérképezése terén. 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 (*Prunus dulcis* Mill.) esetében szintén igazolták, hogy az öntermékenyüléshez

kapcsolható  $S_r$ -ribonukleáz aktivitása nem mutatható ki a bibeszálakban (Bošković és mts., 1999).

Az öntermékenyülést azonban nem csak az  $S$ -RN-áz enzimek funkcióserülése 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, melyeket röntgensugárral kezelt pollenanyasejtek használatával állítottak elő (Lewis, 1949). Több mint fél évszázad elteltével ma már tudjuk, hogy mindkét magonc esetében az SFB génszakaszon bekövetkezett deléciónak okozta az öntermékenyülést (Sonneveld és mts., 2005). E két szelekció felhasználásával állították elő a napjainkban világszerte sokfelé termesztett, öntermékenyülő cseresznyefajták ('Stella', 'Lapins', 'Alex' stb.) sorozatát.

A japánkajszi öntermékenyülő fajtáiban is a pollen SFB gén sérülését mutatták ki: egy idegen DNS-szakasz beékelődése akadályozza a funkcióképes F-box fehérje kialakulását (Ushijima és mts., 2004). Ennek kialakulása azonban nem az emberi beavatkozásnak, hanem egy természetes mutációnak köszönhető.

Vilanova és mts. (2006a) az európai kajszi 'Currot' ( $S_C S_C$ ) fajtájából izolálták és klonozták az  $S_C$ -RN-ázt és az SFB<sub>C</sub>-allélt. Egy 358 bp hosszúságú inszerciót azonosítottak az SFB<sub>C</sub> 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.

#### **2.2.4 DNS-alapú $S$ -genotípus-vizsgálatok**

A bibe komponens  $S$ -RN-ázok azonosítása utat nyitott a termékenyülési viszonyokat meghatározó genotípusok vizsgálatára. Ehhez először fehérjealapú (izoelektromos fókuszálás és enzimspecifikus festés), később pedig DNS-alapú technikákat használtak. A *Rosaceae* családban az alma volt az első növény, melynek  $S$ -alléljait DNS-alapú markerezés útján sikerült azonosítani (Broothaerts és mts., 1995). A bibeszálakból izolált mRNS-ből cDNS-t készítettek, és összevetették a genomikus és cDNS szekvenciákat, meghatározva az almafélékre jellemző egyetlen intron helyzetét.

A *Maloideae* alcsalád fajjaival szemben a *Prunus* nemzetségbe tartozó fajok *S*-RN-áz alléljai két intront tartalmaznak (4A. ábra) (Ushijima és mts., 1998; Igc 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 intronjára, mind a csonthéjasok 1. intronjára jellemző polimorfizmus mértékét. Az intronokat határoló konzervatív régiókra primereket tervezve PCR-amplifikációval agaróz gélen jól értékelhető, *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. Cseresznye vizsgálatához Sonneveld és mts. (2001), mandula vizsgálatához Tamura és mts. (2000) terveztek konszenzus primereket. Kajszi PCR-vizsgálatához Vilanova és mts. (2005) illetve Sutherland és mts. (2004) végeztek degenerált, konszenzus primerekkel sikeres amplifikációt.

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 mandula esetében Ortega és mts. (2005) alkalmazták sikerrel. Cseresznyében 13 allél esetében ismertették a 234–460 bp közötti 1. intronrégiók hosszát (Sonneveld 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*-allélszekvenciák nemzetközi, on-line adatbázisokban (EMBL/GenBank/DDBJ) szabadon hozzáférhetők, ami segíti a különböző laboratóriumokban elért eredmények összevetését.

### **2.2.5 A japánkajszi *S*-allél-rendszere**

A japánkajszi (*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 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.

### 2.2.6 Az európai kajszis $S$ -allél-rendszere

Az  $S$ -lókusz a mandula és a kajszis esetében is a 6. kapcsoltsági csoportba térképeztek (2. ábra). Burgos és mts. (1997b) igazolták, hogy az inkompatibilitás monofaktoriális tulajdonság, mely a mendeli szabályok szerint öröklődik. Vizsgálatukban 19 különböző keresztezésből (mindkét szülő önmeddő; mindkét szülő öntermékenyülő; egyik szülő önmeddő, másik öntermékenyülő) származó utódok termékenyülési fenotípusát vizsgálták. Burgos és mts. (1998) nem egyensúlyi izoelektromos fókuszálással (NEpHGE) alapján kilenc észak-amerikai és spanyol fajtában azonosítottak 6 allélt, amelyek az önmeddőség kialakításában játszanak szerepet ( $S_1$ - $S_6$ ), illetve az öntermékenyülést biztosító  $S_C$ -allélt. 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.

Az  $S$ -allélok számát később kibővítették, amikor a korábban nem ismert  $S_7$ -allélt azonosították NEpHGE alapján (Albuquerque 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.

Sutherland és mts. (2004) három konszenzus primert 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 kajszis 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 2. táblázat összefoglalja a termékenyülési, fehérje és DNS-alapú vizsgálatokkal eddig megismert kajszis  $S$ -genotípusokat.

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

csoporthatár	fajta	<i>S</i> -genotípus	forrás
I. inter-inkompatibilitási csoport	Goldrich		Egea és Burgos (1996)
	Hargrand	$S_1S_2$	
	Lambertín-1		
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. (2004)
	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 pollenadókhoz 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.

A kajszi *S*-RN-áz gén két intronjának hosszát az  $S_1$ -,  $S_2$ - és  $S_4$ -allélok esetében pontosan meghatározták, és az SFB<sub>1</sub>, SFB<sub>2</sub> és SFB<sub>4</sub> allélok szekvencia-polimorfizmusát jellemezték (Romero és mts., 2004).

## 2.3 A molekuláris markerezés technikái

### 2.3.1 Bevezetés

A fehérje- illetve DNS-alapú genetikai markereken alapuló technikák – izoenzim mintázat, RFLP, RAPD, SSR, AFLP – használata napjainkra rutinszerűvé vált az ökológiai, evolúciós, taxonómiai, filogenetikai és a növényi genomokat érintő gyakorlati felhasználású tanulmányokban. Ezeknek az eljárásoknak az alapprotokolljai már precízen kidolgozottak az alkalmazásuk előnyei és hátrányai, felhasználásuk potenciális területei jól ismertek. A folyamatosan megjelenő új markerezési módszerek a fenti alaptermotechnológiák kombinálásán, illetve az adott kutatási célnak megfelelő finomításokon alapulnak. Ennek köszönhetően jelentősen javulhat például a markerezés pontossága, minimálisra csökkenthető a célszekvencia és a marker közötti rekombináció gyakorisága. Az újabban kifejlesztett markerek jellegzetesen kihasználják a genom speciális régióit, mint például retrotranszpozonokat, mitokondriumokat, kloroplasztiszokat. A következő években a teljes növényi genomokra kiterjedő ismeretek gyors ütemű bővülésével, a markerezési technikák fejlődésében és a markerek alkalmazásában drasztikus változások várhatók.

Már Gregor Mendel (1822-1884) is a genetikai markerek egyik első felismerőjeként tekinthető, hiszen az öröklődési szabályszerűségek tanulmányozásánál, a borsónövényeket nem egy egész, és emiatt átláthatatlanul bonyolult rendszerként kezelte, hanem csak néhány jól definiálható morfológiai marker megjelenésének törvényszerűségeire koncentrált. Hunt Morgan és munkatársai által az 1930-as években a *Drosophila melanogaster* vizsgálata során részletesen leírt genetikai rekombináció jelensége, és annak precíz statisztikai elemzése szintén a fenotípusban azonosítható gazdag morfológiai markerrendszernek volt köszönhető. Hamar kiderült azonban, hogy egy sor genetikai alapkérdés megválaszolásához a morfológiai markerekkel kimutatható variabilitás nem ad elegendő információt. Már a hatvanas években a morfológiai markerek viszonylagos hiánya, a fenotípusbeli variabilitás korlátozottsága éles ellentétben állt az akkorra már pontosan ismert, genomokat érintő potenciális mutációs gyakoriság által prognosztizálható genetikai diverzitással. Ezekben az években a molekuláris biológia egyre bővülő eszköztára alapot adott a fehérje- és DNS-szintű variabilitás detektálására, megoldva ezzel az evolúciókutatás egyik alapproblémáját, és egyben utat nyitva az új kutatási területek fejlődésének. Ennek köszönhetően ma már a genetikai kérdések alapvetően csak molekuláris szinten kutathatók.

A növénynemesítés tudománya, amelynek praktikus célja a megfelelő és a növény genetikai hátterét csak a legszükségesebb mértékben befolyásoló fenotípus kialakítása, sokáig ettől eltérően ítélte meg a morfológiai és molekuláris markerek, illetve a molekuláris biológia nyújtotta lehetőségek alkalmazásának célszerűségét. Ez különösen jellemző volt a fás növények nemesítése esetén. Az új fajták iránti egyre növekvő kereslet és az egyes molekuláris technikák rutinszerűvé válása, a molekuláris technikák alkalmazhatóságának világos meghatározása a 21. század elejére jelentős változást hozott ebben a tekintetben. Korábban a lágyszárú és gazdaságilag fontos növények nemesítésében már meghonosodott molekuláris technikák folyamatosan átkerültek a gyümölcsfajokra specializálódott nemesítési műhelyekbe is. Ennek gyakorlati haszna ma még csak néhány gyümölcsfaj és néhány tulajdonság tekintetében fedezhető fel, de e folyamat kétségtelen hozományaként, nagymértékben gyarapodott a gyümölcsfajok genetikájára, taxonómiai rendszerére, gazdaságilag fontos génforrások hatékony kiaknázására vonatkozó tudásunk.

## **2.4 A molekuláris markerek általános jellemzői**

Definíció szerint molekuláris markernek azt a valamilyen módon kimutatható DNS-szakaszt értjük, amely képes a genomszintű változékonyság kimutatására. A molekuláris markerek nem szükségszerűen korrelálnak a tulajdonságok fenotípusban való megjelenésével. A morfológiai markerekhez képest a molekuláris markerek általánosítható előnye a szövettől, fejlődési fázistól való függetlenségük. Egyes markerek esetében viszont, mint például izoenzim-mintázatok vagy a cDNS szekvenciára építő eljárásoknál, éppen az adott növényi szervekben vagy az ontogenezis egyes folyamataiban fellépő polimorfizmus rögzíthető a megfelelő markerrendszer segítségével. A markerek jelenlétét nem befolyásolják a környezeti tényezők, pleiotróp és episztatikus hatások.

Ideális esetben egy molekuláris technika a következő általános kritériumoknak tesz eleget:

- polimorf és a genomon belül egyenletesen eloszlott markereket mutat ki
- megfelelő felbontásban képes felismerni a kérdéses régiókat
- több független, és megbízható marker felismerésére képes
- egyszerű, gyors, a kivételezése nem igényel költséges technológiát
- kevés a szövet- és DNS-igénye
- kapcsolatban áll az elkülöníthető fenotípusokkal
- nem igényel előzetes információt a vizsgált genomról vagy szervezetről



Sajnos a fent megfogalmazott igények egyetlenegy technikára sem érvényesek maradéktalanul. A kertészeti növények DNS-alapú molekuláris markerezésére leggyakrabban a következő alkalmazzák: RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) restriktációs fragmentumhossz polimorfizmus, RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS, SSR (*simple sequence repeats*) amplifikált mikroszatellit régió, CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) hasított és felszaporított fragmentumok polimorfizmusa, SCAR (*sequence characterized amplified region*) szekvencia szinten jellemzett marker, AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus. Az egyes markerezési eljárások előnyeit és hátrányait a 1. táblázat foglalja össze (Agarwal és mts., 2008).

3. táblázat. A gyakran használt molekuláris markerezési technikák különböző szempontok szerinti összehasonlítása

	Gyakoriság	Reprodukálhatóság mértéke	Polimorfizmus mértéke	Lókusz-specifititás	Műszaki feltételek	Szükséges DNS-mennyiség	Fő alkalmazási területek
<b>RFLP</b>	nagymértékű	nagy	közepes	van	nagy költségigényű	nagy	Fizikai térképezés
<b>RAPD</b>	nagymértékű	kismértékű	közepes	nincs	kis költségigényű	kevés	Géntérképezés
<b>SSR</b>	közepes mértékű	közepes	közepes	nincs	közepes költségigényű	kevés	Genetikai változékonyság kutatása
<b>CAPS</b>	kismértékű	nagy	kismértékű	van	nagy költségigényű	kevés	Allélváltozékonyság kimutatása
<b>SCAR</b>	kismértékű	nagy	közepes	van	közepes költségigényű	kevés	Géntérképezés és fizikai térképezés
<b>AFLP</b>	nagymértékű	nagy	közepes	nincs	közepes költségigényű	közepes	Géntérképezés

## 2.5 Az izoenzimek általános jellemzése

Az izoenzimek az első olyan molekuláris markerek, amelyeket széles körben és sokféle céllal alkalmaztak úgy az elméleti tudományágak művelői, mint a gyakorlathoz közelebb álló nemesítők. Az izoenzimek funkciója azonos, aminosav-sorrendjük egy adott lókuszban vagy különböző lókuszekben kódolt. Az izoenzimeken belül később megkülönböztették az allozimeket, ami alatt definíció szerint az olyan enzimváltozatokat értjük, amelyek egy gén különböző alléljai által kódoltak. Ezek aminosav-szekvenciája is eltérő, de szintén ugyanazt a kémiai reakciót katalizálják (Schmidt, 1997). A szakirodalom ezt a két kifejezést sok esetben más-más tartalommal használják vagy jelentéseik összezsúsznak, ezért a továbbiakban az izoenzim kifejezést eredeti, átfogó jelentésében használjuk ugyanazon reakciót katalizáló enzimek változataiként függetlenül attól, hogy azok a genomban egy vagy több lókuszból különböző alléljai által kódoltak.

Az azonos funkciójú, de eltérő szerkezetű enzimek létezésének felfedezése a szeparálásukhoz szükséges elektroforézis protokollok kidolgozása utáni időszakra, az ötvenes évek végére datálható (Hunter és Markert, 1957). Magát az izoenzim fogalmát Markert és Moller vezették be 1959-ben (Leland és Shannon, 1968). Már akkor, a különböző állati szövetek vizsgálatának eredményeként nyert, eltérő zimogram-mintázatok elemzése során, bebizonyosodott, hogy az egyes esetekben az izoenzimek szövetspecifikusak, valamint az is, hogy az ontogenezis különböző fázisaiban jellegzetes izoenzimeloszlás mutatható ki (Markert és Hunter, 1959).

A növényi enzimrendszerek kutatása szinte ugyanebben az időben indult. Elsőként Schwartz (1960) közölte a hibridkukorica egyes enzimjeivel kapcsolatos tapasztalatait. Annak ellenére, hogy a hatvanas évek elején létezett már megfelelő technológiai háttér az izoenzimek vizsgálatához, az ilyen jellegű munkák csak kisebb teret kaptak a növények biokémiáját érintő kutatásokban. Az igazi áttörés ezen a téren annak a felismerésnek köszönhető, amely szerint, az izoenzim-variabilitás nem csak egyed szinten, hanem a populációkon belül is kimutatható. Az ezt követő időszak intenzív izoenzimkutatást indított a populációgenetikusok körében, amelynek köszönhetően először sikerült gyakorlatban is ellenőrizni az eddig főleg elméletileg és az állatpopulációknál bebizonyított populációgenetikai törvényszerűségeket (Stebbins, 1989; Wendel, 1989).

Az izoenzimeknek a növénygenetikában, illetve a nemesítésben való felhasználhatóságáról az első átfogó, a korábbi ismereteket rendszerező jelentős mű, 1983-ban jelent meg

(Tanksley és Orton, 1983), amelyben a lágyszárú növények mellett, Adams (1983) leírja az izoenzimek jelentőségét a fás növények nemesítésében is. Az izoenzimek elválasztásának jelentőségét és fontosságát, azok kodomináns jellegében, valamint az episztatikus és környezeti modifikáló hatás relatív hiányában látja. Sokféle szövetben való azonosíthatóságát lényeges előnynek tekinti. Az izoenzimrendszer elemzéséből nyert adatok a taxonómiai, genetikai és evolúciós kutatásokban egyaránt felhasználhatók. Ebben az időben, a gyümölcsfajok esetében az izoenzimmintázatok elemzését, alapvetően a fajták azonosítására és a hibridek eredetének alátámasztására alkalmazták (Torres, 1983).

### **2.5.1 Az izoenzimek alkalmazása a csonthéjas gyümölcsfajok kutatásában**

Az izoenzimelemzés kis költsége és a kivitelezhetőség viszonylagos egyszerűsége további előnyt jelentett a technika használatánál. A csonthéjas és héjas gyümölcsfajok esetében, ennek a technikának az elterjedése többek között az Arulsekar és Parfitt (1986) publikációjában közölt, és néhány gyümölcsfaj esetében megbízhatóan alkalmazható módszereknek köszönhető.

A fenti előnyök ellenére az izoenzimmintázat elemzésének jelentős határt szab a viszonylag kisszámú lókuszt, és az azokon fellelhető korlátozott mértékű allélvariabilitás. Ezekből kifolyólag nem véletlen, hogy a mérsékelt égövben termesztett gyümölcsfajok közül, az idegentermékenyülő, és ezáltal nagyobb alléldiverzitással rendelkező fajok esetében értek el figyelemre méltó eredményeket az izoenzimek vizsgálatával. Jelentős mértékű polimorfizmust sikerült kimutatni a japánszilva (Byrne és Littleton, 1988a) és mandula esetében (Arulsekar és mts., 1986a; Sathe és mts., 2001). Ezzel szemben a morfológiai szinten nagyfokú variabilitást mutató, alapvetően öntermékenyülő és jelentős mértékben beltenyészett őszibarackfajták esetében, a polimorf lókusztok száma korlátozottnak bizonyult (Durham mts., 1987; Agarwal és Nath, 2001). Arulsekar és mts. (1986a) 12 enzimlókuszt hasonlítottak össze őszibarack- és mandulafajtáknál. Míg a mandula esetében, tizenkét enzimből, kilencnél tapasztalták a polimorfizmust eredményező izoenzimek jelenlétét, úgy az őszibaracknál mindössze egy lókusztban (Mdh-1) találtak eltérő allélokra utaló izoenzimeket. Ennek a génnek a változékonysága visszavezethető az amerikai nemesítési programba bevezetett kínai alapanyagokra.

Az izoenzimek elemzése lehetőséget adott az egyes allélok öröklődésének nyomon követésére is. A fás növényeknél a morfológiai markerek öröklésének tisztázását, nagymértékben korlátozza a tulajdonságok poligénikus meghatározottsága. Az izoenzimeket kódoló

allélok közvetett, de ugyanakkor egyértelmű azonosítása a zimogrammok alapján korábban soha nem látott lehetőségeket kínált a populációgenetikával foglalkozó kutatók számára. Ezenkívül lehetővé tette a nemesítésben is felhasználható markerek öröklődésének tanulmányozását. Ezek a kutatások a később megjelenő MAS (Marker Assisted Selection) előfutárának tekinthetők. Mowrey és mts. (1990) őszibarack és őszibarack × mandula hibridpopulációban írták le három enzimrendszer izoenzimjeinek öröklődését.

Az izoenzimek nemesítésben való felhasználhatóságának intenzív kutatása jelentősen hozzájárult az egyes *Prunus* fajokra vonatkozó genetikai ismeretek megalapozásához molekuláris szinten. Az almasav-dehidrogenáz (MDH) izoenzimek lókuszáinak vizsgálata őszibarackban (Arulsekar és mts., 1986b), és annak összehasonlítása a kajszibaracknál tapasztalt genetikai meghatározottsággal (Byrne és Littleton, 1989a) rávilágított a genetikai háttér összetettségére, multilókuszos jellegére az őszibaracknál, és egy ehhez képest viszonylag egyszerű rendszer jelenlétére a kajszinál. Ezekben a vizsgálatokban már pontosan megnevezik azokat az izoenzimjeit, amelyek megbízhatóságuknak köszönhetően a gyakorlatban is felhasználhatók az őszibarack és kajszinemesítésében. A gyakorlatban alkalmazható ismeretek mellett a két faj kutatói sok olyan információt nyertek az enzimlókuszkokról, amely ugyan közvetlenül nem használható fel a nemesítésben, de fontos lépés volt afelé, hogy a növényfajok jellemzését, a nemesítési módszerek fejlesztését a későbbiekben molekuláris szintre lehessen alapozni.

A többi gazdaságilag fontos növénycsoporthoz hasonlóan, a *Prunus* fajok esetében is az izoenzimek felhasználásának egyik jellegzetes területe az interspecifikus hibridek eredetének ellenőrzése volt. Byrne és Littleton (1989b) hat enzimlókuszos izoenzimjeit vizsgálta, hogy azzal bizonyítsa azok alkalmasságát a japánszilva (*P. salicina*) és a kajszinemesítés (*P. armeniaca*) hibridek (plumcot) azonosítására. Megállapításaik szerint a peroxidáz izoenzimjeinek elemzésével, megfelelő biztonsággal el lehet különíteni a hibrid egyedeket a két szülői típustól. Hasonló vizsgálatokat végeztek az őszibarack (*P. persica*) és mandula (*P. dulcis*) hibridek esetében is (Byrne és Littleton, 1988b).

A fenti alkalmazási lehetőségeken kívül Mowrey és Werner (1990) megkísérelték egy átfogó filogenetikai tanulmány keretén belül felülvizsgálni az *Amygdalus*, *Prunus*, *Cerasus* és – a korábban egyes vélemények szerint külön alnemzetséget képező (Ingram, 1948) – *Lithocerasus* alnemzetségekhez tartozó 34 faj taxonómiai hovatartozását. A 11 enzimlókuszos és az ott azonosított 110 allél felhasználásával elvégzett klaszteranalízis alapján megerősítettek a korábban kialakított rendszertani besorolásokat. Kivétel képezett a *Lithocerasus*

alnemzetség, amelyről kiderült, hogy egy mesterségesen kialakított rendszertani kategória, amely fenotípusosan nagyon hasonló, de genetikailag jelentősen különböző fajokat foglal magába, és így azonos csoportba történő besorolásuk nem indokolt.

Különlegességnek tekinthető az a genetikai térkép, amelyet a cseresznye két hibridpopulációja alapján szerkesztettek, és amely csak izoenzim-markereket tartalmaz (Bošković és mts., 1997).

Jelenleg az izoenzimek vizsgálata általában nem önálló cél, hanem a genetikai variabilitás megjelenítésének egyik formájaként jelenik meg, amely kombinálva a DNS-alapú markerekkel, felhasználható a genetikai térképek készítésénél (Weeden, 1994).

#### **2.5.1.1 Izoenzimek a kajszibarack kutatásában**

A kajszii izoenzimmintázatok elemzésének módszertani háttérét eleinte, a többi csonthejas gyümölcsfajhoz hasonlóan, az Arulsekar és Parfitt (1986) dolgozatában közölt protokoll biztosította. Ezt az eljárást később Byrne és Littleton (1988a) módosította, és először szilvánál, később pedig a kajszinál alkalmazta (Byrne és Littleton, 1989a). Módszerfejlesztésként sor került a poliakrilamid- és keményítőgélekben történő elektroforézis összehasonlítására is (Major és mts., 1999).

Az izoenzimrendszerek vizsgálatának eredményeit a kajszinál először Byrne és Littleton (1989a) tették közzé. Hatvankilenc különböző eredetű – európai, közép-ázsiai és észak-kínai – fajtát és hibridet vizsgáltak. A hét enzimlókuszt közül három bizonyult polimorfnek. Néhány fajta egyedi izoenzim-mintázatot mutatott. A kajszii izoenzim polimorfizmusának mértéke elmaradt a szilvára és mandulára jellemző értékektől, meghaladta viszont az őszibarackra jellemző értéket (Byrne és Littleton, 1989a; Byrne, 1989). Battistini és Sansavini (1991) négy polimorf enzimlókuszt elemzésével 50 kajszii fajtát 16 egyedi mintázatú csoportba soroltak. Badenes és mts. (1998) tíz enzim izoenzim-mintázatát vizsgálva eredet szerint három földrajzi csoportba – észak-amerikai, iráni-kaukázusi és európai – tudott besorolni 94 fajtát. Manganaris és mts. (1999a) lényegesen nagyobb fokú polimorfizmusról számoltak be, bár ennek oka abban is keresendő, hogy 17 kajszifajta mellett 56 interspecifikus keresztezésből származó hibridet is bevontak kísérleteikbe. A 20 enzimlókuszt közül 17 bizonyult polimorfnek. Ezeknek a vizsgálatoknak alapvető hiányossága, amely miatt eredményeik nem használhatók az egész fajra jellemző polimorfizmus vagy heterozigótáság jellemzésére a kutatók rendelkezésére álló viszonylag szűk genetikai háttérre reprezentáló genotípusokban keresendő (Badenes és mts., 1998; Manganaris és mts., 1999b). Byrne és Littleton (1989a) vizsgálá-

---

[Irodalmi áttekintés]

lata esetében az eredmények általános érvényét jelentősen korlátozta a monomorf lókuszek nagy aránya.

Sikeresnek ítéltető az izoenzimintázat elemzésének alkalmazása az interspecifikus hibridek és a szülői genotípusok elkülönítésére. Ilyen célú kutatások során azonosíthatók voltak például a szülőként felhasznált kajszai- és japánszilvafajták, valamint a plumcot, pluot és aprium hibridek (Byrne és Littleton, 1989b; Manganaris és mts., 1999a).

## **2.6 Az RFLP módszer általános jellemzése**

Az RFLP-technika elemeit tartalmazó kutatásokat először vírus, élesztő és humán genetikusok alkalmazták már a hetvenes évek közepén (Grodzicker és mts., 1974; Hutchinson és mts., 1974; Potter és mts., 1975; Petes és mts., 1977). Molekuláris markerként való felhasználásáról és az első ilyen alapú térképről elsőként Botstein és mts. (1980) számoltak be. A DNS-polimorfizmus kutatása ezzel vette kezdetét. Ez az a publikáció, amely először definiálja az RFLP-markereket. Az RFLP esetében a polimorfizmus alapja, a DNS restrikciós endonukleázok segítségével történő emésztése eredményeként keletkezett DNS-fragmentumok hossza. A vizsgálat objektumát képező DNS-szakaszt úgy teszik láthatóvá, hogy az emésztést követően radioaktív jelzéssel ellátott oligonukleotid próbával hibridizáltatják. A hibridizáció technikáját Southern (1975) dolgozta ki. A fentieknek megfelelően az RFLP nyújtotta változékonyság a munkához kiválasztott endonukleázon és a próba specifikus interakcióján alapszik. Eredetüknél fogva RFLP-markerek kodomináns jellegűek (Agarwal és mts., 2008).

## **2.7 RFLP alkalmazása *Prunus* fajoknál**

DNS-mintaként általában cDNS-t, ritkábban genomi DNS-t használnak. Ezzel a technikával elméletileg korlátlan számú marker hozható létre, ami kiváló lehetőséget ad a markerrek közötti kapcsoltság kimutatására, és így különösen alkalmassá teszi az RFLP-t genetikai térképek készítésére. Az utóbbi különösen fontos a *Prunus* nemzetség esetében, ahol viszonylag kicsi a tipikusan erre a génuszra jellemző variabilitás mértéke (Martinez-Gómez és mts., 2003).

Ezeknek a jellegzetességeknek köszönhetően az RFLP-markereket a *Prunus* nemzetségben alapvetően térképezési célokkal használták. A kilencvenes években szerkesztett térképek szinte kizárólag erre a markerre alapoztak. Ide tartoznak azok a *Prunus* genetikai térké-

pek, amelyeket az őszibarack (Rajapakse és mts., 1995), az őszibarack × mandula hibridek (Foolad és mts., 1995; Joobar és mts., 1998), a mandula (Viruel és mts., 1995) és meggy (Wang és mts., 1998) utódpopulációi elemzése alapján készítették. A jelenlegi térképek is alkalmazzák az RFLP és ennek módosított változataként a PCR-RFLP markereket, bár egyre nagyobb szerephez jutnak más markerek, mint például az AFLP vagy a mikroszatellitok.

A térképezésben betöltött kiemelkedő jelentőségű szerep mellett sokkal ritkább az RFLP-markerek felhasználása fajták azonosítására, illetve fajok genetikai diverzitásával kapcsolatos kutatásokra a *Prunus* fajok esetében.

Quarta és mts. (1998) az RFLP- és RAPD-markerek segítségével harmincnégy őszi-barackfajta genetikai diverzitását elemezte. Munkájukban a mandula genomi és cDNS könyvtárakból nyer 28 próbát alkalmazták, amelyek közül csak kilenc eredményezett polimorf mintázatot. A RAPD és az RFLP eredményeit külön-külön értékelve hasonló eredményeket kaptak. A vizsgált fajtákra megállapított azonossági index (*Similarity Index*) értéke mind a két módszer esetében azonos következtetésekhez vezetett. Ennek megfelelően a jelenleg természetben lévő őszibarackfajták korlátozott genetikai variabilitása nagymértékű beltenyésztettségre utal.

Lester és mts. (1996) olyan RFLP-marker kidolgozásáról számoltak be, amely segítségével azonosítani tudták a puhuló és a kemény gyümölcshúsú őszibarackfajtákat.

### **2.7.1 RFLP módszer alkalmazása a kajszibarack kutatásban**

De Vincente és mts. (1998) 52 európai és észak-amerikai kajszifajtában vizsgálták az RFLP-markerek által kimutatható polimorfizmus mértékét. A mandula 33 genomi és cDNS próba közül 18 bizonyult polimorfnek. Az általuk kimutatott polimorfizmus elegendő volt a 45 genotípus azonosítására. A felmérés szerint a spanyol eredetű fajták polimorfizmusa a többihez viszonyítva szignifikánsan kisebb volt.

Hurtado és mts. (2001) hasonlították össze az RFLP-, RAPD- és AFLP-technikákkal kimutatható genetikai variabilitás fokát 16 kajszifajtában. Eredményeik azt mutatják, hogy az adott esetben az AFLP szolgáltatja a legtöbb polimorf markert. Az egy primerre eső polimorf markerek számával kifejezett hatékonyságot figyelembe véve, a RAPD-módszer kétszer hatékonyabbnak bizonyult az RFLP-vel való összehasonlításban.

A hivatkozott publikációk számából is világosan látszik, hogy a térképezési területen kívül az RFLP-markerek használata erősen korlátozott. Ennek több oka van. Az RFLP-

technika idő- és költségigényes, nem utolsó sorban magában foglalja radioaktív és más, az emberi egészségre káros anyagok használatát. Ezenkívül alkalmazásához nagy mennyiségű és megfelelő minőségű DNS-minta szükséges. Jelenleg ezt a technikát többféleképpen kombinálják a PCR-alapú markerekkel. Ide tartozik például a CAPS, illetve a szinonimaként használt PCR-RFLP markerezés (Konieczny és Ausubel, 1993).

## 2.8 RAPD-polimorfizmus kimutatása

A RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) technika a genomi DNS egyes szakaszainak irányított amplifikálásán alapszik. A módszer kidolgozását mindenek előtt Mullis és Faloona (1987) által kidolgozott PCR-eljárása tette lehetővé. A RAPD által kimutatható polimorfizmusnak első módszertani leírását Williams és mts. (1990) tették közzé. Ők ajánlották a módszer elnevezését is, amelynek kiejtését „*rapid*”-ként javasolták. A DNS-szekvenciákban fellelhető variabilitás, a tetszőleges összetételű oligonukleotid primerek között amplifikálódó DNS hosszúságában mutatható ki. Az általánosan elterjedt primerek tíz nukleotid hosszúak. Az amplifikált DNS méretbeli különbségeit a primerek kötőhelyein, vagy a közöttük lévő szakaszon bekövetkező deléciók vagy inszerciók okozzák. Nem zárható ki a kötőhely nukleotid szekvenciájában bekövetkező változás sem, bár figyelembe kell venni, hogy a primerek kötődéséhez nem feltétlenül szükséges a teljes komplementaritás. A módszer kidolgozóinak szerint ezek a markerek felhasználhatók lesznek az állattenyésztés, növénytermesztés, illetve nemesítés terén, a genetikai térképezésben, evolúciós vizsgálatokban (Williams és mts. (1990)). Az eljárás fő problémája a korlátozott reprodukálhatóságban rejlik. Ez azt jelenti, hogy különböző laborokban azonos protokoll szerint elvégzett tesztek, nem adnak megbízhatóan egybeeső eredményeket. A pontos genetikai elemzést megnehezíti a RAPD-markerek domináns jellege, amiből kifolyólag nem képesek különbséget tenni a homozigóta és heterozigóta egyedek között (Agarwal, és mts., 2008). A gyorsaságnak és hatékonyságnak köszönhetően viszont több növény esetében felhasználták ezt a technikát a térképezésben. A RAPD-markerek felhasználásával készültek például lucerna (Kiss és mts., 1993), lóbab (Torres és mts., 1993) alma (Hemmat és mts., 1994) térképek. A nem-izogén vonalak RAPD-módszerrel történő elemzése sikeres volt, a rezisztenciagénekhez kapcsolt markerek azonosítására paradicsomnál (Martin és mts., 1991), salátánál (*Lactuca* sp.) (Paran és mts., 1991), valamint babnál (*Phaseolus vulgaris*) (Adam-Blondon és mts., 1994) került sor.



### 2.8.1 A RAPD-polimorfizmus kimutatása a csonthéjas gyümölcsfajoknál

A RAPD-technikát széleskörűen alkalmazták a genetikai alapú azonosításra a mezőgazdaságilag legfontosabb *Prunus* fajok, mint például az őszibarack, mandula, szilva, cseresznye, meggy vagy éppen a kajszii esetében.

Warburton és Bliss (1996) 136 különböző földrajzi területről származó őszibarackfajtát hasonlított össze RAPD-dal. Tizenkét jól elkülönülő csoportba sorolták a fajtákat. A csoportok közül kilenc az ázsiai fajtákat tartalmazta, míg az európai és amerikai fajták három csoportot alkottak, és kisebb genetikai változatosságot mutattak. Lu és mts. (1996) tizennyolc őszibarack alany között tudtak különbséget tenni a RAPD-technikával, és olyan genetikai hasonlósági kapcsolatokat kaptak, amelyek megfeleltek feltételezett eredetüknek. Casas és mts. (1999) negyvenegy *Prunus* alanyt, különböző fajokat és interspecifikus hibrideket vizsgáltak RAPD-dal, és a kísérletből nyert eredmények alapján három olyan nagy csoportba sorolták őket, amelyek egybeestek a már korábban meghatározott besorolással.

Bartolozzi és mts. (1998) tizenhét kaliforniai mandulafajta genetikai rokonságát és lehetséges eredetét vizsgálták 20 RAPD primer alkalmazásával, és a rügymutánsoktól eltekintve, minden egyes fajtát el tudtak különíteni egymástól. A fajtákat három csoportba sorolták a származásuk alapján.

Ortiz és munkatársai (1997) különbséget tudtak tenni eltérő földrajzi helyekről származó huszonnyolc hexaploid és három diploid szilvafajta között három primer használatával, amelyek által amplifikált fragmentumok tisztán elváltak a diploid és a hexaploid genotípusoknál, és jól korreláltak ismert szülőikkel. Hasonlóan Shimada és munkatársai (1999) negyvenkét különböző ploidszintű szilvafajta között tudtak különbséget tenni 20 RAPD primer alkalmazásával, és két főcsoportba (európai és japán) sorolták a fajtákat, amely besorolás jól követte a korábbi felosztást.

Cseresznye (*P. avium* L.) esetén tizennyolc fajtát jellemzett molekulárisan RAPD markerekkel Gerlach és Stösser (1997). A vizsgált fajták közül tizenhatot el tudtak különíteni huszonhárom RAPD primerrel, de mint ahogy az várható volt, a rügymutánsok között nem találtak különbséget.

Jun és mts. (2002a) beszámoltak a madhoz való kötöttség kimutatására alkalmas RAPD markerekről.

### 2.8.1.1 Kajsziarack elemzése RAPD-technikával

Az izoenzimekhez hasonlóan, a RAPD-technikát is kajszinál elsőként Gogorcena és Parfitt (1994) alkalmazták. Még ugyanabban az évben Shimada és mts. (1994) ötvennégy japánkajszi fajta (*P. mume* Sieb. Et Zucc.) genetikai rokonságát vizsgálták, 95 RAPD primerrel. Eredményeik alapján hét csoportba sorolták be a fajtákat, amelyek eredetüknek megfeleltek. Később Takeda és mts. (1998) harminchárom kajszi és további két rokon faj (*P. sibirica* L. és *P. brigantina* Vill.) rokonságát vizsgálta tizennyolc RAPD primerrel és két fő csoportba osztották őket: a keleti eredetű (Kelet-Kína és Japán) és a nyugati eredetű (Európa, Közép-Ázsia és Nyugat-Kína) fajtákra. Ezt követte egy viszonylag hosszú időszak, amely alatt kajszi esetében nem alkalmazták ezt a technikát. Csak 2000-ben jelent meg a következő közlemény, amelyben Zhebentyayeva és Sivolap (2000) beszámoltak munkájuk eredményeiről. Kísérletükben a RAPD és izoenzim polimorfizmust vizsgálták a kajszi genetikai diverzitásának felmérése céljából. A különböző eredetű, és ezen belül a géncentrumokból származó fajták vizsgálatával megállapították, hogy a termesztett kajszi alapvetően a vad *P. armeniaca*-ból alakult ki, bár a kínai centrumban a kajszihoz genetikailag közel álló fajok is szerepet játszhattak a faj domesztikációjában. Eredményeik szerint az európai fajták genetikai diverzitása kicsi volt.

Hormaza (2001) ötven különböző eredetű kajszi fajta RAPD- és SSR-markerekkel történő elemzését végezte el. Ezt a vizsgálatot kiegészítette olyan spanyol fajták tesztelésével, amelyek pomológiai jellemzőik alapján nagyon közel álltak egymáshoz. A két markerezési technika lehetővé tette a valóban különböző genotípusok azonosítását és a szinonim fajták kiemelését.

Jun és mts. (2002b) több *Prunus* faj sikeres RAPD-elemzését végezte el. RAPD-markerekkel azonosított 19 olasz, görög és észak-amerikai fajtát. Meghatározta az amplifikált régiók pontos szekvenciáját és ennek alapján SCAR-markereket tervezett. Magyarországon Pedryc és mts. (2002) a kereskedelmi forgalomban lévő fajtákat sikeresen azonosították RAPD-markerekkel.

Ahogy ez az előbb idézett publikációkból kiderült, ma már a RAPD-módszert nem célszerű egy önálló markerezési eljárásként alkalmazni, hanem más markerezési technikákkal kombinálva kell kiaknázni a RAPD gazdag polimorfizmusát miközben más módszerek előnyeivel csökkenteni lehet a módszerben rejlő bizonytalanságokat. Ez a tendencia látható például a Baránek és mts. (2006), illetve Hurtado és mts. (2001) munkáiban.

## 2.9 Az AFLP-technika általános jellemzése

A RAPD-módszer egyik legnagyobb korlátjának – a bizonytalan reprodukálhatóság kiküszöbölése érdekében Vos és mts. (1995) kidolgozták az AFLP markerezési eljárást. Ez a technika magában egyesíti az RFLP-marker gazdag mintázatát, a genomon belüli egyenletes eloszlást a PCR nyújtotta rugalmassággal és relatív egyszerűséggel. Az AFLP eljárás az RFLP-hez hasonlóan első lépésben restriktív endonukleázokkal – egy ritka és egy gyakori felismerési szekvenciával rendelkező enzimmel – emészt a DNS-mintát. Következő lépésként történik a duplaszálú DNS adapterek ligálása a fragmentumok végére, és ezt követi az adapterekre és a hasítóhelyre tervezett primerek közötti DNS-szakasz amplifikálása, majd gélen való megjelenítése. Ebben az esetben a polimorfizmus kimutatásának alapját nem az enzimatisztikus emésztés után nyert fragmentumok hossza képezi, hanem azok jelenléte vagy hiánya.

Az AFLP egy sor előnnyel rendelkezik az előző technikákhoz képest. Egy kísérlet során egyszerre több lokusz vizsgálható, a primerek kapcsolódásának nagyfokú specifikussága pedig biztosítja a gélmintázat megbízható reprodukálhatóságát. Powell és mts. (1996) kimutatták, hogy ez a technika képes a legnagyobb mértékű polimorfizmus detektálására.

### 2.9.1 Az AFLP alkalmazása *Prunus* fajoknál

#### 2.9.1.1 Őszibarack

Dirlewanger és mts. (1998a) megerősítették Powell és mts. (1996) megállapításait, melyek értelmében az őszibarack polimorfizmusának kutatásánál az AFLP technika sokkal hatékonyabb, mint az izoenzimek, az RFLP vagy a RAPD. Az őszibarack esetében a szűk genetikai háttér és a faj evolúciójának korai stádiumában kialakult öntermékenyülő fenotípus erősen redukálta a természetben kimutatható variabilitást. Ennek folyományaként az olyan érzékeny markerezési technika, mint az AFLP különösen értékesnek ígérkezett e faj kutatásában.

Az AFLP-módszerrel történő fajtaazonosítás egyik első beszámolója Dirlewanger és mts. (1998a) nevéhez fűződik. Hatvanhat őszibarackfajtát vizsgáltak, összehasonlítva a RAPD használatával kimutatott variabilitást az AFLP-markerek nyújtotta polimorfizmus mértékével. Kihangsúlyozták a két módszer együttes alkalmazásának komplementer jellegét, bár az AFLP-t lényegesen hatékonyabb módszernek értékelték. Ilyen összehasonlításokra később is sor került. Aranzana és mts. (2001a) összevetették az AFLP és az akkor már közismert SSR

technika hatékonyságát 100 fajta vizsgálata során. Kísérletükben 40 AFLP marker elegendő volt 97 fajta azonosítására, ezzel szemben 7 polimorf SSR lókuszt alléljei segítségével csak 78 fajta egyértelmű elkülönítése vált lehetővé. A két módszer kombinálása viszont már 99%-os eredményt hozott.

Már 1999-ben Manubens és mts. (1999) hangsúlyozták a megfelelően kiválasztott primer és a megfelelő minőségű DNS-minta fontosságát. Publikációjukban közzé tették az őszibarackfajta azonosítására optimalizált DNS-kivonás protokollját, és a 66 primer közül kiválasztották a legjobb 6-ot, amely az általuk vizsgált őszibarack- és nektarinfajtáknál a legeredményesebbnek bizonyult. A DNS-minta jelentőségét Aranzana és mts. (2001b) is kiemelték. Levélből és gyümölcsből nyert DNS-t alkalmazva, nem minden esetben sikerült azonos AFLP-mintázatot nyerniük. Ilyen problémát nem tapasztaltak viszont az SSR-markerek használatakor.

Az AFLP-technika alkalmazható a fajtaeredet megállapítására valamint a filogenetikai kutatások során. Ezt kihasználva, az AFLP-markerek és pedigréadatok együttes elemzésével egy hagyományos kínai fajtát sikerült azonosítani a japán őszibarackfajta őseként (Xu és mts., 2006).

Az AFLP MAS-ban való felhasználhatóságára példa a Wu és mts. (2004) által közölt eredmény, amely szerint a kutatócsoportnak sikerült megtalálni azt az AFLP-markert, amelylyel az őszibarack esetén szelektálni lehet a nagy és kis savtartalmú genotípusokat. Az első őszibarackalanyokat elemző genetikai térkép is AFLP-markerek felhasználásával készült el (Lu és mts., 1998). A térképen olyan markerek is szerepelnek, amelyekkel a nematódarezisztencia nyomon követése lehetővé válik.

### **2.9.1.2 Cseresznye és meggy**

A cseresznye és meggy genom viszonyai, a ploidfok és a két faj keresztezéséből származó természetes hibridek eredetének megerősítése vagy cáfolata a *Cerasus* nemzetségen belül jelentős kutatási célnak számít. Tavaud és mts. (2004) AFLP-markerekkel elemezték a *P. avium* ( $AA\ 2n=2x=16$ ) és *P. cerasus* ( $AAFF\ 2n=4x=32$ ) fajokat. A *P. cerasus* F genomja a *P. fruticosa*-ból származik. Nagy valószínűséggel sikerült azonosítani azt az AFLP-markert, amely alkalmas az A és F genom azonosítására és nyomon követésére az egyéb interspecifikus hibridekben.

Tavaud és mts. (2001) a francia termesztett cseresznyefajták és a vad *P. avium* genotípusok variabilitását vizsgálta. A 4 primer felhasználásával nyert 76 marker klaszteranalízise a termesztett fajtákat 3 csoportba sorolta. A vad genotípusok kulcsoportot alkottak. A dendrogram elemzése alapján a szerzők feltételezték, hogy a francia vadcsesznye legalább két eltérő származási ágon alakult ki. Ugyanezt meg lehetett állapítani a termesztett fajtákról.

Boritzki és mts. (2000) 10 AFLP primerpár használatával 128 cseresznyefajta egyedi azonosítását végezték el. Összesen 712 AFLP-fragmentumot nyertek, amelyek közül 124 bizonyult polimorfnak. Primerpáronként 5-26 polimorf lókuszt sikerült azonosítani. Zhou és mts. (2002) hat primerpár segítségével 167 cseresznyefajta egyedi allélösszetételét határozták meg. Az ismert pedigrek és az AFLP-eredmények összehasonlításával megtörtént a klaszteranalízis besorolásainak ellenőrzése. Az eredmények bebizonyították, hogy az AFLP megbízható technikának tekinthető a genetikai távolságok valamint rokonsági viszonyok megállapítására cseresznyénél.

Struss és mts. (2003) elvégezték az AFLP és mikroszatellit elemzést több cseresznyefajtánál levélből illetve gyümölcshúsból kivont DNS-minta használatával. Az összes fajta azonosítása sikeres volt, a gyümölcshúsból extrahált DNS elemzésére kidolgozott protokoll lehetővé teszi a fajtaazonosság vizsgálatát a piacon megjelenő tételeknél.

### **2.9.1.3 Szilva**

Cseresznyeszilva genotípusok a török mediterrán régióból viszonylag kis genetikai diverzitást mutattak az AFLP-markerezés eredményeként. Az egyes termesztési körzetek közötti eltérések viszont jelentősnek bizonyultak (Ayanoglu és mts., 2007).

Bianchi Valmor és mts. (2002) az SSR- és az AFLP-markereket használták a dél-brazíliai szilvák jellemzésére. Tizenkét fajtát egyértelműen sikerül azonosítani. A szerzők által szerkesztett dendrogramon a hexaploid szilvák élesen elkülönültek a diploidoktól. A diploidokon belül a *P. salicina* és *P. cerasifera* fajták is külön csoportokba rendeződtek. Az AFLP által kimutatott variabilitás nagyobb volt az SSR-markerek által detektálhoz képest. Goulao és mts. (2001) szintén képesek voltak a diploid és a hexaploid szilvák egyértelmű elkülönítésére AFLP markerezéssel. Vizsgálataikhoz 24 diploid és 4 hexaploid fajtát használtak.

#### 2.9.1.4 Mandula

Harmincöt portugál mandulafajtát és 5 vadnak feltételezett genotípust vizsgáltak egy nemesítési program előkészítése során. Az AFLP nagymértékű polimorfizmust mutatott ki és lehetőséget adott a fajták egyedi azonosítására (Martins és mts., 2001).

Yon és RongCai (2004) genetikailag szélesebb körben folytatták a mandula vizsgálatát AFLP-markerekkel. Termesztett mandulafajtákat és az öt rokonfajhoz tartozó genotípust vizsgáltak 3 primerpárral. Százharminchárom polimorf allél által az összes genotípus elkülöníthető volt. A mandulafajták egy csoportba kerültek a klaszteranalízis során, bár nagy polimorfizmust mutattak (*similarity index*: 0,6800). Az egy termesztési régióhoz tartozó fajták is azonos csoportokba kerültek.

Az AFLP-vel végzett mandulamarkerezési tanulmányok közül kiemelkedik Sorkeh és mts. (2007) munkája. Ebben mintegy 45 iráni, európai és amerikai fajtát vizsgáltak. Eredményeik igazolták a vizsgált fajták nagymértékű polimorfizmusát, a genetikai azonosság indexe 0,5 és 0,96 között változott. A közölt eredményekből jól látható, hogy a markerekkel kimutatott polimorfizmus tökéletesen alkalmas volt a fajták földrajzi eredetének, pedigréjének bizonyítására, de csak kis korrelációt mutatott a pomológiai markerek alapján készített klaszterrel.

#### 2.9.1.5 Kajszi

A kajszi esetében az AFLP markereket a fajták azonosítására és a diverzitás vizsgálatokra egyaránt alkalmazták. Hurtado és mts. (2002) 16 kajszifajtát vizsgáltak 6 primerpárral. Eredményként 231 polimorf markert sikerült azonosítani, amelyek minden egyes fajtának egyedi mintázatot biztosítottak. Hasonló céllal Hagen és mts. (2002) 47 különböző eredetű fajta AFLP-polimorfizmusát vizsgálták. Az európai, észak-amerikai, észak-afrikai, török, iráni és kínai fajták szerepeltetése a kísérletben a genotípusok kellően széles spektrumát biztosította a módszer tesztelésére és az általánosítható következtetések levonására. A *P. armeniaca* fajhoz tartozó fajtákon kívül egy-egy genotípussal képviseltette magát a *P. ansu*, *P. mume*, *P. brigantica*, *P. dasycarpa* és *P. holoserica* nemzetség. Összesen 379 polimorf marker elemzésével megállapították, hogy a fajták eredetének függvényében a kajszi genetikai diverzitása folyamatosan csökken Közép-Ázsia és Dél-Európa között. A fajok közötti genetikai távolságokat figyelembe véve, a szerzők szerint a *P. armeniaca*-hoz való genetikai közelség miatt nem indokolt *P. holoserica*-t külön fajnak tekinteni. A *P. mume* viszont távol került a *P. armeniaca*-tól. A vizsgált fajok közül a *P. brigantica* mutatott legkevesebb genetikai azonosságot a *P. armeniaca*-val.

Panaud és mts. (2002) a Szahara oázisaiban termő kajszifajták genetikai polimorfizmusát tanulmányozta az AFLP-markerekkel. Ebben a kísérletben 7 primerpár 97 polimorf markert eredményezett. A fenti munkákhoz hasonlóan ez a variabilitás ebben az esetben is elegendő volt az összes fajta egyedi azonosítására. Az AFLP ilyen célú felhasználásra való alkalmasságát Ricciardi és mts. (2002) is megerősítették az apuliai genotípusok azonosításával; továbbá Geuna és mts. (2003), akik 5 primer segítségével 118 genotípus pontos, egyedi AFLP-mintázatát határozták meg.

Az *Amygdalus*, *Armeniaca*, *Cerasus* és *Prunophora* fajcsoportokat képviselő 7 termesztett és 7 vad fajra terjedt ki az a tanulmány, amelynek eredményeiről Aradhya és mts. (2004) számoltak be. Az AFLP-analízis eredményeként, azt állapították meg, hogy a *Prunus* alnemzetségen belül az *Armeniaca* fajcsoport genetikailag szignifikáns mértékben eltért az ugyanezen alnemzetségbe tartozó *Prunophora* fajcsoporttól. A molekuláris variabilitás alapján az *Armeniaca* fajcsoport bizonyult legváltozékonyabbnak, ezt követték a hexaploid szilvák, a mandula, a cseresznye és a diploid szilva. A legkisebb variabilitást a várokozásnak megfelelően az őszbarack esetében tapasztalták.

Függetlenül a számos publikációtól, amely az AFLP-analízist a fajtaazonosítás, a genetika távolságok és így származási kérdések tisztázása vagy a faj diverzitáskutatása érdekében alkalmazták, úgy tűnik, hogy a módszer technikai összetettsége és a kísérletek költségei miatt jelenleg a gyümölcsfajok esetében a fenti célokra inkább az SSR-markerek alkalmazása elterjedtebb (Wünsch és Hormaza, 2002b).

## **2.10 Mikroszatellit (SSR) markerek**

A szatellit szekvencia kifejezést már jóval korábban alkalmazták, mielőtt ismertté vált volna, hogy azok tandem ismétlődő DNS-régiókat tartalmaznak. A DNS-kutatók már korábban kimutatták, hogy az ultracentrifugában kialakított sűrűség gradiens hatására a genomi DNS jellegzetes frakciókra oszlik szét és jól látható sávokba rendeződik. A sávok pozíciója a G-C nukleotidpárok függvénye. Hamar kiderült, hogy a gradiens detektálása közben prokarióta szervezeteknél rendszeresen csak egy csúcsot lehet regisztrálni, miközben az eukarióta DNS esetében ezzel szemben megjelent egy, a vizsgált DNS átlagát reprezentáló széles csúcs, amelyet számos kisebb csúcs kísért. Az eltérő sűrűséget jelző, szokatlan kis csúcsokat szatellit csúcsoknak, a kialakulásukat eredményező DNS régiókat pedig ennek megfelelően szatellit DNS-nek nevezték el. A renaturáció kinetikai elemzése, ahhoz a felismeréshez

---

[Irodalmi áttekintés]

vezetett, hogy a szatellit DNS akár több millió repetitív szekvenciát tartalmazhat. Amennyiben ennek a frakciónak GC nukleotidpár aránya jelentősen eltér a genomi DNS átlagos összetételétől, szükségszerűen külön csúcsként jelenik meg a centrifugálást követően. Amennyiben a repetitív szekvencia bázisösszetétele nem tér el jelentősen a többi DNS-től, úgy ezek a fragmentumok nem válnak el a centrifugálás során, hanem a nagy frakción belül maradnak. Ezek az ún. kriptikus szatellitek. Ez az előzmény vezetett ahhoz, hogy a szatellit DNS szinonimaként megmaradt a repetitív szatellit szekvenciák elnevezésére, ahol az ismétlődés mértéke  $10^3$  és  $10^7$  között változik, és az ismétlődő szekvenciák hossza eléri a 300 bp-t. A szatellit szekvenciák lókuszaik száma egy kromoszómán belül általában egy, de lehet kettő is. A miniszatellit DNS jelentősen különbözik a szatellit DNS-től abban a tekintetben, hogy az ismétlésekből álló klaszter lényegesen kevesebb repetitív szekvenciát tartalmaz – kettőtől legfeljebb néhány százig. Az ismétlődő szekvencia hossza viszont sokkal rövidebb, 5-9-től legfeljebb száz nukleotidig. A legfontosabb eltérés a lókusztok számában van, amely itt elérheti néhány ezret és elő a genomon belül szétszóródva fordulnak (Tautz és Renz, 1984)

Az egyes meghatározott típusú ún. „simple sequence” ismétlődéseket véletlenszerűen már viszonylag korán felfedezték. Ide sorolhatók a 70-es években a humán genomban azonosított nagy piridintartalmú régiók, vagy a kígyóknál azonosított GATA és GACA ismétlődő motívumok (Birnboim and Straus, 1975; Epplen és mts., 1982). A humán genomban később is beszámoltak újabb ismétlődő, variábilis szekvenciákról (Wyman és White, 1980). Egy részük a humán gének határrégióiban helyezkedet el, mint ahogyan ezt tapasztalták például az inzulin vagy az  $\alpha$ -globin gének esetében (Higgs és mts., 1981; Bell és mts., 1982). Ezeknek a szekvenciáknak sem a szerepe, sem genomi előfordulásuk gyakorisága nem volt még ismert. Az eddig meghatározott motívumokat nem egy jelenséggént kezelték, hanem külön-külön osztályokba sorolták be.

A repetitív szekvenciák kutatásának egyik legjelentősebb felfedezéséről Tautz és Renz (1984) számoltak be. Kutatásuk célja a „simple sequenced” szekvenciák konzekvens rendezése volt. Kísérletükben a különböző összetételű dinukleotidokból (GT/CA, GA/CT, AA/TT) szintetizált repetitív szekvenciákat hibridizáltatták a humán, *Drosophila*, tengeri sünn és élesztő DNS-ével, amelyeket előzőleg az EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztettek. Az eukarióta szervezeteken kívül a kísérletben szerepelt még három prokarióta genom, nevezetesen az *Escherichia coli*, a lambda fág és a pBR 322 plazmid vektor DNS-e. A poli-dinukleotidokon kívül egy poli-trinukleotidot (CAG/GTC) is alkalmaztak. A kísérlet eredmé-



neyi alapján bizonyítást nyert, hogy az ismétlődő szekvenciák általános jelenségként fordulnak elő az eukarióta szervezetek genomjaiban, és nemcsak egy adott kombináció megjelenése a jellemző, ahogyan ezt a korábbi munkák sugalmazták, hanem minden lehetséges dinukleotid ismétlődés létezése lehetséges. Ekkor feltételezték, hogy csak az eukariótákra jellemző jelenségről van szó, mert a kísérletben használt prokariótáknál a hibridizáció nem mutatott ki a próbákhoz komplementer DNS motívumokat. A szerzők feltételezték, hogy az ismétlődések keletkezésének okát sokkal inkább a replikációkor bekövetkező ún. „csúszás”-ban (*slippage*) és az egyenlőtlen crossing overben kell keresni, mint valamilyen funkcionális szerepben.

A prokarióta genomban található ismétlődő szekvenciák kimutatása ugyanarra az időre vezethető vissza, mint az eukarióta szervezetek esetében (Gilson és mts., 1984). Néhány év elteltével megjelentek az ezen a területen történő kutatások összefoglalásából született áttekintő közlemények is (Lupski és Weinstock., 1992; Belkum és mts., 1998; Bachelier és mts., 1999).

Ma már ismert, hogy a mikroszatellit szekvenciák beépültek a baktériumok kódoló régióiba és befolyással vannak a génexpresszióra. Az ismétlődő szekvenciák variabilitása többek között lehetővé teszi a prokarióta szervezetek gyors genetikai alkalmazkodását a környezet változásaihoz, így például szerepet játszik a virulencia faktorok módosulásában. Ezekből kifolyólag a mikroszatellit polimorfizmusra vonatkozó ismeretek gyarapítása jelenleg jelentős szerepet kap az orvostudományokban a patogén mikroorganizmusok kutatásában (Metzgar és mts., 2001; Lindstedt és mts., 2007).

Tautz és Renz (1984) munkáját követően, elsőként Jeffreys és mts. (1985a) tanulmányozták behatóan e szekvenciák potenciális változatainak előfordulását az emberi genomban és ismételten arra a következtetésre jutottak, hogy a repetitív szekvenciák előfordulása általános jelenségnek számít. A miniszatellit elnevezést először ebben a publikációban használták. Ezt a közleményt még ugyanebben az évben követte az a publikáció, amely a DNS-szintű elemzés, a DNS „*fingerprinting*” korszak kezdetét jelentette. Ebben a tanulmányban ugyanis leírták a fenti jelenség alkalmazhatóságát az egyedi humán genotípusok azonosítására (Jeffreys és mts., 1985b).

A Jeffreys és mts. (1985a) által ajánlott miniszatellit elnevezés helyett később Nakamura és mts. (1987) a humán variábilis régiók elemzése során bevezették a *Variable Numbers of Tandem Repeats* (VNTR) kifejezést. Az általuk használt név és annak rövidítése lényegében ugyanazt a markertípust írja le. Tautz (1993) a miniszatellit elnevezést részesítette

előnyben, kiemelve, hogy ez a név kapcsolatot teremt a jelenség eredeti elnevezésével, bár egyetért azzal, hogy a VNTR jobban kifejezi annak lényegét. Éppen ebből kiindulva az egyes publikációkban sokszor alkalmazták ezt nevet, bár általában azzal a céllal, hogy ezzel éppen a szekvencia ismétlésében rejlő variabilitás forrását jelezzék, és nem annak egyik típusát. Wright és Bentzen (1994) például VNTR mikroszatellitnek nevezi azokat a tandem ismétléseket, ahol az ismétlődő egység hossza 1-10 bp, ezzel szemben a VNTR miniszatellit alatt a 9-65 bp hosszú ismétlődő szekvenciákat érti. Jelenleg az Amerikai Orvostudomány Könyvtára (*U.S. National Library of Medicine, Medical Subject Headings*) által ajánlott hivatalos nomenklátúra szerint a VNTR kifejezést a jelenséget általánosan leíró rövidítésként vagy a miniszatellit szinonimájaként lehet alkalmazni. A VNTR kifejezés az utóbbi öt év publikációiban nagyon ritkán található meg, használata szinte kizárólag az orvostudományi folyóiratokban terjedt el.

A miniszatellit kimutatása kezdetben a Southern (1975) által kidolgozott lenyomat-technika „*blot*” módszerrel történt. Már egy évvel az után, hogy Mullis és Faloona (1987) közzé tette a PCR technika elvi alapjait, Jeffreys és mts. (1988) beszámoltak a miniszatellit humán DNS-mintából PCR-technikával történő amplifikálásáról. A PCR-technika egy új korszakot nyitott a DNS-polimorfizmus kutatásában. Nem csak egyszerűbbé tette a vizsgálatok menetét, hanem azon felül lényegesen finomabb szintű variabilitás kimutatására is alkalmas volt. Ezt elsőnek Litt és Luty (1989), valamint velük egy időben Weber és May (1989) ismerték fel. Mind a két kutatócsoport olyan tandem ismétlődő szekvenciákat mutatott ki PCR-technikával, amelyek poli-dinukleotid repetitív szekvenciából álltak és az ismétlődések száma egy blokkon belül kisebb volt, mint ezt eddig a miniszatellitknél tapasztalták. Ezeket a szekvenciákat Litt és Luty (1989) mikroszatellitnek nevezte el. Mind a két kutatócsoport bebizonyította, hogy a PCR-rel történő amplifikáció olyan módszer, amely technikailag lehetővé teszi a mindössze néhány bázispárt érintő variabilitás kimutatását. A kezdeti szakaszban az amplifikált mikroszatellit elválasztására és az eredmények értékelésére a poliakrilamid illetve agaróz gélek mintázatát alkalmazták. Ehhez az eljáráshoz képest ugrásszerű javulást eredményezett a fluoreszcens jelölésű primerek bevezetése, az ezen alapuló lézersugaras detektálhatóság és ezáltal a folyamat automatizálhatósága (Wenz és mts., 1998). A fluoreszcens jelölés ugyan gyorsabbá és nagy felbontásúvá tette a mikrosatellit analízist, de ezzel jelentősen növelte a kutatás költségét is.

Kezdetől fogva kérdés volt, hogy milyen mechanizmus révén képződnek a tandem ismétlődő szekvenciák és milyen szerepet játszanak a szervezetek genetikai apparátusában, ha egyáltalán van valamilyen funkciójuk. Már Tautz és Renz (1984) felfedezve ezen motívumok általános voltát az eukariótákban és figyelembe véve repetitív jellegüket, azt feltételezték, hogy keletkezésükért felelős lehet a DNS-polimeráz replikációkor bekövetkező „megcsúsza- sa” a mintaszál olvasásakor, valamint az egyenlőtlen *crossing over*. Ugyanakkor kihangsúlyozták, hogy amennyiben valóban ezek a mechanizmusok felelősek az ismétlődések kialakulásáért, akkor ez általánosan, minden nukleatidkombinációjú ismétlődő egységre érvényes kell legyen. Nem zártak ki azonban olyan eltérő eseteket sem, amikor például az AA/TT szekven- cia képződhet a poli-A farok reverztranszkripciójával. A Tautz és Renz (1984) által feltétele- zett, a replikáció során kialakuló *frameshift* mutációk sem ismeretlenek. Levinson és Gutman (1987a) nyomon követték ennek a mechanizmusnak következményeit az M13 bakteriofágnál, amelynek genomjába GA/CT ismétlődő szekvenciájú inzertet helyeztek be. Az összes mutá- ciós eseményhez képest a kérdéses régió hosszúságának kimutatható változása 1%-os gyako- risággal lépett fel, ami arra utal, hogy a többit a javító enzimrendszer korigálni tudta. Az is- métlődő rövid szekvenciák ilyen módon történő keletkezését megerősítette Schlötterer és mts. (1991) azzal a kísérletsorozattal, amelyben laboratóriumi körülmények között, *in vitro* irányí- tott replikációval hoztak létre a repetitív szekvenciákat. Azt állapították meg, hogy a frameshift mutációk nagy gyakorisággal fordulnak elő az ismétlődő szekvenciákat tartalmazó DNS-régióiban. Ugyanakkor Levinsonhoz és Gutmanhoz hasonlóan hangsúlyozták, hogy a genomban rögzült *frameshift* mutációk gyakorisága a javítás hatékonyságán múlik.

Az ismétlődő szekvenciák funkcióját tekintve, sokáig nem volt megbízható informá- ció. Tautz és Renz (1984) feltételezte, hogy az ismétlődő szekvenciák nem játszanak genetikai szerepet, bár az elcsúszás miatt kialakuló egyszálú DNS-fragmentumok lehetőséget teremte- nek a másik egyszálú DNS behatolására, és így ezeken a helyeken a *crossing over* sokkal na- gyobb valószínűséggel következhet be. Ilyen jelenségekről már korábban is jelentek meg közlemények (Nikaido és mts., 1981; Stringer, 1982; Hentschel, 1982). A funkció hiányára vonatkozó megállapítását Tautz (1993) később módosította azzal az óvatos megfogalmazás- sal, hogy ezek a motívumok nem valamilyen szelekciós folyamat során keletkeztek, de „... nem zárható ki, hogy egyes esetekben hatással lehetnek bizonyos folyamatokra”.

Ma már világossá vált, hogy mikroszatellit szekvenciák eloszlása nem egyenletes a genomon belül (La Rota és mts., 2005; Sharopova, 2008). A néhány növényfaj teljes genom-

jára kiterjedő ismereteink lehetővé teszik a mikroszatellit régiók hatékony keresését, más technikákkal ugyanakkor egy-egy motívum jelenléte és a specifikus géncsoportok expressziójában bekövetkező változás közötti összefüggés kutatható. Ezeknek köszönhetően kiderült, hogy a mikroszatellitek preferáltan a gének határoló régióiban, illetve géneken belül helyezkednek el (Fujimori és mts., 2003; Morgante és mts., 2002). Egyre több bizonyítékot találnak arra, hogy ezek a funkcionálisan semlegesnek hitt DNS-szakaszok egyes esetekben jól definiálható szerepet játszanak a génregulációban (Ellegren, 2004; Li és mts., 2004). Már néhány éve ismert, hogy a mikroszatellitek hosszúságának instabilitása kapcsolatban van egyes humán neurodegeneratív betegségekkel, olyanokkal, mint például a Huntington-szindróma (The Huntington Disease Collaborative Research Group, 1993), vagy több típusú daganatos megbetegedéssel (Gangwal és mts., 2008; Popat és mts., 2005).

A mikroszatellitek növényi rendszerekben betöltött funkciójára vonatkozóan Sharopova (2008) közölt új eredményeket, amelyek az *Arabidopsis* és rizs genom elemzéséből származnak. Tanulmányából az derül ki, hogy az *Arabidopsis*-ban vizsgált 28 255 mikroszatellit szekvenciának 80%-a kapcsolatban van a génekkel. Ez főleg akkor érdekes, ha figyelembe vesszük, hogy a gének adta DNS-szakaszok hossza megközelítőleg az egész genom 10%-át teszi ki. Az ismert vagy feltételezett 27 158 *Arabidopsis* génnek több mint 44%-a tartalmaz SSR szekvenciákat a génen belül, ezek közül 40%-ban egynél több SSR régió található. Az SSR szekvenciák jelenlétére és a gének expressziójára vonatkozó együttes vizsgálat alapján feltételezhető, hogy a mikroszatellitek a növényi gének százainak expresszióját befolyásolhatják. Ennek egyik oka abban keresendő, hogy már korábban kimutatták, hogy mikroszatellit régiók közreműködésével alakul ki a DNS összetett másodlagos struktúrák sora (Tóth és mts., 2000). Ezzel hatással vannak az egyes gének transzkripciójának intenzitására. Ezen információk alapján várható, hogy a közeljövőben a nemesítési programok nemcsak markerezési céllal tudják alkalmazni ezeket az elemeket, hanem segítségükkel a genetikai szabályozási folyamatok is befolyásolhatóvá válnak.

### **2.10.1 Mikroszatellitek a növényi genomokban**

A mikroszatellitek növényi genom markerezésére, térképezésére való alkalmassága néhány jellegzetes tulajdonságuknak köszönhető. A mikroszatellitek kodominánsok, így teljes információt nyújtanak a vizsgált lókusztól az alléljairól. Nagy az allélváltozékonyság a populáción belül, a mikroszatellit lókusztól heterozigótásági indexe nagyon magas. Öröklődésük egyszerű mendeli szabályok szerint történik és így könnyen alkalmazhatók kapcsoltsági csoportok

elemzésére (Gupta és mts., 1996). Rendkívüli variabilitásuk és gyakoriságuk a növényi genomokban sok szerző által bizonyított (Weber, 1990; Condit és Hubbell, 1991; Gupta, és mts., 1996; Morgante és mts., 2002). Jelenleg a növényi genomok elemzésére az egyik legalkalmasabb markernek tekinthetők (Gupta és Varshney, 2000). Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a növényi és az állati genomokban található mikroszatellit nukleotid-összetétele nem mindig megegyező (Lagercrantz és mts., 1993, Morgante és mts., 2002). Növényeknél az AA/TT; AT/TA és CT/GA motívumok leggyakoribbak. Ez a csoport a növényi mikroszatellit 75%-át teszi ki. Az állatoknál gyakori GT/CA motívum ritkán fordul elő a növényeknél (Lagercrantz és mts., 1993). Szójagenom esetében megállapítás nyert, hogy a humán genomban igen gyakori CA/GT motívum csak kevés – max. 9 – ismétlődésként fordult elő. Az ennél hosszabb CA/GT repetitív szekvenciák ritkák voltak. Ennél a növényfajnál is elterjedtebb volt és változékony az AT/TA mikroszatellit kategória. Bell és Ecker (1994) *Arabidopsis* esetében szintén arról számoltak be, hogy a GT/CA motívum ritka, az AT/TA viszont gyakran fordult elő.

A növényi mikroszatellit markerek egyik alapvető tulajdonsága, hogy az ismétlődő egységek száma tekintetében rendkívül polimorfak úgy a fajok, mint az egyedek között (Akkaya és mts., 1992; Saghai-Marooif és mts., 1994; Yang és mts., 1994). A várható polimorfizmus egyenesen arányos az ismétlődő egységek számával (Weber, 1990; Yang és mts., 1994).

A mikroszatellit régiók általános jellemzésénél nem hagyható ki az ismétlődő szekvencia-sorozat pontossága alapján történő osztályozás. Ebből a szempontból elsőként Weber (1990) alkalmazta a *perfekt*, *imperfekt* és *compound repeat* mikroszatellit szekvencia elnevezéseket. Leírásának megfelelően *perfekt* mikroszatellit szekvencia pontosan ismételi egy adott egységet, míg az *imperfekt* szekvenciákba beépül egy vagy több, az alapegységhez nem tartozó nukleotid. A *compound repeat*-ek esetében egy adott mikroszatellit szekvenciába beépül egy másik, más nukleotidösszetételű mikroszatellit szakasz. Ennek az osztályozásnak korántsem tisztán rendszerezési okai voltak. Már Weber (1990) is kiemelte, hogy az ismétlődő egységek számával párhuzamosan, tehát az egyre hosszabb mikroszatellit esetén nő a lókusztartalom információértéke, azaz több allél keletkezése várható, de a megfigyelések szerint ez csak a *perfekt* szekvenciákra volt igaz maradéktalanul. Az azonos ismétlődési számú *imperfekt* szekvencia információértéke lényegesen kisebb volt. Hasonló következtetésre jutottak Orti és mts. (1997) egy rákfaj (*Limulus polyphemus*) polimorfizmusát vizsgálva. Eredményeik szerint

a filogenetikai tanulmányokban, csak a *perfekt* szekvenciák variabilitását célszerű figyelembe venni. Almeida és Penha-Gonçalves (2004) néhány gerinces és nem gerinces faj mikroszatellitjeit elemezve megállapították, hogy a *perfekt* ismétlődések megtartása a gerincesek egyik kései evolúciós jelenségének tekinthető. Ebben a megfogalmazásban automatikusan felmerül a mikroszatellit régióra ható szelekció szükségessége is, és ami ezzel együtt jár, a mikroszatellit szekvenciák funkciója a genom működésében. A korábban leírtaknak megfelelően mára már több olyan szerep merült fel, amelyre a szelekció hatása érvényesülhet. Ezek közül kiemelkedik a crossing over gyakoriságának módosítása a DNS konformációjának befolyásolásán keresztül, illetve a gének expressziójának befolyásolása (Tóth és mts., 2000; Li, 2004; Sharopova, 2008).

### **2.10.2 A mikroszatellit evolúciója**

A korábban említett, repetitív szekvenciákat jellemző nagy mutációs ráta és a javítómechanizmus interakciója, mint a mikroszatellit ismétlődő szekvencia számát meghatározó két fő tényező (Levinson és Gutman, 1987b; Hentschel, 1982; Strand és mts., 1993) csak a keletkezési és fennmaradási mechanizmusokat írja le, és nem ad magyarázatot a mikroszatellit régiók keletkezésére és az evolúciós trendekre – ha vannak –, amelyek formálják ezeket a szakaszokat a genomban.

Az első kérdés, amely pontosabb választ követelne, arra vonatkozik, hogyan keletkeznek az ismétlődések. A kérdés azért merül fel, mert a DNS-replikáció során fellépő, az ismétlődések számát befolyásoló *frameshift* mutációk valószínűsége csak a már meglévő mikroszatellit régiókban növekszik meg. Jelenleg azt az elméletet tartják elfogadottnak, mely szerint a mikroszatellit régió kialakulásához szükség van egy „*proto-mikrosatellit*re”, amely véletlenszerűen képződik (Levinson és Gutman, 1987a). Nem egyértelmű, hogy létezik-e egy minimum ismétlődési szám, amelynél már a DNS-polimeráz megcsúszására (ún. DNS *slippage* mechanizmus) nagy valószínűséggel sor kerül. A „küszöbérték” elmélet szerint bizonyítottan szükség van egy valamekkora ismétlődési számra (Rose és Falush, 1998). Az élesztőnél tapasztaltaknak megfelelően ugyanakkor már minimális, tehát két ismétlésből álló repetitív szekvencia is kiválthatja a DNS-polimeráz megcsúszását (Pupko és Graur, 1999).

A másik alapvető kérdés a meglévő mikroszatellit hosszváltozásának tendenciájára vonatkozik. Elméletileg a szabálytalan (aszimmetrikus) replikáció egyidejűleg növeli és csökkenti az ismétlődések számát (Schlötterer és mts., 1991). Ennek az elvnek megfelelően egy azonos ütemű rövidülési és hossznövekedési tendenciát kellene észlelni a mikroszatellit

között. A tények viszont azt mutatják, hogy az ismétlés mértéke nem éri el az extrém értéket. Ez az egyik bizonyítéka annak, hogy a szelekció szempontjából létezik valamilyen optimális mérettartomány, amelyet „érdemes” fenntartani az evolúció során (Bowcock és mts., 1994; Garza és mts., 1995). Az élesztővel végzett kísérletekkel kimutatták, hogy a rövid és hosszú szekvenciák mutációinak eredménye más-más tendenciát mutat. Míg a rövid szekvenciák frameshift mutációi általában hosszabb szekvenciákat hoztak létre, a hosszú szekvenciák alapvetően rövidültek a DNS *slippage* következtében (Wierdl és mts., 1997). Mindez arra utal, hogy egy meghatározott mérettartomány fenntartása magában a létrehozási mechanizmusban rejlik, és anélkül is egyensúlyban tartható, hogy létezne valamilyen ezt befolyásoló szelekciós nyomás (Schlötterer, 1998; Schlötterer, 2000).

Ismert, hogy léteznek az egyes taxonokra jellemzően ismétlődő szekvenciák. Így például az állati genomokban GT, vagy a növényeknél az AT ismétlődő motívumok. Ennek a helyzetnek a kialakulása a jelenleg legvalószínűbb magyarázat szerint nem egy evolúciós tendencia, hanem a DNS javító mechanizmus egy jellegzetességének a következménye. A DNS javító mechanizmus eltérő hatékonysággal távolítja el a nem komplementer bázisok egymás mellé kerülésével keletkező ún. *mismatch* szakaszok más-más bázis-összetételű nukleotidjait. Ez azt jelenti, hogy valamilyen típusú ismétlődésnél – pl. AT – keletkező replikációs elcsúszás, gyakrabban vezet a mikroszatellit méretváltozásához, mint egy más típus esetében. A javító mechanizmusnak ez a szelektív pontatlansága a különböző organizmusoknál más-más ismétlődéseknél jelentkezik (Modrich és Lahue, 1996; Marra és Schär, 1999).

Egészen más megvilágításba helyezte a mikroszatellitek evolúcióját az a sor felfedezés, amelynek köszönhetően bebizonyosodott, hogy a genom ezen részei aktív szerepet játszanak a génszabályozásban. Ennek egyik tipikus példája az egyes emberi betegségek kialakulása, azok lefolyása, és a poli-trinuklotid ismétlődés régióinak expanziója között fellépő korreláció (Rubinsztein, 1999). Ezekben és az ehhez hasonló esetekben az adott típusú mikroszatellitek elterjedése nemcsak a kialakító mechanizmuson és a driften alapuló, neutrális szelekció eredője, hanem a funkcióval keresztül ható, szelekciós nyomás eredménye is. A mikroszatellit régiók genetikai instabilitása és a funkcióval való összekapcsolása komoly fitness növekedést eredményezhet például azoknak a patogén mikroorganizmusoknak, amelyeknek virulenciagénjei ismétlődő szekvenciákat tartalmaznak (Metzgar és mts., 2001; Lindsedt és mts., 2007).

## 2.10.3 A mikroszatellit polimorfizmus kutatása *Prunus* fajoknál

### 2.10.3.1 Primerfejlesztés

A mikroszatellitek korszakának kezdete a *Prunus* fajoknál pontos dátumhoz, és egy adott közleményhez kötődik. Cipriani és mts. 1999-ben tették közzé az őszbarackra és néhány egyéb kertészeti fajra tervezett, 17 UDP jelzésű SSR-primereket. Kihhasználva a mikroszatellit szekvenciák határoló régióinak konzervativizmusát a rokon fajokban, ezeket más *Prunus* fajokon és az almán is tesztelték. Eredményeik azt mutatták, hogy 10 primerpár alkalmas volt az amplifikációra. Ezek megfelelően működtek a *P. domestica*, *P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. dulcis*, *P. persica* var. *leavis*, *P. avium* és *P. cerasus* fajokban. Három primer alkalmasnak bizonyult a *Malus domestica* SSR-markerek amplifikációjára is. Megjegyzem, hogy alma esetében már két évvel korábban megtörtént az első SSR-primerek kifejlesztése (Guilford és mts., 1997).

Cipriani és munkatársainak közleménye lökészerű fejlődést eredményezett a mikroszatellitek kutatásában a *Prunus* nemzetségben belül. Már a következő évben ugyanaz a kutatóműhely újabb primereket mutatott be (Testolin és mts., 2000). Ebben a közleményben már nemcsak a primer fejlesztésre koncentráltak, hanem az új lókuszok segítségével 50 őszibarack- és nektarinfajtát teszteltek. Az újonnan kifejlesztett primerek alkalmasak voltak a fajták döntő többségének elkülönítésére, bár az egyes, genetikailag nagyon közel álló fajtáknál, mint például a 'Compact Redhaven' és 'Redhaven', azonosságot tapasztaltak. Emellett sor került néhány tisztázatlan eredetű fajtánál a fajta származásának pontosítására. Ezzel a cikkel gyakorlatilag elindítottak egy sor későbbi kutatást ebben a témakörben.

Az Udinei kutatók eredményei nem maradtak visszhang nélkül a tengerentúlon. Még ugyanabban az évben Sosinski és mts. (2000) közzé tették az őszibarack genomi és cDNS szekvenciái alapján kifejlesztett saját primer-készletüket. Az olasz kutatócsoporttól eltérően nem az AC/GT és AG/CT ismétlődésű mikroszatellit régiókat azonosították, hanem a CT/GA, CA/GT valamint egy AGG/TCC poli-trinukleotidot.

A *Prunusok* területén zajló markerezési kutatások felgyorsítását jelzi, hogy továbbra is ugyanabban az évben egy nemzetközi kongresszuson (International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture) bemutatták annak a kutatásnak az eredményeit, ahol összehasonlították az AFLP és SSR markerek alkalmazhatóságát 100 őszibarackfajta polimorfizmusának vizsgálatánál. Ezzel a publikációval a



spanyol tudományos műhelyek is bekapcsolódtak az SSR polimorfizmus kutatásába. Maga a publikáció egy évvel később jelent meg (Aranzana és mts. 2001a)

2001-ben már körvonalazódnak az SSR-markerezés fő kutatási körvonalai a *Prunus* nemzetségben. Serrano és mts. (2002a) az SSR-primerek nemzetségen belüli használhatóságát kiaknázva 25 mandulaalanyt azonosítanak őszibarack primerekkel történt analízis alapján. Eredményeikről egy konferencián számolnak be, később teljes terjedelemben, a konferenciakiadványától függetlenül, külön cikkben is megjelenik ugyanezen munkájuk (Serrano, 2002b). 2001-ben Davisben (USA) került sor az V. Nemzetközi Őszibarack Szimpóziumra. Itt már több előadás foglalkozott az SSR-polimorfizmus őszibarack-kutatásban történő felhasználásával, melyekből később számos tudományos közlemény is született. Badenes és mts. (2002) a Valencia (Spanyolország) környéki őszibarack tájfajtákat vizsgálták, és annak ellenére, hogy kevésbé változékonny genotípusokról van szó, sikeresen elkülönítették a különböző termőtájakon termesztett fajtákat. Először itt számolnak be *Prunusok* esetében az SSR-markerek és a nemesítés szempontjából fontos pomológiai tulajdonságok összekapcsolásáról. Scorza és mts. (2002) kimutatták, hogy a pchgms1 jelzésű primerpár alkalmas az oszlopos növekedésű genotípusok, valamint a meghatározott színű és húskeménységű fenotípust mutató genotípusok szelektálására. A konferencia egyik legjelentősebb közleményében Abbott és mts. (2002) beszámolnak a genomikai kutatások megkezdéséről, amelyeket egy széles nemzetközi kooperációban terveznek kivitelezni. A konzorcium célja az őszibarack genomját modellként használni a *Rosacea* család genomikai kutatására. A konzorcium munkájának legutóbbi eredményeiről Shulaev és mts. (2008) számoltak be.

Mára számos primer fejlesztése történt a *Prunus* nemzetségben belül. A fejlesztések többsége őszibarack genomi vagy cDNS könyvtárak alapján történt, de ezenkívül több primert terveztek a cseresznye, kajsziszi és mandula genomok alapján. A mikroszatellitnek a nemzetségben belül több fajnál történő sikeres felhasználása általánosnak tekinthető. Nem ritka a más nemzetségben való alkalmazás sem. A primerek tervezésének új irányát jelzi, hogy már megjelentek olyan közlemények is, amelyek a teljes *Rosaceae* családban megfelelően működő primerkészletek kifejlesztését tűzték ki a kutatás céljának (Nishitani és mts., 2007). E szerzők munkájának különlegessége, hogy a hosszú repetitív szekvenciákat (tri- és hexanukleotid) tartalmazó mikrosatellit régiókat kutatták. Az újonnan létrehozott primereket kezdetben főleg a polimorfizmus megállapítására és a fajták elkülönítésére használták különböző *Prunus* fajoknál. Egy részüknél viszont konkrétan megfogalmazott, egyéb célok is szerepet játszottak.

Az első ilyen primerkészletnek tekinthető a korábban említett Scorza és mts. (2002) által tervezett primerkészlet. Ide sorolható a Wang és mts. (2002) őszibarack BAC könyvtárból AFLP technika közbeiktatásával kidolgozott SSR-primerkészlet, amelyeket az őszibarackfák növekedési típusainak nyomon követése céljából valamint a nematóderezisztencia markerezésére terveztek. A *Prunus* nemzetségben történő primerfejlesztéseken belül csak két munkacsoport beszámolt be szilvaprimerek kidolgozásáról. Hagen és mts., (2004a) valamint Decroocq és mts. (2004). Az utóbbi team a hexaploid szilva cDNS alapján, és eddig egyedi módon, kloroplasztisz cpDNS templátra terveztek mononukleotid ismétlődéseket felszaporító primereket. Az újonnan fejlesztett primerkészlettel sikerült korrigálni néhány csacsaki szilva fajta feltételezett eredetét. E módszer követve Ohta és mts. (2005), diploid szilva kloroplasztisz cpDNS-ére tervezték a primerkészletüket. Tíz tervezett primer közül hét mononukleotidos ismétlődésű szakaszokat ismert fel. Segítségükkel lehetséges volt 17 *Prunus* faj megkülönböztetése.

## **2.10.4 Mikroszatellitek alkalmazása a *Prunus* nemzetségben**

### **2.10.4.1 Ószibarack**

Az SSR-régiók biztosította variabilitást minden *Prunus* fajnál felhasználták a fajták azonosítására illetve fajták, fajok filogenetikai elemzésére. Ószibarack esetében is megoldható feladatnak számít a fajtaazonosítás SSR-allélokkal (Testolin és mts., 2000; Ahmad és mts., 2004a). A faj fajtáinak szűk genetikai bázisa és a világban elterjedt hasonló fajtakörök miatt a kutatók figyelme sokszor és jellemzően a tájfajtákon, egy-egy körzetben termesztett populációkon belüli diverzitás vizsgálatára összpontosult. Így születtek azok a tanulmányok, amelyek SSR-allélokkal a spanyol (Wünsch és mts., 2006; Bouhadida és mts., 2007) és a szicíliai (Marchese és mts., 2006) tájfajtákat elemezték, illetve a Japánban elterjedt kínai eredetű őszibarack klónok polimorfizmusát és azok pontos származását kutatták (Mase és mts., 2007). MingLiang és mts. (2004) hét genetikailag közel álló *Prunus* faj (*P. amygdalus*, *P. persica* subsp. *ferganensis*, *P. persica*, *P. kansuensis*, *P. mira*, *P. davidiana* és *P. persica* subsp. *potanini*) SSR elemzésének eredményeit közlik. A legnagyobb mértékű azonosságot a *P. persica* subsp. *ferganensis* és *P. persica* között tapasztalták. Ehhez hasonló fokú rokonságot a *P. persica* subsp. *potanini* és *P. kansuensis* között mutattak ki.

### **2.10.4.2 Cseresznye, meggy**

A *Cerasus* fajok SSR-polimorfizmusát többen leírták (Downey és Iezzoni, 2000; Cantini és mts., 2001; Wünsch és Hormaza, 2002a; Clarke és mts., 2004; Clarke és Tobutt,

2003; Schueler és mts., 2003; Struss és mts., 2003). E nemzetség esetében más jellegű vizsgálatot végeztek Pairon és Jacquemart (2005), akik a mikroszatellitek alkalmazását kutatták a ploidszint követésére.

#### **2.10.4.3 Mandula**

A mandula genetikailag változatos és kevésbé ismert nemesítési alapanyagai sokat ígérő kutatási területet jelentenek, ami már a korábban bemutatott primerfejlesztéseken is jól kivehető. Sánchez-Pérez és mts. (2006a) valamint Martínez-Gómez és Gradziel (2002) hangsúlyozták az SSR-polimorfizmus vizsgálatának fontosságát a nemesítési alapanyagok jellemzése terén. Az alapanyagok nagy genetikai diverzitását mutatták ki a kínai munkacsoportok által közölt adatok. Ez a változékonyság jellemző a kínai fajtákra (Xie és mts., 2006), de még inkább látványos a kínai fajták mediterrán fajtákkal való összehasonlítása, mely esetben a két régió fajtái határozottan elkülönültek a dendrogramon (Xu és mts., 2004). Ehhez hasonló nagy variabilitásról számolnak be Amirbakhtiara és mts. (2007) az iráni mandulafajták valamint három vad faj (*P. communis*, *P. orientalis* and *P. scoparia*) elemzésekor.

#### **2.10.4.4 Szilva**

A szilva mint gyümölcs taxonómiai és így genetikai szempontból is nagyon változatos képet mutat. Az SSR-markerezési folyamat valószínűleg a következő években gyorsul majd fe, amire jó lehetőséget kínálnak a hazánkban termesztett hexaploid szilvára (*P. domestica*) és a diploid japánszilvára (*P. salicina*) tervezett SSR-primer készletek (Decroocq és mts., 2004; Ohta és mts., 2005). A faj SSR-markerekkel történő kutatásáról beszámolt Ahmad és mts. (2004b), akik a diploid szilvákon kívül a pluot hibridek genomját is jellemezték a mikroszatellit régiók változékonyságának vizsgálatával.

Az amerikai szilvák bonyolult taxonómiai rendszerének molekuláris hátterébe próbáltak betekintést nyerni Rohrer és mts. (2004). Vizsgálataikból az derült ki, hogy a sokféle hibridizációra képes amerikai szilvák azonosítására nem minden esetben volt elegendő a kísérletben használt 15 SSR-primerpár és az általuk kimutatott, lókuszonkénti átlagos 12,4 allélt eredményező polimorfizmus.

#### **2.10.4.5 Alanyok**

A *Prunus* alanyok kutatása genetikailag egy külön kategóriát képvisel. Az ebben a témakörben megjelent publikációk egy része az alanyok egyedi azonosítását tárgyalja (Serrano, és mts., 2002a; Serrano és mts., 2002b; Wunsch és mts., 2004; Bouhaida és mts., 2004;).

Nemcsak az alany kutatásánál, hanem általában a nemesítés során is felhasználhatók azok az információk, amelyeket Daorden és mts. (2006) közöltek a keresztezésekből, illetve hibaként történő öntermékenyítésből származó fiatal magoncok elkülönítését lehetővé tevő SSR markerzésről. Mindig fontos téma az alanyok esetében a fonálféreggel szembeni rezisztencia. A rezisztens genotípusok azonosítása több évet vesz igénybe, de ennek kiváltására Verde és mts. (2007) ígéretes eredményeket közöltek, melyben a rezisztenciaregiókat azonosító markerek fejlesztéséről és a régiók térképezéséről számoltak be.

#### **2.10.4.6 Kajszi**

Ahogy ez az előzőekben leírtakból is kiderült, a mikroszatellit régiók polimorfizmusának vizsgálata a *Prunus* nemzetségben a Cipriani és mts. (1999) által közzétett, őszibarackra tervezett primerek használatával kezdődött el. A kajszi-barack esetében viszonylag hamar kifejlesztésre kerültek a faj genomja alapján készült speciális kajszi-primerek. A kajszi genomi DNS-könyvtára alapján Lopes és mts. (2002) 21, Messina és mts. (2004) 99 mikroszatellit régiót azonosítottak. Decroocq és mts. (2003) 10 EST SSR szekvenciát találtak meg a kajszi leveléből nyert cDNS könyvtárban. Hagen és mts. (2004b) összesen 24 primerszekvenciát tettek közzé, ebből 13 genomi, 8 a gyümölcsből nyert cDNS, 3 pedig level cDNS könyvtárból származott.

Elsőként Hormaza (2002) jellemezte kajszi-fajták SSR-polimorfizmusát. Negyven nyolc kajszi-fajtát vizsgált más *Prunus* fajokra kidolgozott primerkészletekkel. Ezek közül 31 megfelelő amplifikációt biztosított. Ez egyben a mikroszatellit régiók konzervatívizmusára utalt, ami alól a kajszi-barack sem képez kivételt a *Prunus* nemzetségben. Ez az eredmény jelentős mértékben növelte a további vizsgálatok megvalósíthatóságának realitását. Az alkalmazott módszer hatékonyságára utal, hogy az összes fajtát sikerült egyedileg azonosítani a 20 lókuszból detektált 82 allél alapján.

A mikroszatellit polimorfizmus kutatása és felhasználása a kajszi-ban a többi markerhez hasonló jellegzetes témaköröket érint. Ezek közül az egyik elsőként megjelent kérdés, amelyet e technikával oldottak meg a fajták azonosítása volt, és a módszer felhasználhatóságának vizsgálata nemesítési célokra. Sánchez-Pérez és mts. (2006b) spanyol és néhány külföldi fajtát azonosítottak SSR-markerekkel. Tanulmányuk kiterjedt a vizsgált fajták néhány termesztési szempontból fontos tulajdonság (virágzási idő, érési idő, termékenyülési viszonyok, gyümölcsszín és -tömeg stb.) jellemzésére is. Összehasonlítva az SSR-variabilitás és a morfológiai bélyegek alapján nyert klasztereket, nem találtak közöttük szignifikáns kapcsola-

tot. Graetz (2006) az aszalásra alkalmas fajták előállítását célzó ausztrál nemesítési program során SSR-markerekkel jellemezte a nemesítési alapanyagokat. A nemesítési alapanyagok SSR-variabilitáson alapuló jellemzését Olaszországban is elvégezték (Guerriero és mts., 2006). Ilyen céllal dolgoztak japán kutatók is, akik *P. mume* esetében szintén a korábban kidolgozott *Prunus* SSR-markereket alkalmazták a fajták jellemzésére és eredetük megállapítására. Krichen és mts. (2006) 54 tuniszi tájfajtát vizsgáltak. Huszonhat primer alkalmazásával összesen 103 allélt detektáltak. A gyakorlati alkalmazhatóság céljából kiemelték azt a legjobb 6 primerpárt, amelyik elegendő polimorfizmust biztosított az összes fajta azonosításához.

A mikroszatellit variabilitásán alapuló és inkább a nemesítéshez kötődő kutatásokon kívül, a kajszibarack esetében hangsúlyossá vált a faj elterjedésének kutatása molekuláris markerekkel. Ebben az esetben az SSR-markerek bizonyultak a legalkalmasabbnak. Ezen munkák jellegzetessége, hogy általában sok, de ami a leglényegesebb, a különböző földrajzi csoportokhoz tartozó, gondosan összeállított mintapopulációval dolgoznak. Ezen kutatások egyik elindítója a BCE Genetika és Növénynemesítés Tanszék volt. Az első SSR marker-elemzést, amelyben a magyar fajtákat is bevontuk már 2001-ben a nemzetközi kajsziszi szimpóziumon mutattuk be (*XII International Symposium on Apricot Culture and Decline, Avignon, September 10–14, 2001*). A konferencia előadásainak teljes szövege jóval később jelent meg nyomtatásban (Romero és mts., 2006). A kutatás bebizonyította, hogy az SSR-markerezés alkalmas a kajsziszi történelmi terjeszkedésének követésére. Zhebentyayeva és mts. (2004) az általában elterjedt fajtákon kívül jellemezni tudták a kajszibarack elsődleges és másodlagos géncentrumából származó genotípusokat is. A kajsziszi elsődleges és másodlagos géncentrumából származó minták az elvárhatónál kisebb genetikai diverzitást mutattak csoportjukon belül. Ennek ellenére a klaszteranalízis eredményei hűen tükrözték a korábban Vavilov (1951) és Kosztina (1969) által leírt kajsziszi kultúrevolúciós útvonalakat. Az európai, ezen belül a magyar fajták a legnagyobb azonosságot az iráni-kaukázusi fajtákkal mutatták. Zhebentyayeva és munkatársai (2004) feltételezték, hogy az európai fajták genetikai konstitúciója viszonylag kis számú iráni-kaukázusi és kopet-dag-i genotípusra vezethető vissza.

Hasonló tanulmányokat végzett egy magyar, osztrák és portugál kutatókból álló nemzetközi csoport is. Százötven különböző eredetű fajta vizsgálatával, a korábban leírt eredményeket megerősítették, de a kísérletben alkalmazott más fajtaösszetétel miatt, lényeges megfigyeléseket tettek az amerikai fajtákat illetően is. Vélelmezték, hogy az amerikai fajták, és ezen belül a PPV rezisztencianemesítés fő donorai nem tisztán európai eredetű fajták. Az

SSR-polimorfizmus alátámasztotta a korábbi feltételezést, amely szerint ezek a fajták ázsiai eredetű génekkel is rendelkeznek. A genetikai távolságok alapján sikerült meghatározni a fajták közötti rokonsági köröket. Az európai fajták külön ágra kerültek a dendrogramon. Néhány fajta esetében a korábban is feltételezett szinonim nevek létezése megerősítést nyert. Ezek közé tartozott pl. ‘Szegedi mamut’ és a ‘Ceglédi óriás’ fajta (Maghuly és mts., 2005; Pedryc és mts., 2006).

Az előbbi megállapítások egybevágnak a Zhebentyayeva és mts. (2008) által tapasztaltakkal. Munkájukban az AFLP- és SSR-markerekkel bebizonyították, hogy az amerikai fajtákban létező PPV rezisztencia forrása valószínűleg az Amerikába bekerült észak-kínai eredetű genotípusokból származik. Bizonyítás nyert, hogy a ‘Stark Early Orange’, ‘Goldrich’, és ‘Harlayne’ fajták genotípusaira jellemző PPV rezisztencia génforrása vagy ugyanarra, vagy genetikailag nagyon közeli ősrre vezethető vissza.

A fent említett filogenetikai tanulmányokat kiegészíthetik a jövőben azok a kínai kutatások, melyek célja a vad *P. armeniaca* populációinak genetikai összetételének elemzése. A He és mts. (2007) által közölt eredmények szerint ezek a populációk még megtartották a genetikai variabilitásukat, bár veszélyeztetve vannak úgy a kultúrfajták genetikai inváziójától, mint az emberi környezet átalakító tevékenységétől. E kutatások sokkal árnyaltabb képet képesek adni a faj elsődleges géncentrumáról, amely – a rendelkezésre álló ismeretek alapján – jelenleg távolról sem tekinthető egységesnek.

Figyelemre méltó publikáció foglalkozik a SSR-elemzés alkalmazhatóságával az alanykutatásban. Arbeloa és mts. (2006) a Myrabolán (*P. cerasifera*) és a ‘Moniqui’ kajszibarack fajta keresztezéséből származó utódpopulációk jellemzésére alkalmazták az SSR-technikát. A nehezen végrehajtható keresztezésből származó 278 magoncról kiderült, hogy 74%-uk nem hibrid eredetű.

A markerkutatás legújabb, jelenlegi állomásának tekinthető az integrált genetikai térképekre való beiktatásuk. A *Prunus* nemzetségben a korábban említett Abbott és mts. (2002) indítványozták az ilyen irányú munkát egy nemzetközi konzorcium szervezésével. A térképezés eredményeit többek között bemutatták Dirlwanger és mts. (2004), illetve legutóbb Jung és mts. (2008). A kajszibarack markereit Dondini és mts. (2007) beillesztették az eddig összeállított, integrált *Prunus* genetikai térképre.

A térképezés lehetősége jelentős befolyással van az adott fajok kutatására, a markerezés céljaira. Az ide szánt markerek kifejlesztése is sokszor céltudatosan történik és nem csak a genom véletlenszerű régióit érinti. Ebbe a kategóriába tartozik Vilanova és mts. (2006b) által kialakított markerkészlet, amelynek célja alapvetően a kajszi 1. kromoszómájának markerekkel való lefedése volt. Ennek oka a feltételezhetően ebben a régióban található PPV rezisztenciáért felelős szakasz pontos markerezése volt. Hasonló megfontolásból, bár kevésbé véletlenszerűen Sicard és mts. (2007) kihasználva a *Prunus* térképezés eddigi eredményeit primerket terveztek a kajszi barack potenciális rezisztenciagénjeire (*candidate resistance genes*). Olyan, feltételezhető rezisztenciagéneket választottak, amelyek közelében megtalálható a PPV rezisztencia fő génje.

### 3 A KUTATÁS KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEI

A dolgozatban bemutatott kutatások közvetlen céljainak megfogalmazása előtt célszerű megemlíteni azokat az előzményeket, amelyek befolyásolták az itt tárgyalt témák kialakulását. A nyolcvanas években a Genetika és Növénynevelés Tanszéken folytatott kutatás jelentős részét a gyakorlati nevelés, fajta-előállítás jelentette. Ez a tevékenység továbbra is a munkánk gerincét képezi. Eredményességét jelzi három államilag elismert kajszifajta és három elismerésre bejelentett fajtajelölt. A kajszibarack a maga változatosságával, jól definiált géncentrumokkal, széles genetikai spektrumú vad populációkkal, a domesztikációs folyamat elején álló helyi fajtákkal és ugyanakkor a szigorú szelekció eredményeként létrejött modern fajtákkal kitűnő kutatási alanyként ígérkezett a polimorfizmus vizsgálatára. A kilencvenes évek elején először vált lehetővé a nevelést támogató, molekuláris szintű elemzése a kajszifajta genotípusoknak. E munka kezdeteként mi is a világszerte elsőként hozzáférhetővé vált technikával, a különböző izoenzimok polimorfizmusának vizsgálatával foglalkoztunk, ami alapvetően módszertani kísérleteket jelentett. Ezt követte a PCR-készülék elterjedésével lehetővé váló DNS-alapú módszerek kipróbálása. Mindez első megközelítésben világszerte, és így a mi laborunkban is a RAPD-módszerrel való variabilitás-kutatást jelentette. Ennek a munkának eredményeként sikerült kiválasztani azt a primerkészletet, amely segítségével azonosítani tudtuk a Magyarországon termesztett fajták többségét. Ezek a munkák Magyarországon több éven keresztül egyedülálló törekvést jelentettek a molekuláris szemléletű gyümölcsnevelés és a nevelési alapanyagok körültekintő, genetikai kapcsolatokat feltáró értékelése felé. A RAPD-analízissel kapott előzetes eredményeink bemutatásával egy időben, I.J. Hormaza 2000-ben egy ISHS konferencián jelentette be az első kajszifajta SSR-markerezés eredményeit. Az új technika egy sor – a dolgozatban részletesen kifejtett – előnnyel rendelkezett. Még ebben az évben kialakítottunk a spanyol kutatókkal egy informális együttműködést. Kutatásunk célja az új markerezési eljárásban rejlő lehetőségek tesztelése volt a mediterrán és közép-európai fajták felhasználásával. Az egyhónapos spanyolországi tanulmányutam során a Valenciai Mezőgazdasági Kutató Intézetben (IVIA - *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias*) elvégeztük az első, mindössze 20 kajszifajta mikroszatellit régióit tesztelő kísérlet-sorozatot, amelynek eredményeit, 2001-ben mutattuk be a Nemzetközi Kajszifajta Szimpóziumon, Avignonban. Ez volt a második közlemény a világon, amely a kajszifajta mikroszatellit kutatásáról számolt be. Ezt követően, már gazdagabb fajtakörrel és új primerkészletekkel, ugyanezzel a valenciai munkacsoporttal elvégeztük azt a kísérletsorozatot, amelynek eredményeit 2003-

---



ban a *Genome* című, nemzetközi szakfolyóiratban tettük közzé. A mikroszatellit kutatás következő munkái a bécsi *BOKU* egyetemmel kialakított közös projekt keretén belül zajlottak. E közben sikerült olyan mértékben fejleszteni a tanszék laboratóriumi hátterét, megszerezni és saját laboratóriumunkban is hozzáférhetővé tenni a munkához nélkülözhetetlen tudást, hogy lehetővé vált a kutatás egy részét közvetlenül tanszékünkön elvégezni. Az osztrák-magyar projekt eredményei 2005-ben, az akkor újonnan induló *Tree Genetics & Genomes* (Springer) című szakfolyóiratban kerültek közlésre, mely lapot azzal a szándékkal hívták életre, hogy a tudományterületen nagy tekintélynek örvendő *Theoretical and Applied Genetics* fás kultúrák irányába szakosodott társfolyóirata legyen. Az utóbbi három év alatt sikerült a tanszéken azokat a technikai körülményeket létrehozni, és mindenekelőtt kialakítani azt a fiatal kutatókból, PhD hallgatókból és egyetemi hallgatókból álló, folyamatos önképzésre képes, ambiciózus és erősen motivált munkacsoportot, amely segítségével a molekuláris markerezés mára már rutinszerű tevékenységgé vált. Ennek köszönhetően jelenleg széles nemzetközi kooperációban török, iráni és kínai kutatókkal együtt készítjük elő a hazai kajszi fajták történelmi előszobáját képező közép-ázsiai és iráni-kaukázusi, valamint az eredeti génforrásból származó kínai kajszi génállományok beható genetikai elemzését. Ennek a munkának egyik előtanulmányaként, elvégeztük néhány új SSR-primer tesztelését, amely munka eredményei jelenleg megjelenésre várnak a *Scientia Horticulturae* (Elsevier) folyóiratban. A dolgozat mikroszatellit-kutatásra vonatkozó fejezetei a fent említett, három cikk kutatási anyagát mutatják be.

A mikroszatellit-markerezéssel párhuzamosan felmerült a kajszi termékenyülési viszonyainak kutatása molekuláris szinten. E téma szükségessége és fontossága az újabb nemesítésű, értékes, de önmeddő fajták számának növekedésével együtt egyre határozottabban jelenik meg a kajszikutatás aktuális trendjei között. A fentiekén kívül más tényezők is nagyban hozzájárultak e téma kiválasztásához. Ezek közé tartoznak a néhány magyar fajta régóta tudott önmeddőségével kapcsolatos ismeretek, továbbá, hogy a kajszi esetében a kölcsönös ivari összeférhetetlenséget a világon első ízben magyar kutatók írták le, és ezek a genotípusok a hazai fajtaszortimentben hozzáférhetőek voltak. A rendelkezésünkre álló kooperációs lehetőségeknek és az irodalomban fellelhető módszereknek megfelelően a jelenség kutatása eleinte fehérjeszinten zajlott. Később a tanszéken a molekuláris kutatás terén felhalmozódott tapasztalatok lehetővé tették a DNS-szintű megközelítést. Ezen kutatások haszna egyrészt az elméleti tudás gyarapításában rejlik, de az új fajták *S*-genotípusainak leírása, az egymás termékenyítésére kölcsönösen képtelen fajtacsoportok meghatározása egyértelmű gyakorlati jelentőséggel bír.

### **3.1 A kutatási munka a következő tudományos célok köré szerveződött:**

1. Az őszibarack és kajszibarack genomjára tervezett SSR-primerkészletek alkalmazhatóságának összehasonlítása a kajszibarack genetikai diverzitásának vizsgálatában.
2. A kajszibarack eltérő ökoföldrajzi fajtacsoportok genetikai kapcsolatának követése az SSR-polimorfizmus elemzéséből nyert eredményekkel.
3. A kajszibarack G1 kapcsoltságú csoportjában kimutatott SSR-változékonyság összehasonlítása a teljes genomra kiterjedő mikroszatellit régiók variabilitásával.
4. A közép-európai fajták genetikai variabilitásának egybevetése a fő fajtacsoportok polimorfizmusával.
5. A kajszibarack termékenyülési viszonyait meghatározó S-lókusz vizsgálatát lehetővé tevő módszerek fejlesztése, illetve kidolgozása.
6. Az öntermékenyülő genotípusok korai szelekcióját lehetővé tevő molekuláris marker kidolgozása kajszibarackon.
7. Új S-allélok azonosítása és a termesztett fajták S-genotípusának meghatározása.

## **4 ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **4.1 Növényanyag**

A vizsgált fajták és hibridek a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék szigetcsépi ültetvényéből, az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet tor-dasi génbankjából, a Mendel Egyetem (Csehország) lednicei ültetvényéből, a Ceglédi Gyümölcsstermesztési Kutató-Fejlesztő Intézet génbankjából, a Kecskeméti Főiskola gyümölcsültetvényéből, egy boldogkőváraljai ültetvényből, a BOKU Egyetem (Bécs) génbankjából, illetve Laimburgból és Ferraraból (Olaszország) származnak (4. táblázat).

### **4.2 Szabadföldi tesztkeresztezők**

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

#### **4.2.1 Szabadföldi 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 virággal beporoztuk. A megporzott bibéket minden esetben megszámtuk. A kötődött gyümölcsök arányát hetente ellenőriztük, véglegesen a 8. héten, illetve az adott fajta teljes érési idejében számtuk meg. A vizsgált fajták és hibridek: ‘Krimszkij Medunec’, ‘Morden 604’, ‘Korai piros’, ‘Harmat’, ‘Korai zamatos’ és ‘NJA-8’.

4. táblázat. A dolgozatban vizsgált fajták és hibridek származása, a mintagyűjtés helyszíne, a fajták pedigreje és termékenyülési fenotípusa

Genotípus	Származás	Génbank	Pedigré	Termékenyülés
1) AIA 0-10	Ol.	F.	Magonc	Öntermékenyülő
2) AIA 0-28	Ol.	F.	Magonc	Öntermékenyülő
3) AIA 0-68	Ol.	F.	Magonc	Öntermékenyülő
4) Albena	Mo.	T.	Szilisztrensza kajszija × Krasznoscokij	?
5) Aurora	USA	Sz.	RR17-62 × NJA-13	Önmeddő
6) Ananasznij cjurpinszkij	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
7) Andornaktályai magyar kajszii	Mo.	T.	Magyar kajszii tájszelekciója	Öntermékenyülő
8) Antonio Errani	Ol.	Bk.	Reale d'Imola szabadmegporzású magonca	?
9) Arvam aramat	K-Á.	L.	Ismeretlen	?
10) Bachinger	K-E.	B.	Magonc	Öntermékenyülő
11) Bayoto	USA	L.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
12) Bebeco	Gro.	Sz.	Véletlen magonc	Öntermékenyülő
13) Beixan Heda Huang	K.	L.	Ismeretlen	?
14) Beliana	Mar.	L.	Canino × Hamidi	Öntermékenyülő
15) Bergeron	Fro.	T.	Véletlen magonc (1920)	Öntermékenyülő
16) Bhart	USA	B.	Lasgerdi Mashhadi × NJA2	Önmeddő
17) B Liaoning	K.	L.	Ismeretlen	?
18) Borjana	Mol.	T.	Magyar kajszii × Jerevani	?
19) Borsi-féle kései rózsza	Mo.	T.	Ismeretlen, Kecskemét	Öntermékenyülő
20) Bronzovij	Ukr.	Sz.	Khurmai × Krasznij partizan	?
21) Budapest	Mo.	Sz.	Nancy × (Acme, Magyar kajszii, Kései rózsza)	Öntermékenyülő
22) Bukurija	Mol.	Sz.	Salah szabadbeporzású magonca	Önmeddő
23) Csacsanszko zlato	Szb.	T.	Magyar kajszii tájszelekciója	Öntermékenyülő
24) Callatis	Rom.	Sz.	(Tarzii de Bukuresti × Ananas) × (Luizet ×	Öntermékenyülő

			Umberto)		
25)	Ceglédi arany	Mo.	Sz.	Rózsabarack C.1668 × Ceglédi óriás	Öntermékenyülő
26)	Ceglédi bíborkajszi	Mo.	Sz.	Véletlen magonc	Öntermékenyülő
27)	Ceglédi kedves	Mo.	T.	Ceglédi óriás szabadbeporzású magonca	Öntermékenyülő
28)	Ceglédi óriás	Mo.	T.	Tájszelekció, Izsák (1953)	Önmeddő
29)	Ceglédi Piroska	Mo.	Sz.	Ceglédi óriás × Magyar kajszi C. 1789	Önmeddő
30)	Chuang Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
31)	CLR 8	K.	L.	Ismeretlen	?
32)	Crvena ungarska	Mac.	T.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
33)	CIV 1.	Oo.	F.	Magonc	?
34)	Comandor	Rom.	Sz.	Marculesti 17/52 × Marculesti 43/1	Öntermékenyülő
35)	Chersonszkij 1469	Ukr.	Sz.	Magyar kajszi klón	Öntermékenyülő
36)	Da Bai Xing	K.	L.	Ismeretlen	?
37)	Da Sie Xing	K.	L.	Ismeretlen	?
38)	Darunek malahojeva	Ukr.	T.	Ismeretlen	?
39)	Dionis	Ukr.	Sz.	Salah × Kok-psár	?
40)	Dolgocsukna	K-E.	Sz.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
41)	Dr. Mascle	Fro.	B.	Ismeretlen	?
42)	Effekt	Ukr.	Sz.	Krupnolodnij szabadbeporzású magonca	?
43)	Fesztival	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	?
44)	Goldrich	USA	Sz.	Sunglo × Perfection	Önmeddő
45)	Gönci magyar kajszi	Mo.	T.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
46)	Gulkin	P.	B.	Magonc	?
47)	Harcot	Kan.	T.	(Geneva × Narmata) × Morden 604 × NJA1 (Perfection × Phelps) (1977)	Önmeddő
48)	Hargrand	Kan.	T.	NJA1 (Perfection × Phelps) × V51092 (1981)	Önmeddő
49)	Harmat	Mo.	Sz.	Salah szabadbeporzású magonca	?
50)	Hunza	P.	B.	Magonc	?
51)	In Bei Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
52)	Juan Sin	K.	L.	Ismeretlen	?

53)	Junszkij	Mol.	Sz.	Salah szabadmegporzású magonca	Önmeddő
54)	Kalasek	Cso.	L.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
55)	Karim-Abad	P.	B.	Magonc	?
56)	Karola	Szlo.	L.	Koloboucka × Velkopavlovicka	Öntermékenyülő
57)	Kecskemét	Mo.	T.	Véletlen magonc	Öntermékenyülő
58)	Kecs-psár	Üzb.	Sz.	Helyi fajta	?
59)	Khurmai	K-Á.	L.	Ismeretlen	Önmeddő
60)	Konzervnij pozdnij	Ukr.	Sz.	Véletlen magonc	Öntermékenyülő
61)	Korai piros	Mo.	Sz.	Ismeretlen eredetű tájfajta	?
62)	Korai zamatos	Mo.	Sz.	Jubilar szabadbeporzású magonca	?
63)	Kâszna ungarska	Bul.	T.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
64)	Kletnice	Cso.	L.	Helyi szelektált klón	Öntermékenyülő
65)	Klosterneuburger	Au.	B.	Ismeretlen magonc	Öntermékenyülő
66)	Konkurencia	Ukr.	L.	Effekt × Priuszadebnij rannij	?
67)	Krasznoscokij	Ukr.	Sz.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
68)	Krimszkij Amur	Ukr.	T.	Mulla sadik × Udarnik	?
69)	Krimszkij Medunec	Ukr.	Sz.	Sztyepniak (Oranzsevo krasznij × Krasznoscsekij) × Salah	Önmeddő
70)	LE-3276	K.	L.	Ismeretlen	?
71)	Liaoning B	K.	L.	Ismeretlen	?
72)	Ligeti óriás	Mo.	T.	Tájszelektáció, Dózsamajor (1959)	Önmeddő
73)	Litoral	Rom.	Sz.	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)	?
74)	Luizet	Fro.	F.	Ismeretlen magonc	Öntermékenyülő
75)	Magyar kajszi C.235	Mo.	T.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
76)	Mamaia	Rom.	Sz.	(Ananas × Ananas) × (Tarzii de Bukuresti × Ananas)	Öntermékenyülő
77)	Mandulakajszi	Mo.	T.	Ismeretlen (1954)	?
78)	Marculesti 5/5 (szin. Callatis)	Rom.	Sz.	(Tarzii de Bukuresti × Ananas) × (Luizet × Umberto)	?
79)	Mari de Cenad	Rom.	Sz.	Ismeretlen eredetű helyi fajta	Öntermékenyülő

80)	Mai Che Sin	K.	L.	Ismeretlen	?
81)	Marille	K-E.	B.	Ismeretlen magonc	Öntermékenyülő
82)	Modesto	USA	Sz.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
83)	Morden 604	Kan.	Sz.	<i>P. mandshurica</i> (Scout × McClure)	?
84)	Nagygyümölcsű m. kajszi	Mo.	T.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
85)	Narjadnij	Ukr.	Sz.	Oranzsevo Krasznij × Shirazkij	?
86)	Ninfa	Ol.	B.	Ouaroy × Tyrinthos	?
87)	Nyikitszkij	Ukr.	Sz.	Krasznoscsokij szelektált klónja	Öntermékenyülő
88)	NJA-8	USA	Sz.	Ismeretlen	?
89)	Nyujtó Ferenc emléke	Mo.	C.	Kései rózsza C.320 × Ceglédi bíborkajszi	Öntermékenyülő
90)	Paksi magyar kajszi	Mo.	T.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
91)	Pannónia	Mo.	Sz.	Magyar kajszi × Borsi-féle kései rózsza	Öntermékenyülő
92)	Paszinok	Ukr.	Sz.	Vinoszlivij × Salah	?
93)	Pieber (13, 15, 17)	K-E.	B.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
94)	Plumcot	USA	Sz.	<i>P. armeniaca</i> × <i>P. salicina</i>	Önmeddő
95)	Pisana	Ol.	Sz.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
96)	Polonaise	Fro.	Sz.	Véletlen magonc	?
97)	Priana	Fro.	F.	Canino × Hamidi	?
98)	Priboto	Fro.	L.	Goldrich mutációja	Önmeddő
99)	Priuszadebnij rannij	Ukr.	Sz.	Szamarkandszkij rannij × Krasznoscsokij	?
100)	<i>Prunus brigantica</i>	Fro.	B.	Ismeretlen	Önmeddő
101)	Rakovszky	Mo.	T.	Véletlen magonc, Kocsóc	Öntermékenyülő
102)	Rakvice	Cso.	L.	Ismeretlen	?
103)	Rana Dokucana	K-E.	L.	Ismeretlen	?
104)	Rosensteiner	K-E.	B.	Magonc	?
105)	Roxana	Afg.	Kecs.	Ismeretlen	?
106)	Rózsakajszi C.1406	Mo.	T.	Tájszelekció, Nagykőrös	Öntermékenyülő
107)	Sabinovska	Szlo.	L.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
108)	San Caestre	Ol.	F.	Ismeretlen	Öntermékenyülő
109)	Selena	Rom.	T.	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)	Öntermékenyülő

110)	Sha Jin Hong	K.	L.	Ismeretlen	?
111)	Sirena	Rom.	Sz.	(Ananas × Ananas) × (Luizet × Umberto)	Öntermékenyülő
112)	S Liaoning	K.	L.	Ismeretlen	?
113)	Sulmona	Rom.	Sz.	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)	?
114)	Sunglo	USA	L.	Ismeretlen (1942)	Önmeddő
115)	Szamarkandszkij rannij	K-Á.	Sz.	Krasznoscokij × Majszkaja szkoroszpelka	Önmeddő
116)	Szilisztrenka kompotna	K-E.	Sz.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
117)	Szkopszka krupna	K-E.	Sz.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
118)	Tilton	USA	B.	Ismeretlen	?
119)	Tomis	Rom.	T.	Ismeretlen	?
120)	Toyuda	USA	L.	Goldrich leszármazottja	Öntermékenyülő
121)	T-8	Mo.	Sz.	Salah szabadmegporzású magonca	?
122)	Uzsgorod	Ukr.	T.	Ismeretlen	?
123)	Yang Ji Yuang	K.	L.	Ismeretlen	?
124)	Veecot	USA	Sz.	Reliable szabadmegporzású magonca	Önmeddő
125)	Velkij	Ukr.	L.	Ismeretlen	?
126)	Velkopavlovicka	Cso.	L.	Magyar kajszi szelektált klónja	Öntermékenyülő
127)	Venus	Rom.	Sz.	(Umberto × Ananas) × (Luizet × Umberto)	?
128)	Vnuk partizana	Ukr.	Sz.	Krasznij partizan szabadmegporzású magonca	?
129)	Vognic	Ukr.	L.	Ismeretlen	?
130)	Voszki	Ukr.	Sz.	Sateni szabadbeporzású magonca	?
131)	Zaposzdojje	Ukr.	Sz.	Ismeretlen	?
132)	Zard	Üzb.	Sz.	Zardalju szabad megporzású magonca, VIR intézet	?

**Au.:** Ausztria; **Afg.:** Afganisztán; **Bul.:** Bulgária; **Cso.:** Csehország; **Fro.:** Franciaország; **Gro.:** Görögország; **Kan.:** Kanada; **K.:** Kína; **K-Á.:** Közép-Ázsia; **K-E.:** Kelet-Európa; **Mac.:** Macedónia; **Mar.:** Marokkó; **Mo.:** Magyarország; **Mol.:** Moldávia; **Ol.:** Olaszország; **P.:** Pakisztán; **Rom.:** Románia; **Szb.:** Szerbia; **USA:** Amerikai Egyesült Államok; **Ukr.:** Ukrajna; **Üzb.:** Üzbegisztán

**B.:** Bécs; **Bk.:** Boldogkőváralja; **C.:** Cegléd; **F.:** Ferrera; **Kecs.:** Kecskemét; **L.:** Lednice; **Sz.:** Szigetcsép; **T.:** Tordas



## 4.2.2 Szabadföldi kompatibilitási vizsgálat

A NEpHGE és PCR-technikákkal kapott eredmények igazolására irányított keresztezést végeztünk néhány fajtakombináció esetében (5. táblázat). Az eltérő virágzási idők miatt, több esetben a pollen kinyeréséhez zárt bimbós állapotú ágakat vízbe állítva egy napig szoba-hőmérsékleten hajtattunk. A beporzott virágokat megszámloltuk, az ágakat a 6. héten hálóval izoláltuk, a gyümöleskötődési 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.

5. táblázat. Fajtakombinációk a kompatibilitási vizsgálatokhoz

	♀	♂
1.	Ceglédi óriás	Ceglédi arany
2.	Ceglédi arany	Ceglédi óriás
3.	Gönci magyar kajszai	Ceglédi óriás
4.	Korai piros	Ceglédi óriás
5.	Ceglédi arany	Korai piros
6.	Konzervnij pozdnij	Bergeron
7.	Bergeron	Konzervnij pozdnij

## 4.3 Az S-ribonukleáz izoenzimek vizsgálata

### 4.3.1 Minta-előkészítés az izoelektromos fókuszáláshoz

A portokok felnyílását közvetlenül megelőzően mintegy 40, pollentől mentes bibeszálát gyűjtöttünk fajtánként. 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.

### **4.3.2 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.

### **4.3.3 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) ráztattuk, 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.

## 4.4 DNS-alapú vizsgálatok

### 4.4.1 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).

### 4.4.2 SSR-analízis

A mikroszatellit régiók amplifikálásához használt primereket a 6. táblázat tartalmazza. 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 MgCl<sub>2</sub>, 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.

### 4.4.3 Statisztikai analízis

A vizsgálatokból nyert adatok alapján a következő paramétereket számoltuk ki: lókuszonkénti allélszám, várható heterozigótaság ( $H_e = 1 - \sum p_i^2$ , ahol  $p_i$  az  $i$ . allél gyakorisága) (Nei, 1973), megfigyelt heterozigótaság ( $H_o$ , a heterozigóta genotípusok száma osztva az összes genotípus számával), fixációs index ( $F = 1 - H_o/H_e$ ) (Wright, 1965) és a *power of discrimination* ( $PD = 1 - \sum g_i^2$ , ahol  $g_i$  az  $i$ . genotípus gyakorisága) (Kloosterman és mts., 1993). Az UPGMA klaszteranalízist az NTSYS programmal végeztük (Rohlf, 1993). A dendrogramot a TREEVIEW programmal készítettük (Page, 1996).

6. táblázat. Az SSR-vizsgálatok során felhasznált primerek

Kísérlet	primer	amplifikált régió mérete (bp)	forrás
1. kísérlet	UDP96-003	-	Cipriani és mts., 1999
	UDP96-005 <sup>a</sup>	80-260	Cipriani és mts., 1999
	UDP96-010	80-110	Cipriani és mts., 1999
	UDP96-013	-	Cipriani és mts., 1999
	UDP96-018	250-270	Cipriani és mts., 1999
	UDP98-406	90-110	Cipriani és mts., 1999
	UDP98-408	210-230	Cipriani és mts., 1999
	UDP98-409	140-180	Cipriani és mts., 1999
	98-021	-	Testolin és mts., 2000
	98-022	-	Testolin és mts., 2000
	98-410	120-140	Testolin és mts., 2000
	98-411 <sup>b</sup>	110-180	Testolin és mts., 2000
	CPPCT-5	120-140	Aranzana és mts., 2002
	CPPCT-6	190-210	Aranzana és mts., 2002
	CPPCT-9	-	Aranzana és mts., 2002
	CPPCT-13	170-190	Aranzana és mts., 2002
2. kísérlet	SsrPaCITA7	186–224	Lopes és mts., 2002
	ssrPaCITA10	142–212	Lopes és mts., 2002
	ssrPaCITA19	98–148	Lopes és mts., 2002
	ssrPaCITA23	112–157	Lopes és mts., 2002
	ssrPaCITA27	224–266	Lopes és mts., 2002
	UDAp-407	118–162	Messina és mts., 2004
	UDAp-410	116–146	Messina és mts., 2004
	UDAp-414	150–214	Messina és mts., 2004
	UDAp-415	139–143	Messina és mts., 2004
	UDAp-420	154–262	Messina és mts., 2004
3. kísérlet	aprigms1	236	Vilanova és mts., 2006
	aprigms2	178	Vilanova és mts., 2006
	aprigms3	259	Vilanova és mts., 2006
	aprigms6	199	Vilanova és mts., 2006
	aprigms8	193	Vilanova és mts., 2006
	aprigms10	275	Vilanova és mts., 2006
	aprigms11	170	Vilanova és mts., 2006
	aprigms16	229	Vilanova és mts., 2006

#### **4.4.4 S-PCR-analízis**

##### **4.4.4.1 Az S-RN-áz gén PCR-vizsgálata**

Az S-RN-áz allélok amplifikációjához használt konszenzus primerek szekvenciáit a 7. táblázat mutatja. Az SRc-F (fluoreszcens jelölés: JOE) és SRc-R, EM-PC1consRD az első intronrégió amplifikációjához (Romero és mts., 2004; Ortega és mts., 2005), míg az EM-PC2consFD és EM-PC3consRD primerpárt a második intronrégió felszaporításához (Sutherland és mts., 2004) használtuk. A PCR-t a fent említett módon végeztük. 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.

##### **4.4.4.2 Az F-box gén PCR-vizsgálata**

Az F-box gén kódoló szakaszainak amplifikálásához konszenzus primereket terveztünk: AprSFB-F1, AprSFB-F2 és AprSFB-R (7. táblázat) a *P. armeniaca* SFB<sub>1</sub> (AY587563), SFB<sub>2</sub> (AY587562) és SFB<sub>4</sub> (AY587565) (Romero és mts., 2004) és *P. mume* SFB<sub>1</sub> (AB101440), SFB<sub>7</sub> (AB101441) (Yamane és mts., 2003), illetve SLF<sub>9</sub> (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 a korábban ismertetett adatokkal.

7. táblázat. Az S-PCR során felhasznált primerek nukleotidsorrendje

<b>primer</b>	<b>szekvencia 5'–3'</b>	<b>forrás</b>
<b>EM-PC1consRD</b>	GCCA(C/T)TGTTG(A/C)ACAAA(C/T)TGAA	Ortega és mts., 2005
<b>EM-PC2consFD</b>	TCACMATYCATGGCCTATGG	Sutherland és mts., 2004
<b>EM-PC3consRD</b>	AWSTRCCRTGYTTGTTCCATTC	Sutherland és mts., 2004
<b>EM-PC5consRD</b>	CAAATAACCACTTCATGTAACARC	Sutherland és mts., 2004
<b>SRc-F</b>	JOE-CTCGCTTTCCTTGTTCTTGC	Romero és mts., 2004
<b>SRc-R</b>	GGCCATTGTTGCACAAATTG	Vilanova és mts., 2005
<b>AprSFB-F1</b>	AAG AAW GAR AYY TTR RTC GAC AT	Saját tervezésű
<b>AprSFB-F2</b>	TCY CTY RTT CGR TTT MTK TG	Saját tervezésű
<b>AprSFB-R</b>	ATY GAG WAA AAC CAW RCT YTC	Saját tervezésű

#### **4.4.4.3 A PCR-termékek fragmentumhossz-analízise, klónozása, szekvenálása és a szekvenációk vizsgálata**

Az S-RN-áz első intronrégiót tartalmazó PCR-fragmentumok, illetve az amplifikált SSR-régiók 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-fragmentumainak tisztítását 1 %-os agaróz gélből QIAquick Gel Extraction Kittel (Qiagen) végeztük. Vizsgálatainkhoz a pGEM-T Easy Vector Systemet (Promega) használtuk.

A klónozott fragmentumokkal JM109 kompetens sejteket transzformáltunk. A plazmidokat Rapid Plasmid DNA Daily Mini-prep kittel (V-gene) izoláltuk. 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 homológvizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (Altschul és mts., 1990) használtuk. Az illesztéseket a CLUSTAL W (Higgins 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).

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 *S*-genotípus meghatározása ribonukleáz izoenzimek kimutatásával

Az *S*-ribonukleáz izoenzimeket 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 leg-tökéletesebb 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 (6. 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, jóllehet a harmadik sáv intenzitása mindkét fajtánál elmaradt a másik kettő sáv intenzitásától. Ezért ezeket nem *S*-specifikus izoenzimeknek tekintettük.

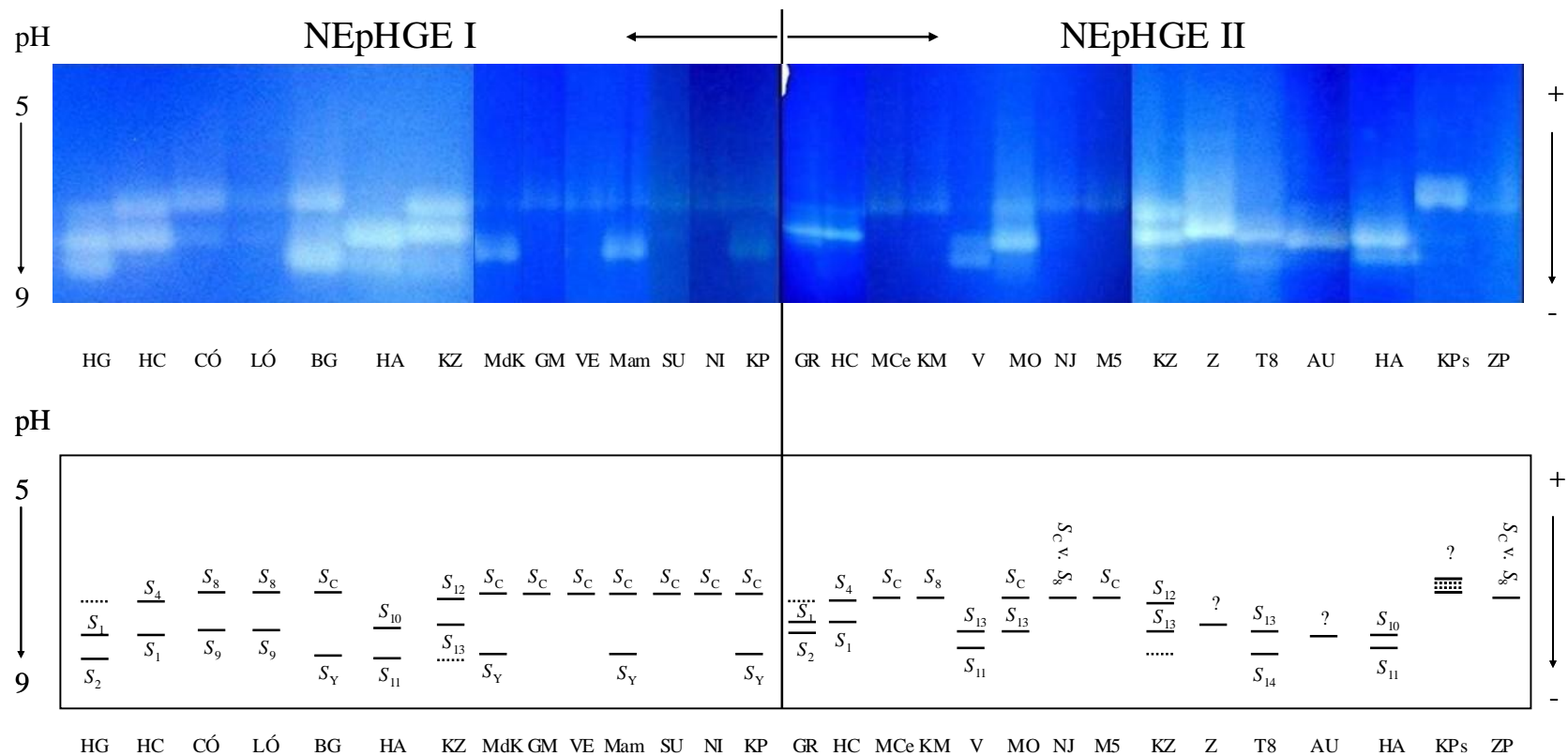
A korábban leírt *S*-RN-áz alléltermékeket az ismert genotípusú fajták zimogramja alapján azonosítottuk: az  $S_1S_4$  genotípusú 'Harcot' és az  $S_1S_2$  genotípusú 'Hargrand' (Burgos és mts., 1998) egy közös izoenzimet mutatott, amely valószínűleg a mindkét fajta által hordozott  $S_1$ -allélnak felel 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 ön-termékenyülő fajtából kimutatott  $S_C$ -RN-áz izoenzimet (Burgos és mts., 1998) a szintén ön-termékenyülő '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 'Krimszikij

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', 'Mandulakajszai', '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 izoenzimét ( $S_C$ ) detektáltunk.

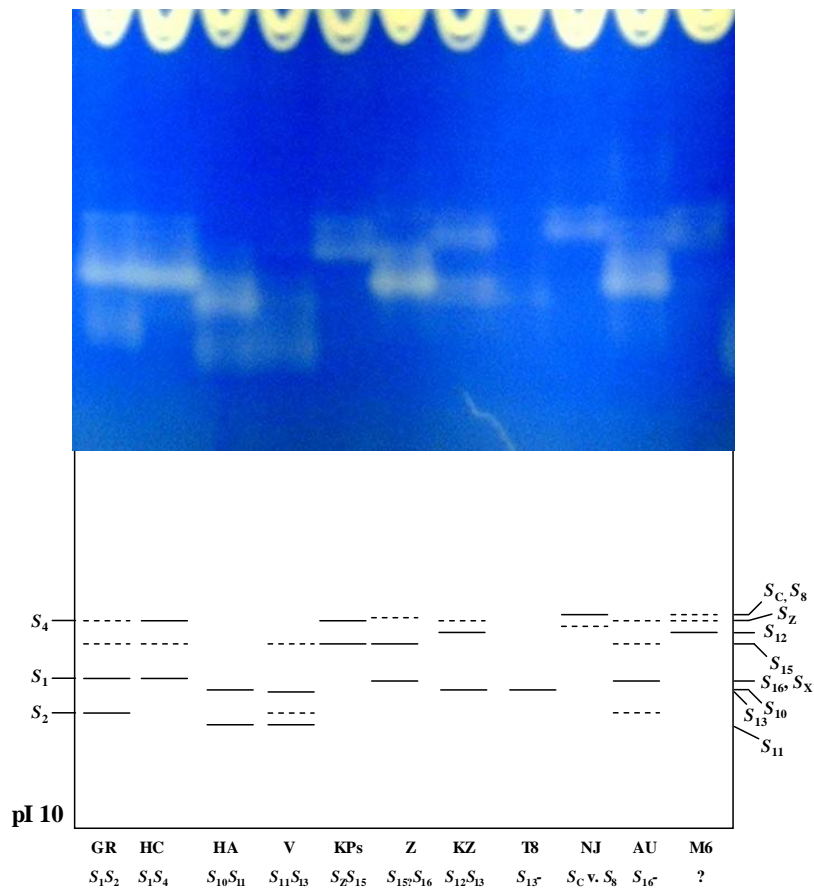
A NEpHGE-vizsgálat alapján a 'Harmat' és 'Korai zamatos' genotípusa  $S_{10}S_{11}$ , illetve  $S_{12}S_{13}$ -nak határozható meg. Az  $S_4$  és az  $S_{12}$ , illetve az  $S_{10}$  és az  $S_{13}$  vándorlási pozíciója csak kismértékben különbözött, de a fókuszálási paraméterek megváltoztatása (NEpHGE II, 11. 6. 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 ( $S_{14}$ ).





6. 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**: ‘Mandulakajszi’, **GM**: ‘Gönci magyar kajszi’, **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**: ‘Aurora’, **KPs**: ‘Kecs-psár’, **ZP**: ‘Zaposzdlje’. 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 'Aurora' egyetlen, nagy intenzitású RN-áz sávot mutatott, míg a 'Kecs- psár' több, diffúz sávot. A futtatási paraméterek további módosításával (NEpHGE III) azon- ban a 'Kecs-psár' izoenzimeit egyértelműen szétválasztották, genotípusa  $S_{15}S_Z$  (7. ábra). Az  $S_Z$ -RN- ázt az alkalmazott futtatási körülmények között az  $S_4$ -hez hasonló migrációs tulajdonság jel- lemzi, de azonosságuk nem egyértelmű. Ugyanígy kétséges a szemre azonos pozícióban meg- jelenő 'Kecs-psár'  $S_{15}$ - és a 'Zard'  $S_{15}$ -RN-áz allélok azonossága. Eredményeink alapján va- lószínűsíthető, hogy a 'Zard' szintén hordoz egy korábban nem azonosított allélt, az  $S_{16}$ -ot. Az 'Aurorá'-ban egyetlen, az  $S_1$ -re illetve az  $S_{16}$ -ra hasonlító izoenzimsáv jelent meg, amit ideig- lenesen  $S_X$ -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.



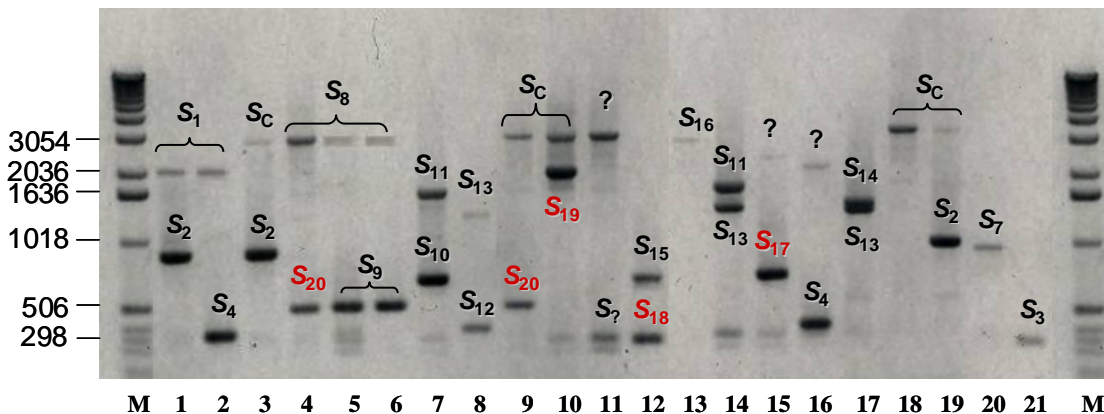
7. ábra. A NEpHGE III fókuszálási paraméterekkel kapott S-ribonukleáz izoenzim-mintázat.

**GR:** 'Goldrich', **HC:** 'Harcot', **HA:** 'Harmat', **V:** 'Voszki', **KPs:** 'Kecs-psár', **Z:** 'Zard', **KZ:** 'Korai zamatos', **T8:** T-8 hibrid, **NJ:** 'NJA-8', **AU:** 'Aurora', **M6:** 'Morden 604'.

## 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.

Sutherland és mts. (2004) 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 kajszifajtás S-allél ( $S_1$ - $S_7$ ;  $S_C$ ) mindegyikénél sikeres amplifikációt eredményezett. A primerpár alkalmazhatóságának tesztelésére tovább bővítettük az ismeretlen S-genotípusú, vizsgálandó fajták körét (8. ábra).

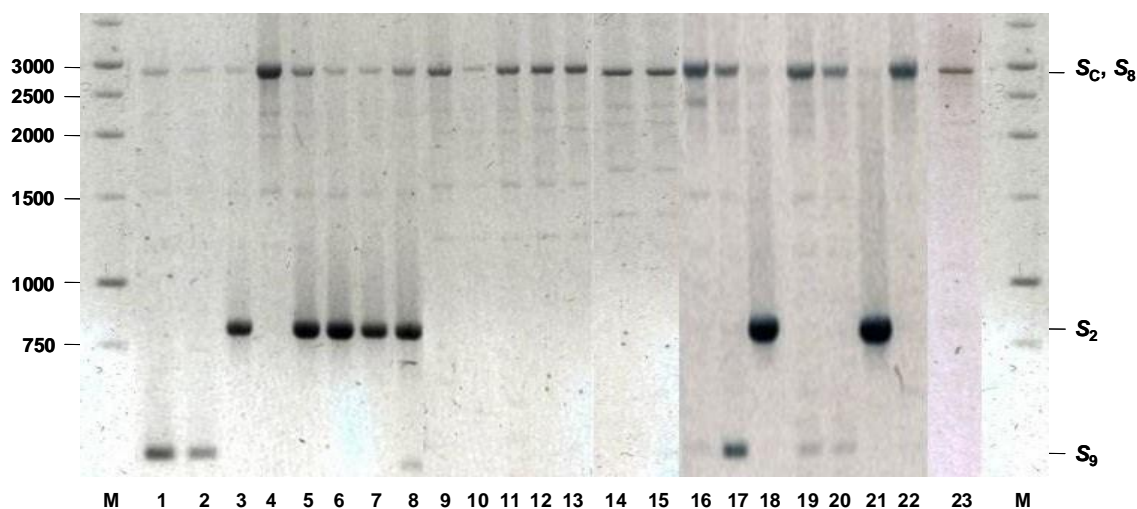


8. ábra. Kajszifajták EM jelű (EM-PC2consFD és EM-PC3consRD), a *Prunus* S-RN-áz gén második intronrégióját amplifikáló, konszenzus primerekkel végzett PCR-vizsgálatának eredménye. M: 1 kb DNS-marker, 1. 'Hargrand', 2. 'Harcot', 3. 'Bergeron', 4. 'Ceglédi Piroska', 5. 'Ceglédi óriás', 6. 'Ligeti óriás',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

Ezzel a primerpárral a fajták túlnyomó többségénél mindkét S-allél kimutatható volt. Továbbá 19 egyértelműen azonosítható allél bizonyult kimutathatónak és további, legkevesebb 4 gyengén amplifikálódott fragmentum. A 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.

tó 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 megerősíteni, hogy a 'Korai zamatos'  $S_{12}$ -allélja különbözik az  $S_4$ -alléltól, továbbá az  $S_{10}$  és az  $S_{13}$  különbözőségét, amit a NEpHGE-eredmények valószínűsítettek. A 'Morden 604' kanadai hibrid, melynek pedigrijében *P. mandshurica* is található, az  $S_1$ - és  $S_4$ -allélokhoz nagyon hasonló fragmentumméretű allélokat hordoz.

Kontrollként az  $S_1$ -,  $S_2$ -,  $S_4$ - és  $S_C$ -allélokat 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 (8. 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 'Aurora'-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. 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 eddigitől 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.



9. ábra. Kajszi fajták 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-markers, **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 magyar kajszi’, **12**. ‘Paksi magyar kajszi’, **13**. ‘Nagygyümölcsű magyar kajszi’, **14**. ‘Andornaktályai magyar kajszi’, **15**. ‘Kászna ungarska’, **16**. ‘Ceglédi kedves’, **17**. ‘Ceglédi arany’, **18**. ‘Rakovszky’, **19**. ‘Crvena ungarska’, **20**. ‘Venus’, **21**. ‘Budapest’, **22**. ‘NJÁ-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 kajszi fajta PCR-analízisét is elvégeztük (9. ábra), és az EM-primerek valamennyi esetben sikeres amplifikációt eredményeztek. E primerek az  $S_C$ -allélon kívül a ‘Hargrand’ ( $S_1S_2$ ), ‘Bergeron’, ‘Toyuda’ (8. ábra), továbbá a ‘Mandulakajszi’, ‘Roxana’, ‘Mamaia’, ‘Konzervnij pozdnij’, ‘Rakovszky’ és ‘Budapest’ (9. ábra) fajtákban egy másik, azonos méretű (kb. 900 bp hosszúságú) fragmentumot is felszaporítottak. 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. Öt 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’ (8. 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 translálódott fehérjében egy glutamin  $\rightarrow$  arginin aminosavcseréhez vezet, ezért a ‘Mandulakajszai’ ezen allélját  $S_{2m}$ -ként jelöljük.

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<sub>F</sub> forward primert (Vilanova és mts., 2005) JOE fluoreszcens festékkel jelöltük, így az amplifikált fragmentumok méretei automata szekvenátor használatával pontosan meghatározhatók. Az SRC<sub>F/R</sub> primerpár 29 fajta esetében kettő, 26 fajta esetében egy fragmentumot amplifikált (8. táblázat). Az  $S_8$ -allélt (‘Ceglédi óriás’, ‘Ceglédi Piroska’, ‘Krimszkij Medunec’ és ‘Ligeti óriás’) szintén 355 bp hosszú fragmentum jellemezte.

8. táblázat. Kajszifajták Vilanova és mts. (2005) által tervezett, fluoreszcens festékkel jelölt SRC<sub>F/R</sub> primerekkel felszaporított 1. intronrégiójának automata szekvenátorral meghatározott méretei (bp)

Ananasznij cjurpinszkij	355	–
Andornaktályai magyar kajszai	355	–
Antonio Errani	244	401
Aurora	401	412
Bayoto	332	355
Bergeron	332	355
Borsi-féle kései rózsza	355	–
Budapest	332	355
Csacsanszko zlato	355	–
Callatis	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 magyar kajszai	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 magyar kajszai	355	–
Ninfa	332	401
Nyikitszkij	355	–
NJA-8	355	–
Nyujtó Ferenc emléke	355	–
Paksi magyar kajszai	355	–
Pannónia	355	–

Pasinok	355	–
Pisana	355	–
Priboto	332	401
Rakovszky	332	355
Roxana	332	355
Rózsakajsi C.1406	355	–
Sirena	355	–
T-8	378	380
Toyuda	332	355
Venus	355	–
Voszki	306	378
Zaposzdojje	355	–
Zard	316	337

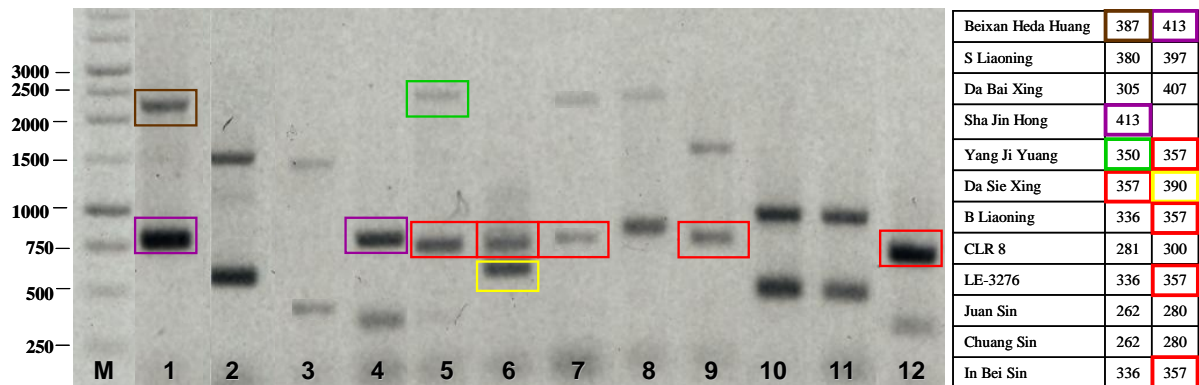
Az  $S_1$ -allélt hordozó 8 fajtában egy 401 bp hosszú PCR-termék volt jelen. Az  $S_2$ -allélt tartalmazó 16 fajtában ugyanakkor egy 332 bp hosszú szakasz jelent meg. Az  $S_9$ -allélt 203 bp ('Ceglédi arany', 'Ceglédi bíborkajszi', 'Ceglédi óriás' és 'Ligeti óriás'), az  $S_{10}$ -allélt 285 bp ('Harmat'), 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 ('Aurora'), 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 fragmentumméretek 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 (8. és 9. ábrák)  $S$ -genotípusát az 1. intronrégió vizsgálata tovább erősíti, sőt a 'Bayoto' nevű fajtával 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 kajszi 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 (10. 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.



10. ábra. Kínai kajszifajták 2. intronrégiójának PCR-analízise EM-PC2consFD és EM-PC3consRD primerekkel (balra), valamint az 1. intronrégió fragmentumhosszai SRC<sub>F/R</sub> 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<sub>C</sub>*- és az *S<sub>8</sub>*-allélok nem tudtuk egymástól megkülönböztetni, a két allél bármelyikét hordozó, ismeretlen termékenyülésű fajtáról e vizsgálatokkal nem dönthető el, hogy öntermékenyülő vagy önmeddő fenotípusú. Ahhoz, hogy az öntermékenyülés kimutatására megbízható molekuláris diagnosztikát sikerüljön kidolgozni, elkerülhetetlen volt az öntermékenyülést kialakító mutáció tisztázása.

### 5.3 Az öntermékenyülés molekuláris háttere

Eredményeink alapján az *S<sub>C</sub>*- és *S<sub>8</sub>*-allélok 2. intronrégióját azonos fragmentumméret (kb. 2800 bp) jellemezte (8. és 9. ábrák). Az *S<sub>C</sub>*- és *S<sub>8</sub>*-allélok 1. intronrégióját klónoztuk és DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. A két allél ezen szakaszának szekvenciája 99,5 %-ban azonosnak bizonyult. Az *S<sub>C</sub>*- és *S<sub>8</sub>*-RN-áz allélok kódoló régiójának összevetése érdekében a kinyílt virágok bibéiből cDNS-t szintetizáltunk, melyeket klónozást követően megszekvenáltunk. A ‘Pannónia’-ból származó *S<sub>C</sub>*- és a ‘Ceglédi óriás’-ból izolált *S<sub>8</sub>*-RN-áz nukleotidszekvenciája 99,5 %-ban azonos volt. A cDNS alapján következtetett

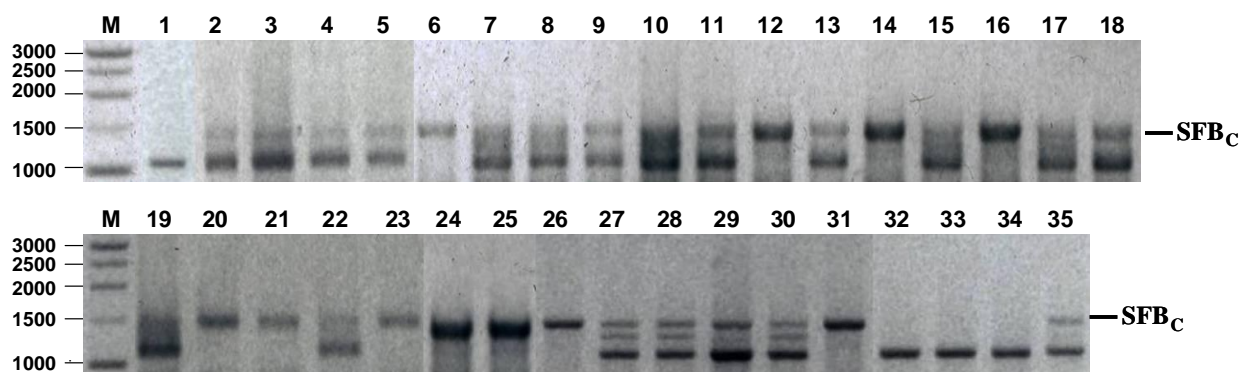
aminosavszekvenciák hipervariábilis régiója az  $S_8$ -, illetve a két különböző fajtaból izolált  $S_C$ -RN-ázok esetében teljesen azonos volt.

Mivel a bibekomponens  $S$ -RN-áz gén két allélja, az öntermékenyülésért felelős  $S_C$ , illetve egy inkompatibilitási allél, az  $S_8$ , azonosnak mutatkozott, feltételezhető volt, hogy az  $S_8$ -haplotípusú allél pollenkomponens, F-box génjében ( $SFB_8$ ) bekövetkezett mutáció hatására alakult ki az öntermékenyülésért felelős  $SFB_C$ -allél.

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  $SFB_8$ -allélok ('Ceglédi óriás') Apr $SFB$ -F1 és Apr $SFB$ -R primerekkel felszaporított szakaszát, továbbá az  $SFB_9$ -allél ('Ceglédi arany') Apr $SFB$ -F2 és Apr $SFB$ -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  $SFB_8$ -hoz képest. Ez az inszerció mutáció egy abnormális 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.

#### 5.4 F-box gén alapú $S$ -genotípus-meghatározás

Az Apr $SFB$ -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 ( $SFB_{1-20}$ ) 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 és termékenyülési fenotípusa sem volt meghatározható, hiszen egyaránt hordozhatta az  $S_8$ - (önmeddő) vagy  $S_C$ -RN-ázt (öntermékenyülő). Az Apr $SFB$ -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 (11. ábra), melyeket a korábbi vizsgálatainkkal nem sikerült jellemezni.



11. ábra. Kajszi fajták 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. 'Mandulakajsi', 5. 'Callatis', 6. 'Ananasznij cjurpinszkij', 7. 'Csacsanszko zlato', 8. 'Crvena ungarska', 9. 'Darunek malahojeva', 10. 'Effekt', 11. 'Krimszkij Amur', 12. 'Paszinok', 13. 'Pisana', 14. 'Sirena', 15. 'Kászna ungarska', 16. 'Nyujtó Ferenc emléke', 17. 'Paksi magyar kajsi', 18. 'Roxana', 19. 'Nyikitszkij', 20. 'NJA-8', 21. 'Sulmona', 22. 'Venus', 23. 'Zaposzdojje', 24. 'Rózsakajsi C.1406', 25. 'Ceglédi kedves', 26. 'Pannónia', 27. 'Magyar kajsi C. 235', 28. 'Andornaktályai magyar kajsi', 29. 'Rakovszky', 30. 'Nagygyümölcsű magyar kajsi', 31. 'Borsi-féle kései rózsza', 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 Magyar kajsi 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 kajszi fajták között az  $S_8$ -allél viszonylag gyakran fordult elő, a Magyar kajsi fajtakörön kívül csak két ukrán és egy olasz fajtából volt kimutatható.

9. táblázat. Néhány kajszi fajta 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
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 (9. táblázat). A Viti és mts. (1997) által megadott 5 % határérték alatti gyümölcskötődést tekintettük önmeddő genotípusnak. Az öntermékenyített ‘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 (8. ábra), az adott kombináció gyakorlatilag inkompatibilis lett volna.

A vizsgált fajták közül 14 önmeddő, 41 öntermékenyülő, ez utóbbiak közül 11 fajta homozigóta genotípusú ( $S_C S_C$ ). 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.

10. 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. (2004)

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 ( $S_C S_C$ ); Zaposz dolje ( $S_C S_C$ )	
	<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 C. ( $S_C S_{2m}$ ); <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> ( $S_C S_3$ ); <u>Rial Fino</u> ( $S_C S_6$ ); <u>Beliana</u> ( $S_C S_7$ );	
	Andornaktályai magyarkajsz C. ( $S_C S_8$ ); Csacsanszko zlato ( $S_C S_8$ ); Marculesti 5/5 ( $S_C S_8$ ); Crvena ungarska ( $S_C S_8$ ); Darunek malahojeva ( $S_C S_8$ ); Effekt ( $S_C S_8$ ); Gönci magyarkajsz C. ( $S_C S_8$ ); Kâszna ungarska ( $S_C S_8$ ); Krimszkij Amur ( $S_C S_8$ ); Magyarkajsz C. 235 ( $S_C S_8$ ); Nagygyümölcsű magyarkajsz C. ( $S_C S_8$ ); Nyikitszkij ( $S_C S_8$ ); Paksi magyarkajsz C. ( $S_C S_8$ ); Pisana ( $S_C S_8$ ); Venus ( $S_C S_8$ );	
	Ceglédi arany ( $S_C S_9$ ); Ceglédi bíborkajsz C. ( $S_C S_9$ ); Korai piros ( $S_C S_{20}$ ); Mari de Cenad ( $S_C S_{19}$ ); Modesto ( $S_C S_{13}$ );	
	Ceglédi Piroska ( $S_8 S_{20}$ ), Harmat ( $S_{10} S_{11}$ ); Kec-psár ( $S_{15} S_{18}$ ); Korai zamatos ( $S_{12} S_{13}$ ); <u>Moniquí</u> ( $S_2 S_6$ ); <u>Priana</u> ( $S_2 S_7$ ); <u>Sunglo</u> ( $S_2 S_3$ ); T-8 ( $S_{13} S_{14}$ ); Voszki ( $S_{11} S_{13}$ )	

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

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 <sup>c</sup>
Aurora	R1, R2	<i>S</i> <sub>17-</sub>	Önmeddő
Ananasznij cjurpinszkij	R1, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>C</sub>	Öntermékenyülő
Andornaktályai magyar kajszzi	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Antonio Errani	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>1</sub> <i>S</i> <sub>4</sub>	Önmeddő
Bayoto	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>2</sub>	Öntermékenyülő
Bergeron	N, R1, R2	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>2</sub>	Öntermékenyülő
Borsi-féle kései rózsza	R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>C</sub>	Öntermékenyülő
Budapest	R1, R2	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>2</sub>	Öntermékenyülő
Csacsanszko zlato	R1, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Callatis (szin. Marculesti 5/5)	N, R1, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Ceglédi arany	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>9</sub>	Öntermékenyülő
Ceglédi bíborkajszzi	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>9</sub>	Öntermékenyülő
Ceglédi kedves	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>C</sub>	Öntermékenyülő
Ceglédi óriás	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>8</sub> <i>S</i> <sub>9</sub>	Önmeddő
Ceglédi Piroska	R1, R2	<i>S</i> <sub>8</sub> <i>S</i> <sub>20</sub>	Önmeddő
Crvena ungarska	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Darunek malahojeva	R1, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Effekt	R1, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Gönci magyar kajszzi	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Harmat	N, R1, R2, Sz	<i>S</i> <sub>10</sub> <i>S</i> <sub>11</sub>	Önmeddő
Kecs-psár	N, R1, R2	<i>S</i> <sub>15</sub> <i>S</i> <sub>18</sub>	Önmeddő
Konzervnij pozdnij	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>2</sub>	Öntermékenyülő
Korai piros	R1, R2, Sz	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>20</sub>	Öntermékenyülő
Korai zamatos	N, R1, R2, Sz	<i>S</i> <sub>12</sub> <i>S</i> <sub>13</sub>	Önmeddő
Kászna ungarska	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Krimszkij Amur	R1, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Krimszkij Medunec	N, R1, FB, Sz	<i>S</i> <sub>8-</sub>	Önmeddő
Ligeti óriás	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>8</sub> <i>S</i> <sub>9</sub>	Önmeddő
Magyar kajszzi C. 235	FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Mamaia	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>2</sub>	Öntermékenyülő
Mandulakajszzi	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>2m</sub> <sup>b</sup>	Öntermékenyülő
Mari de Cenad	N, R1, R2	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>19</sub>	Öntermékenyülő
Modesto	N, R1	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>13</sub>	Öntermékenyülő
Morden 604	N, R1, R2, FB, Sz	<i>S</i> <sub>4-</sub>	Öntermékenyülő
Nagygyümölcsű magyar kajszzi	R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
Ninfa	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>1</sub> <i>S</i> <sub>2</sub>	Önmeddő
Nyikitszkij	N, R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő
NJA-8	N, R1, R2, FB, Sz	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>C</sub>	Öntermékenyülő
Nyujtó Ferenc emléke	R1, R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>C</sub>	Öntermékenyülő
Paksi magyar kajszzi	R2, FB	<i>S</i> <sub>C</sub> <i>S</i> <sub>8</sub>	Öntermékenyülő

Fajta	Az <i>S</i> -genotípus meghatározásának módszere	<i>S</i> -genotípus	Termékenyülés <sup>c</sup>
Pannónia	R1, R2, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Pasinok	R1, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Pisana	R1, FB	$S_C S_8$	Öntermékenyülő
Priboto	R1, R2, FB	$S_1 S_2$	Önmeddő
Rakovszky	R1, R2, FB	$S_C S_2$	Öntermékenyülő
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
Zaposz dolje	N, R1, FB	$S_C S_C$	Öntermékenyülő
Zard	N, R1, R2, FB	$S_{16-}$	Önmeddő

<sup>a</sup>**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

<sup>b</sup>Az  $S_2$ - és  $S_{2m}$ -allélok funkcionális különbözőségének igazolása további vizsgálatokat igényel

<sup>c</sup>A félkövér betűvel szedett termékenyülési fenotípus tisztázása vagy igazolása vizsgálataink eredménye

– Olyan allél, amelynek meghatározása egyik módszerrel sem volt eredményes

## 5.5 Az őszibarackra tervezett SSR-primerkészlet alkalmazásának vizsgálata kajszli mikroszatellit régiók variabilitásának kimutatására (1. kísérlet)

A kísérlet során használt 16 primerpárból 11 esetben sikerült megfelelő amplifikációt elérni az általuk közrefogott mikroszatellit régiókból. Minden egyes lókuszt polimorf volt. Az 12. táblázat a vizsgált lókusztok variabilitását jellemző paramétereket mutatja be. Kilenc primerpár által amplifikált DNS-szakasz gélmintázata egyetlen lókuszt jelenlétére utaló képet mutatott. Kivételt képezett a 96-005 jelű primer, amely által létrehozott mintázat egyértelműen a kétlókusztos rendszerre utalt. Az ezen lókusztokra vonatkozó adatokat nem használtuk fel az összesített kiértékelésnél. Ebben az esetben ugyanis lehetetlen lenne helyesen megállapítani a  $H_0$ ,  $F$  és PD értékeket. A 98-411 primer által jellemzett lókusztban 11 fajta esetében konzekvensen nem kaptunk PCR terméket, így ebben a lókusztban null-allél jelenlétét tételezzük fel. Ebből kifolyólag ezt a lókuszt is kizártuk a további értékelésből, ezzel ugyanis a heterozigotás fokát szükségszerűen alulbecsülnénk, ami a végeredményt befolyásolná.

12. táblázat. A kísérletben felhasznált 16 primerre jellemző adatok, az allélok hossza korábbi publikációk alapján, a kísérletben megállapított mérettartomány, az allélok száma és a lókusztok variabilitásának paraméterei

Lókuszt kód	Primer referencia	Feltételezett allél méret (bp)	Mérettartomány (bp)	Allélszám	$H_e$	$H_o$	$F$	PD
UDAp96-003	Cipriani és mts., 1999	143	-	n.a.	-	-	-	-
UDAp96-005 <sup>a)</sup>	Cipriani és mts., 1999	155	80-260	8	-	-	-	-
UDAp96-010	Cipriani és mts., 1999	131	80-110	3	0,66	0,70	0,06	0,77
UDAp96-013	Cipriani és mts., 1999	198	-	n.a.	-	-	-	-
UDAp96-018	Cipriani és mts., 1999	253	250-270	2	0,10	0,10	0,47	0,14
UDAp98-406	Cipriani és mts., 1999	101	90-110	2	0,48	0,55	0,14	0,59
UDAp98-408	Cipriani és mts., 1999	100	210-230	2	0,48	0,29	0,40	0,65
UDAp96-409	Cipriani és mts., 1999	129	140-180	4	0,52	0,38	0,27	0,69
98-021	Testolin és mts., 2000	145	-	n.a.	-	-	-	-
98-022	Testolin és mts., 2000	139	-	n.a.	-	-	-	-
98-410	Testolin és mts., 2000	146	120-140	3	0,58	0,20	0,65	0,69
98-411 <sup>b)</sup>	Testolin és mts., 2000	150	110-180	2	0,73	0,20	0,73	0,74
CPTC-5	Aranzana és mts., 2002	160	120-140	3	0,51	0,11	0,79	0,59
CPTC-6	Aranzana és mts., 2002	190	190-210	2	0,50	0,42	0,16	0,66
CPTC-9	Aranzana és mts., 2002	171	-	n.a.	-	-	-	-
CPTC-13	Aranzana és mts., 2002	150	170-190	3	0,31	0,21	0,32	0,47
Átlag:				3,1	0,46	0,32	0,47	0,58

**Megjegyzés:** n.a. – sikertelen amplifikáció;  $H_e$  – várt heterozigotás;  $H_o$  – megfigyelt heterozigotás;  $F$  – Wright-féle fixációs index; PD – *power of discrimination*; <sup>a)</sup> több mint egy lókuszt kimutató primer; <sup>b)</sup> null-allél kimutató primer

Összesen 34 allélt sikerült kimutatni az összes értékelt lókusztban. A lókuszonkénti allélszám 2 és 8 között változott, ami átlagosan 3,1 allélt jelent lókuszonként. Az egy-egy alléltípus



gyakorisága a fajtákban  $p=0,03-0,95$  érték között ingadozott. Ritka alléloknak tekintettük azokat, amelyek  $p \leq 0,1$  alatti vagy azzal egyenlő frekvenciájúak voltak a vizsgált mintákban. Ebbe a kategóriába viszonylag sok, mintegy 6 allélt lehetett besorolni. Ezzel szemben nem találtunk egyetlen fixált allélt sem. A  $p \geq 0,9$  kategóriába is csak egy tartozott ( $p=0,95$ ).

Az összes lókuszt várt heterozigótáságának átlagos mértéke  $H_e=0,46$  volt. A  $H_e$  értékek a 96-018 lókuszt esetében megállapított 0,10 valamint a 96-010 lókuszt alléljai esetében jellemző 0,66 szélső értékek között fordultak elő. A megfigyelt heterozigótáság ( $H_o$ ) 0,05 és 0,70 között változott. A Wright-féle *fixációs index* ( $F$ ), amely a megfigyelt heterozigótáságot ( $H_o$ ) összehasonlítja az elméletileg várttal ( $H_e$ ), ezzel kifejezve az allélikus fixáció mértékét,  $F=0,14$  és  $F=0,79$  értékek között mozgott a vizsgált lókusztok esetében. Az index átlagos értéke  $F=0,32$  volt. Végül a PD index (*power of discrimination*) értéke, amely a Nei-Li hasonlósági indextől (similarity index) való százalékos eltérését fejezi ki, 0,14 és 0,77 között mozgott. A PD értéke az adott lókusztban rejlő variabilitásának azt a képességét fejezi ki, amely alkalmas a genotípusok közötti divergencia kimutatására. Az összes lókuszt átlagos PD értéke egyenlő volt 0,58. Az utóbbi értékeknek megfelelően a legmagasabb PD értékű 3 primer (96-010; 98-409 és 98-410) által kimutatható variabilitás elegendő volt 6 fajta egyértelmű azonosításához, míg más primerekkel (96-018, 98-406, 98-408 és CPPCT-6) mindössze 3 genotípus volt elkülöníthető.

A vizsgált lókusztok polimorfizmusa lehetővé tette az összes fajta megkülönböztetését. A 40 vizsgált fajta azonosításához elegendő volt mindössze 6 primer (96-005; 96-010; 98-406; 98-409; 98-410 és CPPCT-5) használata. A eredmények alapján megállapítható, hogy néhány vizsgált genotípus genetikailag nagyon közel áll egymáshoz. Ezek közé tartoztak a 'Ceglédi óriás' és 'Szegedi mammut', a 'Borsi-féle kései rózsza' és 'Rózsakajszai C.1406', illetve a 'Naszlazsdenije' és 'Aviator' fajtapárok. Ezek távolság koefficiense ( $D$ ) az előző sorrendnek megfelelően, 0,13; 0,07 és 0,06 volt. A legnagyobb távolságot (0,73) a 'Korai piros' és a 'Salah' fajták között állapítottuk meg.

Ritkán fordult elő, hogy egy allél jelenléte vagy hiánya csak egy kis fajtacsoportra korlátozódott volna. Ezt a helyzetet tapasztaltuk a 96-018a allél esetében, amely csak a 'Katy', 'Goldrich' és 'Kok-pszár' fajtákban fordult elő. Ugyanúgy a CPPCT-5a allélt csak a 'Dionüsz' és 'Citologiec' fajtákban tudtuk kimutatni. Ezzel szemben a 96-018b allél a Kok-pszár kivételével az összes fajtaban detektálható volt. Néhány allél előfordulása csak egy-egy földrajzi fajtacsoportra volt jellemző. Ezek közé tartozik a 96-005b, amely az örmény fajták 83%-ában

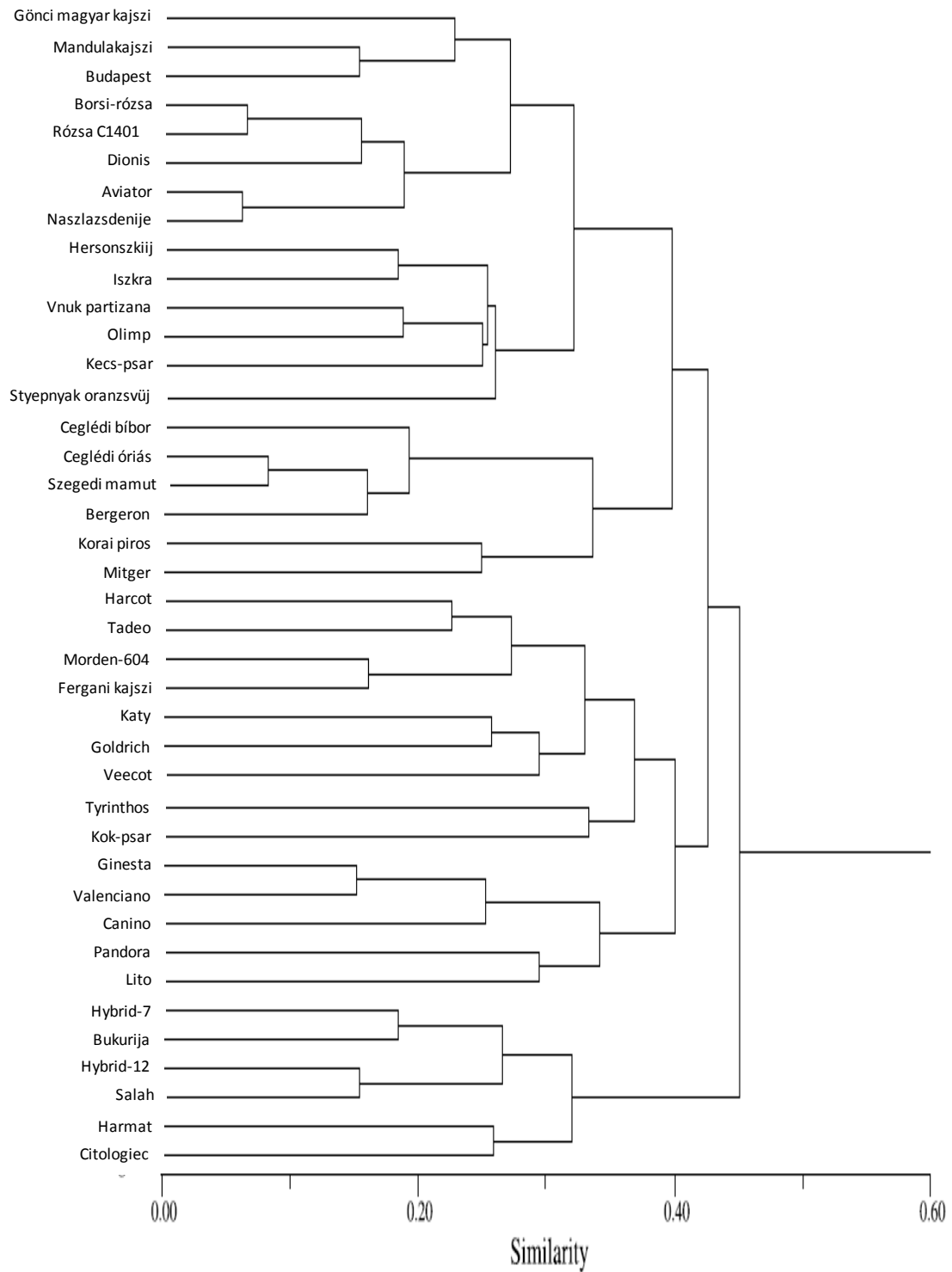
---

volt jelen, vagy a 98-409b, amely a nyugat-európai fajták 50%-ában volt kimutatható. Néhány allél esetében ezenkívül megfigyelhető volt, hogy jellegzetesen két csoporthoz tartoztak. Erre a legjobb példa a CPPCT-5c, amely egyrészt mind a 6 örmény fajtában megjelent, de ezenkívül a 6 közép-ázsiai fajta közül ötben (67%) is kimutatható volt. Ehhez hasonlóan a 96-010c az összes vizsgált (9) magyar fajtában jelen volt, és ugyanakkor a közép-ázsiai fajták túlnyomó többségében is, ahol 5 fajtából 4-ben lehetett azonosítani. A 98-408a is jellegzetes allélja volt az amerikai és közép-ázsiai fajtáknak. Több mind 60%-a azoknak a fajtáknak, amelyek hordozzák ezt az allélt a fenti csoportok valamelyikéhez tartozott. Végezetül több mind 85%-a azoknak a fajtáknak, amelyek hordozói voltak a 96-005i, 96-005h és 98-409d alléloknak, a közép- vagy nyugat-európai csoport tagjai voltak.

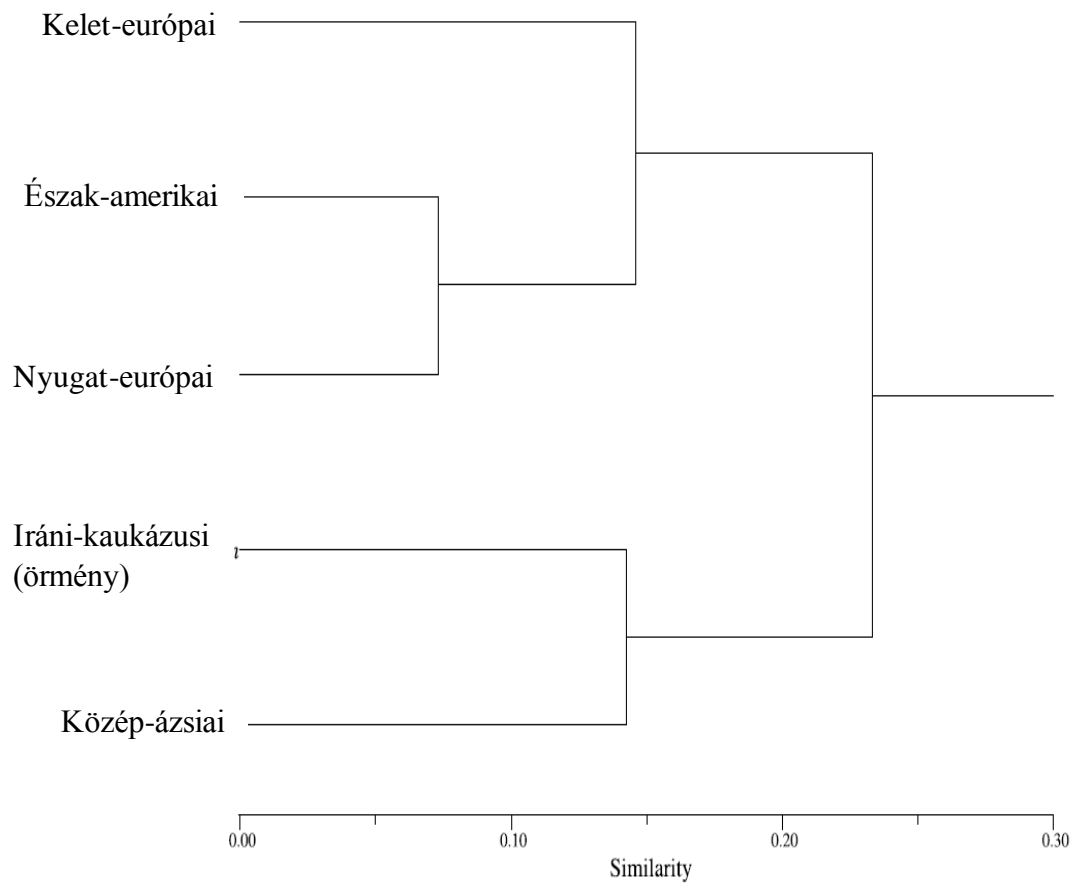
### 5.5.1 Klaszteranalízis

A 34 SSR-marker adatai figyelembevételével Nei és Li (1979) módszere szerint létrehozott azonossági mátrix alapján szerkesztett UPGMA klaszter analízise, kimutatta, hogy a dendrogramon szereplő fajták csoportosítása megfelel a földrajzi eredetüknek, illetve pedigri-jüknek. Az 12. ábrán bemutatott dendrogram három fő csoportba rendezte a fajtákat. Az első két további alcsoportra oszlik, amelyek közül az egyik a magyar és a közép-ázsiai fajtákat foglalja magába, a másik viszont magyar és nyugat-európai (többek között a 'Bergeron' és 'Mitger') fajtákból áll. A másik fő csoport ugyanúgy két alcsoportra válik szét, amelyek közül az egyik főleg észak-amerikai fajtákból áll, kiegészítve néhány közép-ázsiai fajtaival ('Fergani' és 'Kok-psar'). A másik alcsoport csak nyugat-európai fajtákat foglal magába, ezen belül 3 spanyol és 2 görög fajta is ebbe a csoportba tartozik. Végezetül a harmadik fő csoport tartalmazza az összes örmény fajtát, beleértve a 'Hibrid 7', 'Hibrid 12' és a 'Citologiec' fajtákat. Az utóbbiak konzekvens genetikai közelsége az örmény fajtákhoz megerősíti azt a feltételezést, miszerint az örmény 'Salah' fajta lehetett az egyik szülőjük (12. táblázat).

A klaszteranalízis, amelyet az azonos származású fajták csoportjainak azonossági indexe alapján végeztük el (13. ábra) azt szemlélteti, hogy az észak-amerikai és a nyugat-európai fajták nagy hasonlóságot mutatnak ( $D=0,07$ ). A magyar fajták esetében azt állapítottuk meg, hogy úgy a nyugat-európai, mint a közép-ázsiai fajtákhoz közel állnak ( $D=0,16$ ). Végül megállapítást nyert, hogy az örmény és közép-ázsiai fajták klasztere elkülönül a nyugat-európai és észak-amerikai genotípusoktól. A korrelációs index értéke  $r=0,97$ , ami megerősíti a megállapítás helyességét, statisztikai szignifikanciáját.



12. ábra. A kísérletben szereplő 40 kajszifajta rendszerezése az UPGMA klaszteranalízissel a Nei genetikai távolságmátrix alapján (Nei és Li, 1979)



13. ábra. A kísérletben szereplő 40 kajszifajta származásának megfelelő 5 öko-földrajzi csoport rendszerezése az UPGMA klaszteranalízissel a Nei genetikai távolságok mátrixa alapján (Nei és Li, 1979)

## 5.6 Az őszibarack és kajszifajta genomokra tervezett SSR-primerek által amplifikált mikroszatellit markerek variabilitásának elemzése egy nagy diverzitású és genotípuszámú kajszifajta csoporton (2. kísérlet)

### 5.6.1 Mikroszatellitek diverzitása

Százharminc kajszifajta és három rokon faj genetikai polimorfizmusát vizsgáltunk 5 őszibarack és 5 kajszifajta genom DNS alapján tervezett SSR-primer segítségével. Az összes vizsgált lókuszt polimorf volt. Az allélokot a kapilláris elektroforézissel működő automata szekvenáló készülék használatával egyértelműen meg lehetett különböztetni. A vizsgált lókusztok közül a polimorfizmus legmagasabb fokát az UDAp-407 lókuszt esetében állapítottuk meg, ahol 22 allél előfordulását tapasztaltuk. Az effektív allélszám is itt volt a legmagasabb (14. táblázat). Ezzel szemben, a legkevésbé polimorfnak (7 allél) az ssrPaCITA27 lókuszt bizonyult. Mindent összevetve, 133 minta tesztelésével 133 allél került izolálásra, lókuszonként átlagosan 13,30 alléllal (14. táblázat). A lókuszonként megfigyelt heterozigótaság mértéke  $H_o=0,8636$  (UDAp-410 lókuszt) és  $H_o=0,3182$  (ssrPaCITA27) között változott; az átlag 0,6281 volt (14. táblázat). A megfigyelt heterozigótaság ( $H_o$ ) minden fajta esetében kisebb volt az elméletileg várt heterozigótaságnál ( $H_e$ ).

13. táblázat. A vizsgált mikroszatellit lókusztok jellemzői

Lókuszt	Eőrejelzett allél méret (bp)	Méret-tartomány (bp)	Kapcsolódási (annealig) hőmérséklet (°C)	Ismétlődő szekvencia	Referenciák
ssrPaCITA7	211	186-224	60	(AG) <sub>n</sub>	Lopez és mts., 2002
ssrPaCITA10	175	142-212	58	(CT) <sub>n</sub>	Lopez és mts., 2002
ssrPaCITA19	114	98-148	60	(TC) <sub>n</sub>	Lopez és mts., 2002
ssrPaCITA23	146	112-157	56	(AC) <sub>n</sub> (AG) <sub>n</sub>	Lopez és mts., 2002
ssrPaCITA27	262	224-266	58	(TC) <sub>n</sub> (TA) <sub>n</sub> (TG) <sub>n</sub>	Lopez és mts., 2002
UDAp-407	188	118-162	58	(TC) <sub>n</sub> TT(TC) <sub>n</sub>	Messina és mts., 2004
UDAp-410	155	116-146	58	(AG) <sub>n</sub>	Messina és mts., 2004
UDAp-414	174	150-214	58	(AG) <sub>n</sub>	Messina és mts., 2004
UDAp-415	156	139-143	58	(GA) <sub>n</sub>	Messina és mts., 2004
UDAp-420	175	154-262	58	(CT) <sub>n</sub>	Messina és mts., 2004

Az összes egyedben kimutatható 133 különböző allél közül 32 csak egyszer fordult elő a vizsgált mintákban. Az egyedi allélokot az eltérő ökoföldrajzi csoportokból származó fajtákban vagy rokonfajokban találtuk meg (15. táblázat). Nem amplifikálódó (null-allélokot) 5 fajta három lókusztában találtunk: 'Zard' (ssrPaCITA 27 lókuszt), 'Uzsgorod' és 'Rakovice' (ssrPaCITA 23 lókuszt) és a 'Korai kecskemétiben' (osztrák szelekció) (UDAp-410). Az  $F_{ST}$

értékek 0,4544 (ssrPaCITA 7) és 0,7363 (ssrPaCITA 27) között változtak 0,5786-as átlaggal. Az  $F_{ST}$ -ből becsült  $N_m$  génáramlás mértéke az ssrPaCITA 7 lókuszban 0,3003 volt, ami háromszor magasabb érték, mint az ssrPaCITA 27 lókuszban mért 0,0895. (14. táblázat).

14. táblázat. Százharminchárom kajszifajta 10 mikroszatellit lókuszáinak variabilitását jellemző paraméterek

Lókusz	Kimutatott allélek száma	Effektív allélszám ( $N_e$ )	Megfigyelt heterozigótáság ( $H_o$ )	Elméletileg várt heterozigótáság ( $H_e$ )	Wright-féle beltényésztési koefficiens ( $F_{st}$ )	Génáramlás ( $N_m$ )
ssrPaCITA7	14	4,2511	0,8346	0,7677	0,4544	0,3002
ssrPaCITA10	17	3,4492	0,5038	0,7128	0,6453	0,1374
ssrPaCITA19	12	3,9001	0,7519	0,7464	0,4944	0,2556
ssrPaCITA23	11	4,2604	0,6031	0,7682	0,6154	0,1562
ssrPaCITA27	7	2,4551	0,3182	0,5949	0,7363	0,0895
UDAp-407	22	6,4712	0,6917	0,8447	0,5909	0,1731
UDAp-410	12	4,6933	0,8636	0,7899	0,4576	0,2963
UDAp-414	14	5,0867	0,4887	0,8064	0,6958	0,1093
UDAp-415	11	3,2244	0,6241	0,6925	0,5477	0,2065
UDAp-420	13	3,1568	0,6015	0,6858	0,5598	0,1966
Átlag	13,3	4,0948	0,6281	0,7413	0,5768	0,1834
Szórás:	4	1,1461	0,1666	0,0725	-	-

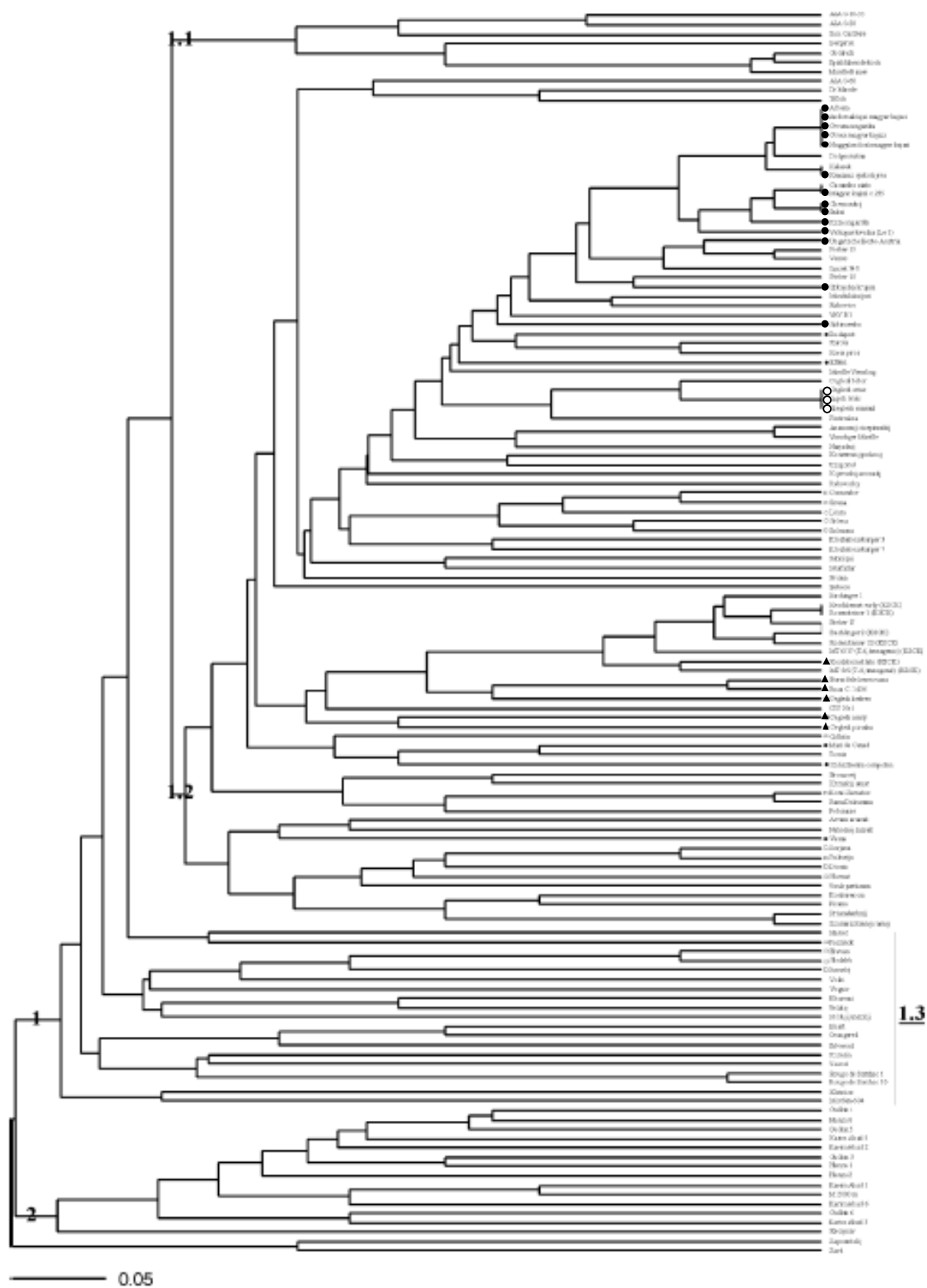
15. táblázat. Az egyedi allélokat hordozó fajták

Lókusz	Fajta
ssrPaCITA 10	Arvam aramat, Effekt, Karim Abad 8, Hunza 1, Vesna
ssrPaCITA 19	Vesna
ssrPaCITA 23	Kijevskij aromatnij, Harcot
ssrPaCITA 27	Poldij junskij
ssrPaCITA 7	Priana
UDAp-407	Effekt, Jerevan, Kuresia, Junskij, Poldij junskij, Priusadenbnij
UDAp-415	Ananasznij ciurpinszkij, Kec-psar
UDAp-410	Gulkin
UDAp-414	Gulkin, Morden-604, Paszinok
UDAp-420	Cegledi kedves, Mari de Cenad, Zaposzdojje

### 5.6.2 A fajták közötti genetikai viszonyok vizsgálata

A kajszifajták genetikai rokonságának megállapításához egy dendrogramot szerkesztettünk. A dendrogramot a 10 SSR-lókuszból származó adatok alapján összeállított genetikai távolság mátrixból páronkénti UPGMA módszerrel készítettük. A dendrogram a fajtákat két nagy csoport-

ra osztotta (14. ábra). Az 1-es csoportban két alcsoport (1.1 és 1.2) található, amelyek a legtöbb közép-európai fajtát magukba foglalják. Az 1.1 alcsoport 6 európai fajtát és az amerikai ‘Goldrich’ fajtát foglalja magába. Az 1.2 alcsoportba került a legtöbb európai fajta. Ezen a csoporton belül további 4 kelet-európai alcsoport jelenik meg: a Magyar kajszi fajtacsoport; az Óriás kajszi fajtacsoport; a román nemesítési programból származó hibridek és a Rózsabarrack típusú fajták és ceglédi hibridek. Külön kiemeltük a ‘Salah’ ismert vagy feltételezett pedigréjű hibridjeit (14. ábra és 4. táblázat). Az alcsoportokba tartozó fajták kapcsolatát alátámasztják részben morfológiai jellemzőik, részben pedig az ismert pedigrek. Az 1. csoport többi, különböző ökoföldrajzi területekről származó fajtái az 1.3 csoportba kerültek. A 2. csoport csak közép-ázsiai eredetű fajtákat tartalmaz.

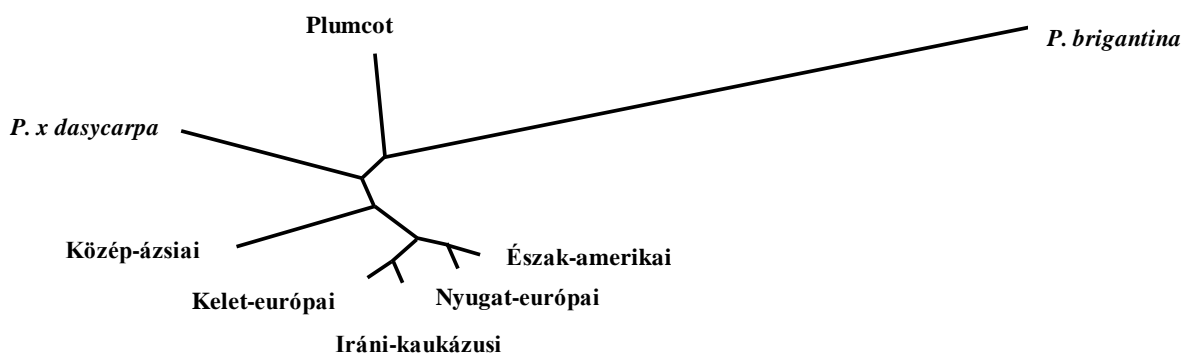


14. ábra. Százharminchárom kajszifajta közötti genetikai távolságmátrix alapján, szerkesztett UPGMA dendrogram (*ideiglenes*)



### 5.6.3 Az ökoföldrajzi csoportok közötti genetikai kapcsolat

Az allélgyakoriságok alapján kiszámítottuk az öt ökoföldrajzi csoport genetikai távolságát és genetikai azonosságát (Nei, 1972). Az eredményeket a 16. táblázatban mutatjuk be. A legkisebb mértékű genetikai azonosságot (43%) a közép-ázsiai és a nyugat-európai csoportok között állapítottuk meg. Ezzel szemben a kelet-európai, a nyugat-európai és az iráni-kaukázusi csoportok genetikailag nagyon hasonlóknak bizonyultak, az azonossági index 79 és 81% közötti értékeket vett fel. A genetikai távolságokon alapuló UPGMA dendrogram két fő csoport elkülönítését eredményezte (4. ábra). Az egyik tartalmazza a közép-ázsiai csoportot, míg a másik, két további alcsoportra oszlik. Az egyik alcsoport a nyugat-európai és az észak-amerikai, míg a másik az iráni-kaukázusi és a kelet-európai fajtákat foglalja magába.



10

15. ábra. A különböző eredetű kajszi fajtacsoportok és a három rokonfaj genetikai távolságai alapján (Nei, 1972) szerkesztett UPGMA dendrogram

Az 15. ábra a *P. armeniaca* termesztett fajtái és a rokon fajok közötti genetikai kapcsolatot szemlélteti. A *P. x dasycarpa*, *P. brigantiaca* és Plumcot távol esnek a közös kajsziklasztertől. A rokonfajok közül, *P. brigantiaca* mutatja a legkisebb azonosságot a *P. armeniaca* termesztett fajtáival. A *P. x dasycarpa*, amely egy kajszi x *P. cerasifera* természetes hibrid, átmenetinek bizonyult a kajszi fajták csoportjai és a Plumcot között. Ez utóbbi a kajszi és a *P. salicina* mesterséges hibridje. A genetikai azonosság a *P. brigantiaca* és a kajszi csoportok között általában kismértékű volt (16. táblázat). A *P. brigantiaca* és a közép-

ázsiai valamint az észak-amerikai csoportok közötti genetikai azonosság értéke nem haladta meg a 10%-ot.

16. táblázat. Genetikai azonosság (átló fölött) és távolság a kajszii 5 ökoföldrajzi csoportja és 3 rokonfaja között

	Nyugat- európai	Észak- amerikai	Közép-ázsiai	Iráni- kaukázusi	Kelet-európai	<i>P. x dasycarpa</i>	Plumcot	<i>P. brigantiaca</i>
Nyugat-európai	-	0,7653	0,4391	0,6606	0,7982	0,6156	0,4716	0,1572
Észak-amerikai	0,2674	-	0,5092	0,6188	0,6510	0,5001	0,2936	0,0979
Közép-ázsiai	0,8231	0,6749	-	0,5712	0,4568	0,2362	0,2148	0,0967
Iráni-kaukázusi	0,4146	0,4800	0,5601	-	0,8239	0,3738	0,4252	0,1595
Kelet-európai	0,2254	0,4292	0,7834	0,1937	-	0,4653	0,5664	0,2206
<i>P. x dasycarpa</i>	0,4852	0,6930	1,4430	0,9839	0,7651	-	0,2224	0,1112
Plumcot	0,7517	1,2254	1,5380	0,8552	0,5685	1,5034	-	0,2143
<i>P. brigantiaca</i>	1,8503	2,3240	2,3365	1,8360	1,5115	2,1965	1,5404	-

## 5.7 SPECIFIKUS KAJSZI SSR-MARKEREK ALKALMAZÁSA A FAJ KULTÚR-EVOLUCIÓJÁNAK TANULMÁNYOZÁSÁRA (3. kísérlet)

A G1 kapcsoltsági csoport (Vilanova és mts., 2006b) DNS szekvenciái alapján tervezett 8 SSR-primerből 7-tel sikeres volt az amplifikáció; ezek közül a lókuszek közül 6 bizonyult polimorfnak. Az amplifikáció során csupán az aprigms8 primer nem adott eredményt, míg egy másik (aprigms6) a tesztelt fajtákban monomorfnak bizonyult. Az aprigms3 és aprigms11 primerek esetében a Vilanova és mts. (2006b) által leírt primer kötődési (annealing) hőmérsékletét 84°C-ra módosítottuk. Az eredmények ellenőrzése céljából egyes amplifikált fragmentumokat klónoztunk és DNS-szekvenciájukat meghatároztattuk. Ennek eredményei megerősítették, hogy a primerek a várt mikroszatellit régiókat és a határoló DNS-szakaszokat amplifikálták.

17. táblázat. A vizsgált lókuszekben azonosított allélok száma fajtacsoportonként

Lókuszt	Kína	Ázsia (Kína nélkül)	Észak-Amerika	Mediterrán és Nyugat-Európa	Kelet-és Közép-Európa	Átlag	Szórás	Összes allél
aprigms1	11	8	9	7	5	8,0	2,236	20
aprigms2	10	7	6	8	4	7,0	2,236	14
aprigms3	6	5	5	5	3	4,8	1,095	9
aprigms10	9	7	8	5	2	6,2	2,775	13
aprigms11	3	4	3	2	2	2,8	0,837	5
aprigms16	9	6	6	8	4	6,6	1,949	10
Átlag	8,0	6,2	6,2	5,8	3,3	5,9	1,669	11,8
Szórás	2,966	1,472	2,137	2,317	1,211	2,021	0,699	4,67

A G1 SSR-primerek előzetes tesztelése során Vilanova és mts. (2006) 12 kajszifajtát vizsgáltak, és arról számoltak be, hogy a lókuszonkénti allélszám 2 és 7 között változott. A tesztelt fajták számának növelésével kísérletünkben lényegesen nagyobb diverzitást sikerült kimutatni a vizsgált lókuszekben. Hetvenhét kajszifajtából nyert mintákban a polimorf primerek összesen 71 allélt fedtek fel. A lókuszonkénti allélszám 5 (aprigms11) és 20 (aprigms1) között váltakozott. Az egy lókuszra számított átlagos allélszám 11,83 volt. Összehasonlításként, az őszibarack primerekkel és 74 kajszifajta elemzéséből Zebentyayeva és mts. (2003) összesen 107 allélt mutattak ki, ami a 12 vizsgált lókuszt esetében átlagosan 7,64 allélt jelent lókuszonként. Amint azt korábban bemutattuk, Romero és mts. (2003) ugyancsak az őszibarack primereket alkalmazva 40 fajtában 34 allélt mutattak ki, ami átlagosan 3,10 allélt eredményezett.

nyezett egy lókuszra nézve. A kajszi G1 SSR-primerekkel nagyobb allélszámot és lókuszonkénti átlagértéket lehetett kimutatni a jelen kísérletben. Maghuly és mts. (2005) 133 fajtát tesztelve hasonló eredményekről számoltak be (133 allél és 13,31 allél/lókusz). A G1 primerek kisebb fajtakörön is hasonló szintű teljesítményt adtak, ami jól tükrözi, hogy ezek az SSR-markerek rendkívül jól használhatók a kajszi genetikai variabilitásának jellemzésére.

A legtöbb allélt a kínai eredetű fajtákban mutattuk ki a vizsgált lókuszok többségében (17. táblázat). Az ázsiai, észak-amerikai és nyugat-európai fajtákat kisebb allélszám jellemezte. A közép-európai fajtákban volt a legkisebb a detektált allélok száma az összes lókusz esetében, ami konzekvensen alatta maradt az összes fajtára számított átlagértéknek. Ez a közép-európai kajszifajták erősen korlátozott genetikai variabilitására utal. Az ezen régiót képviselő fajtákat három kiemelkedő jelentőségű fajtacsoportból – Magyar kajszi, Rózsabarack és Óriás kajszi – illetve ezeknek a fajtacsoportoknak a hibridjei közül választottuk. E fajták szoros rokonsági viszonyait más vizsgálatok is alátámasztják (Romero és mts., 2003; Pedryc és mts., 2002).

18. táblázat. A kajszifajták különböző földrajzi csoportjaira számított átlagos várt heterozigótaság ( $H_e$ ) értékek a vizsgált lókuszokban

Lókusz	Kína	Ázsia (Kína nélkül)	Észak-Amerika	Mediterrán és Nyugat-Európa	Kelet-és Közép-Európa	Átlag	Szórás	Összes heterozigótaság
aprigms1	0,8917	0,8737	0,8587	0,6911	0,3023	0,7235	0,2488	0,8060
aprigms2	0,8583	0,8790	0,8080	0,7101	0,2642	0,7039	0,2543	0,8339
aprigms3	0,7917	0,8000	0,8116	0,6203	0,5044	0,7056	0,1372	0,7808
aprigms10	0,8250	0,8497	0,8442	0,6628	0,5106	0,7385	0,1489	0,8218
aprigms11	0,3250	0,6579	0,2355	0,2406	0,5098	0,3938	0,1847	0,4607
aprigms16	0,8833	0,8421	0,7428	0,7701	0,5514	0,7579	0,1283	0,8114
Átlag	0,7625	0,8171	0,7168	0,6158	0,4405	0,6705	0,1483	0,7524
Szórás	0,2176	0,0829	0,2392	0,1905	0,1235	0,1707	0,0656	0,1315

A  $H_e$  érték a 0,4607–0,8339 tartományba esett, ami csak alig szűkebb a Vilanova és mts. (2006b) ugyanezen primer-készlettel leírt 0,37–0,82 közötti méreteket magába foglaló tartománynál, de valamivel szélesebb a többi kajszi SSR-primer esetében leírt 0,5949–0,8487-es intervallumnál (Maghuly és mts., 2005). A 24 tesztelt fajtából 21 öntermékenyülő (SC) volt, melyek *S*-genotípusa számos esetben megegyezik (Halász és mts., 2007). Az öntermékenyülő fenotípus és az abból eredő beltenyésztés és genetikai drift, mint a hagyományos fajták

szelektálásának egyik következménye, szintén magyarázata lehet annak, hogy a heterozigótaság átlaga a 6 lókuszban a közép-európai fajták esetében volt a legkisebb ( $H_e=0,4405$ ). Nagyobb  $H_e$  értékeket figyeltük meg a mediterrán fajták esetében, amelyek között két önmeddő (SI) ('Moniquí' és 'Hatif Colomer') illetve néhány rendkívül eltérő eredetű SC fajta (francia, olasz, görög és marokkói) szerepelt. A vizsgált ázsiai és kínai fajták között nem volt öntermékenyülő genotípus, ami oka lehetett annak, hogy ezekben a fajtákban mértük a legmagasabb  $H_e$  értékeket.

A több SSR-lókuszból, és a különböző eredetű fajták tesztelése mint a variabilitást növelő tényező azt eredményezi, hogy a kimutatott allélok jelentős allélméret-tartományt alakítanak ki. Ennek a nagymértékű genetikai diverzitásnak egyidejű ábrázolása a megszokott módszerekkel áttekinthetlenné tenné az adatok bemutatását, és nem tenné lehetővé a jellegzetes trendek megjelenítését. Ezért egy új fajta ábrázolási módot dolgoztunk ki a kísérletünkben használt, öt földrajzi régióból származó 77 kajszifajta 6 SSR-lókuszában kimutatott genetikai variabilitás értékeléséhez (16. ábra). Ahhoz, hogy egy ábrán legyen ábrázolható a különböző méretű 71 allél variabilitási mintázata, az egyes allélok méretét minden lókuszból jellemző, leggyakrabban előforduló allél méretétől való eltérés formájában adtuk meg; vagyis hogy az adott allél hány nukleotiddal hosszabb vagy rövidebb a lókuszból leggyakrabban előforduló allél méreténél. Az ábrán szereplő számértékek és az oszlopok hossza minden lókuszból megfelel az adott allél százalékos gyakoriságának, amit az egyes földrajzi régiókba tartozó összes genotípus vizsgálatával állapítottunk meg. Minden sorban az értékek összege 100%.

A kizárólag egy földrajzi régió fajtáiban azonosított egyedi allélok előfordulása könnyen követhető az 16. ábrán. Az összes kimutatott allél 35%-a egyedi allél volt. A legtöbbet (13 darabot) a kínai fajtákban figyeltük meg; miközben az ázsiaiak 8, az észak-amerikaiak 3 és a mediterrán fajták 1 egyedi méretű allélt hordoztak. A közép-európai fajtákban egyetlen egyedi allélt sem találtunk.

Eredet/lókususz		allélméret eltérés (bp)																								Az összes allélszám (100%) <sup>(2)</sup>																												
		-53	-36	-34	-29	-26	-24	-23	-22	-21	-20	-18	-17	-16	-15	-14	-12	-11	-10	-9	-8	-6	-4	-3	-2		0 <sup>(1)</sup>	2	3	4	5	6	7	8	10	11	14	16	18	20														
Kína	ms1							5					5	5	10							2	2		7	2	55										5				2													
	ms2		52	4	11					7							7				2		4			9																												
	ms3																							4			61	15																										
	ms10	5										2			2																																							
	ms11																																																					
	ms16																																																					
Ázsia (Kína nélkül)	ms1																																																					
	ms2																																																					
	ms3																																																					
	ms10	11																																																				
	ms11																																																					
	ms16																																																					
Észak-Amerika	ms1																																																					
	ms2																																																					
	ms3																																																					
	ms10																																																					
	ms11																																																					
	ms16																																																					
Mediterrán és Nyugat-Európa	ms1																																																					
	ms2																																																					
	ms3																																																					
	ms10																																																					
	ms11																																																					
	ms16																																																					
Közép-Európa	ms1																																																					
	ms2																																																					
	ms3																																																					
	ms10																																																					
	ms11																																																					
	ms16																																																					

16. ábra. A kimutatott allélok gyakorisága (%) lókuszonként és a fajtacsoportok földrajzi eredete szerint. Az allélméret a legelterjedtebb allél méretétől való, bázispár számban kifejezett eltérésként került bemutatásra. A piros keret az egyedi allélokot jelöli. <sup>(1)</sup>A legelterjedtebb allélok mérete (bp) a vizsgált lókuszosokban: ms1: 215; ms2: 181; ms3: 262; ms10: 286; ms11: 164; ms16: 228; <sup>(2)</sup>Az összes allélszám (2n) egyben a vizsgált fajták számára utal (n).

(a)

	-53	-36	-34	-29	-26	-24	-23	-22	-21	-20	-18	-17	-16	-15	-14	-12	-11	-10	-9	-8	-6	-4	-3	-2	0	2	3	4	5	6	7	8	10	11	14	16	18	20		
ms1										○			⊗								○	⊗		⊗	⊗		⊗										⊗	⊗	○	
ms2		⊗	⊗	⊗	⊗																⊗		⊗		⊗				⊗											
ms3																						⊗	⊗			⊗	⊗		⊗											
ms10												⊗						○			⊗	⊗				○					⊗		○				○			
ms11																							○		⊗	⊗														
ms16									⊗							⊗		⊗		⊗	⊗			⊗												⊗				

(b)

	-53	-36	-34	-29	-26	-24	-23	-22	-21	-20	-18	-17	-16	-15	-14	-12	-11	-10	-9	-8	-6	-4	-3	-2	0	2	3	4	5	6	7	8	10	11	14	16	18	20		
ms1								○				○	○	○									⊗	○		⊗	○							○		⊗	⊗		⊗	
ms2		○	○	⊗	⊗		⊗															○	○	○		⊗			○											
ms3																							○	○	○		⊗	⊗												
ms10	○							○			○		○					○			○	⊗				⊗	○													
ms11																									⊗	⊗	○													
ms16				○				○														⊗	⊗	⊗		⊗	○									○				

17. ábra. A különböző és közös allélok előfordulásának lyukkártyaszerű ábrázolása; (a) az észak-amerikai ( O ) valamint mediterrán és nyugat-európai ( ⊗ ) fajták lókuszáinak összehasonlítása; (b) kínai ( O ) valamint közép- és kelet-európai ( ⊗ ) fajták egybevetése.

Az 16. ábra jól szemlélteti a különböző földrajzi génállományok közös alléljeit. A földrajzi csoportokra jellemző allélmintázatokat lyukkártyaszerűen egymásra helyezve, egyfajta szintézis révén kimutathatóvá válnak az egyedi és közös allélok. Ez az elemzés azt mutatja, hogy az észak-amerikai és a mediterrán fajtákban fellelt allélok 67%-a mind a két fajtacsoportban előfordul (17a. ábra). Ez igazolja e régiók kajszi-nemesítési programjai közötti kapcsolatot. Ahogy azt az előbb is láthattuk, ez lehet a magyarázata annak is, hogy a mediterrán és az észak-amerikai fajták miért rendelkeznek olyan allélokkal is, mint az ázsiai és kínai fajták. A legkevesebb közös alléllal a kínai és a közép-európai fajták rendelkeznek (17b. ábra), jelezvén, hogy ezek a csoportok csak távoli rokonságban állnak egymással. Ez az ábra a hagyományos dendrogramokhoz képest nagyon hasonló információkat tartalmaz, ráadásul nem fedi el az eredeti allél-méreteket sem.

A 3. kísérletben vizsgált fajták döntő többsége egyedi allélmintázattal rendelkezett a 6 vizsgált lókuszban. Kivételt képezett a közép-európai fajták csoportja. Az egyedi mintázat bebizonyítása érdekében elvégzett összesen 2556 páronkénti genotípus összehasonlítás eredményeként, 43 esetben azonos genotípust állapítottuk meg a vizsgált lókuszosokban. Ezek mindegyike 24 magyar fajtát magában foglaló csoportban fordult elő (18. ábra)

	Albena	Andornaktályai	Borsi-féle k. rózsza	Budapest	Ceglédi arany	Ceglédi bíbor	Ceglédi kedves	Ceglédi óriás	Ceglédi Piroska	Crvena ungarska	Gönci magyark.	Korai piros	Kasna ugarska	Ligeti óriás	Magyar k. C.235	Mandulakajsi	Mari de Canad	Nagygyüm. magyark.	Nikitszkij	Paksi magyarkajsi	Pannónia	Rakovszky	Rózsza C.1406	Venus	
Albena																									
Andornaktályai	=																								
Borsi-féle k. rózsza	x	x																							
Budapest	x	x	x																						
Ceglédi arany	=	=	x	x																					
Ceglédi bíbor	x	x	x	x	x																				
Ceglédi kedves	x	x	x	=	x	x																			
Ceglédi óriás	x	x	x	x	x	x	x																		
Ceglédi Piroska	x	x	x	x	x	x	x	x																	
Crvena ungarska	x	x	x	x	x	x	x	x	x																
Gönci magyark.	=	=	x	x	=	x	x	x	x	x															
Korai piros	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x														
Kasna ugarska	=	=	x	x	=	x	x	x	x	x	=	x													
Ligeti óriás	x	x	x	x	x	x	x	x	=	x	x	x	x												
Magyar k. C.235	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
Mandulakajsi	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
Mari de Canad	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
Nagygyüm. magyark.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
Nikitszkij	=	=	x	x	=	x	x	x	x	x	=	x	=	x	x	x	x	x							
Paksi magyarkajsi	=	=	x	x	=	x	x	x	x	x	=	x	=	x	x	x	x	x			=				
Pannónia	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x			
Rakovszky	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		
Rózsza C.1406	x	x	=	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Venus	=	=	x	x	=	x	x	x	x	x	=	x	=	x	x	x	x	x	x	=	=	x	x	x	

18. ábra. Hat SSR-lókusz allélmintázta alapján páronkénti összehasonlítás eredménye a közép-európai fajtakörben (= - azonos genotípus; x – eltérő genotípus)

Összefoglalva, a G1 kapcsoltsági csoportra nemrégiben kifejlesztett SSR-markerek alkalmazásával számos allél kimutatható volt, és ezek a primerek alkalmasak voltak a kajszifajták genetikai diverzitásának jellemzésére. A G1 primerekkel feltárt variabilitást jellemző paraméterek (összes allélszám, lókuszonkénti átlagos allélszám,  $H_c$ ) a teljes genomban szétszóródva található SSR-régiók amplifikálása során kapott hasonló paraméterek értékeit meghaladták vagy megegyeztek azokkal. Mindössze 6 primerpár alkalmazásával egyértelmű különbségek és összefüggések voltak kimutathatók a kajszifajták fő földrajzi régiói között.



## 6 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### 6.1 *S*-genotípus meghatározása izoelektromos fókuszálással

A világ kajszi-termésének jelentős részét az európai ökoföldrajzi csoportba tartozó kajszi-fajták szolgáltatják. E csoport tagjainak túlnyomó többsége öntermékenyülő, de éppen ebből kifolyólag e csoport genetikai variabilitása igen korlátozott. Ahogyan más kultúrnövények, úgy a kajszi nemesítése sem tekinthető soha lezárt folyamatnak. Újabb és újabb igények, követelmények fogalmazódnak meg mind a termesztők, mind a kereskedők részéről. Legyen a fajta ellenálló az extrém környezeti hatásokkal (fagy, aszály, kórokozók, kártevők stb.) szemben, melyek óriási károkat okozhatnak vagy akár el is lehetetleníthetik a termesztést. Ezenkívül a gyümölcs legyen piacos (gyümölcstömeg, szín, íz stb.), jól szállítható, vagy elégítsen ki olyan speciális fogyasztói elvárásokat, mint az egészség támogató, ún. funkcionális élelmiszerek csoportja. Ezen tulajdonságok, vagy ezek közül akár csak néhány tulajdonságnak a kombinálása sem kivitelezhető az európai fajtakörön belül. Mindez azt jelenti, hogy a nemesítőnek távolabbi génforrásokhoz kell nyúlnia, ahogyan az az elmúlt években meg is történt. Ilyen eljárások azonban számos meglepetést is okozhatnak, ahogyan az szintén napvilágot látott, amikor kiderült, hogy az így előállított, perspektivikus, új fajták nagy része a megfelelő termékenyüléshez gondosan megválasztott pollenadó fajtát igényel. Az önmeddőség nehezen fogadtatható el a termesztőkkel egy olyan gyümölcsfaj esetében, melynél korábban e problémák egyáltalán nem jelentkeztek. A jövő fajtáinak előállítása érdekében ezért igen fontos megismerni az önmeddőség öröklődését, az öntermékenyülés genetikai, molekuláris biológiai hátterét. Magonckorban alkalmazható markerek segítségével az öntermékenyülő utódok könnyen kiválogathatók, ami a nemesítési programokban igen jelentős idő- és pénz-megtakarítást biztosíthat. Kutatócsoportom ezért csatlakozott e terület világszerte is alig néhány évvel korábban megindult tudományos tevékenységéhez.

A termékenyülési viszonyokat irányító *S*-genotípusok meghatározása akkor vált lehetővé, amikor McClure és mts. (1989) tisztázták, hogy a bibe–pollen között lejátszódó saját/idegen felismerési reakció a bibeszálban kifejeződő ribonukleáz enzimekhez kötődik. A különböző allélváltozatok által kódolt ribonukleáz enzimek aminosav-szekvenciája a reakció specificitása következtében szükségszerűen különbözik egymástól. Ez alapján ezek az izoenzimek izoelektromos fókuszálással szétválaszthatók egymástól. Termesztett gyümölcsfák közül első ízben japánkörte esetében számoltak be ilyen kísérletekről Sassa és mts.

(1992), akik igazolták, hogy az *S*-RN-ázok lúgos 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.

Kísérleteink során a leghatékonyabb szétválást a 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) nevezhető (O’Farrell és mts., 1977), amit korábban sikeresen alkalmaztak alma (Bošković és Tobutt, 1999), mandula (Bošković és mts., 1997; 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 legtöbb fajta két, egymástól elkülönült izoenzimet mutatott, vagyis a vizsgált genotípusok heterozigóták voltak, ahogyan az a gametofitikus inkompatibilitási rendszer működése mellett várható is volt. 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 reprezentálnak, vagy különböző poszttranszlációs módosulások következtében alakulnak ki; de az sem kizárható, hogy az enzimkivonatokban lejátszódó degradációs folyamatok hatására jönnek létre. Ehhez hasonló jelenséget írtak le Bošković és mts. (1997) hosszan tárolt mandula bibekivonatok esetében. Az  $S_5$ - és  $S_6$ -allélokot hordozó spanyol és észak-amerikai fajták nem voltak hozzáférhetőek, de ezek és az általunk azonosított allélok különbözősége később kétséget kizáróan igazolódott (Sutherland és mts., 2004; Vilanova és mts., 2005).

A ‘Ceglédi óriás’ és ‘Ligeti óriás’ azonos *S*-genotípussal rendelkezik ( $S_8S_9$ ). E fajták régóta ismert önmérségét 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 ‘Lambert-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 magyar kajszí', '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', 'Mandulakajszí', 'Mamaia' és 'Konzervnij pozdnij' különböző országok különféle nemesítési programjaiból származnak. Az S-lókuszt mind-egyik heterozigótának bizonyult. A 'Mandulakajszí' 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 'Mandulakajszí' 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' jöllehet ukrán fajta, a 'Sateni' szabad megporzásból eredő

magonca, mely utóbbi fajta az irano-kaukázusi ökoföldrajzi kajszi csoportba tartozik (Mehlenbacher és mts., 1991).

A 'Zard', 'Aurora' és 'Kecs-psár' a NEpHGE II fókuszálási protokoll hatására egyetlen intenzív RN-áz sávot mutatott. Az 'Aurora' 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 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 'Aurora' 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.

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 izoenzim 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; Halász és mts., 2007), japánkajszi (Tao és mts., 2002) és kajszi (Sutherland és mts., 2004; 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. Az *S*-genotípusok meghatározása során a különböző fajtákban csak akkor tekintettünk két allélt azonosnak, ha azok *S*-RN-áz fehérjetermékeit NEpHGE esetén azonos migrációs tulajdonság jellemezte, és a PCR mindkét intron esetében megegyező eredményt adott. A vítés 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*<sub>1</sub>-allél esetén 432 bp hosszú fragmentumot eredményezett, a szekvencia alapján következtetett intronhossz pedig 308 bp volt. A 2. intron esetében a fragmentumméret az *S*<sub>1</sub>-allélnál 2393 bp, az *S*<sub>2</sub>-nél 1374 bp, míg az *S*<sub>4</sub>-nél 544 bp volt, a megfelelő pontos intronhosszak 1976, 706 és 164 bp (Romero és mts., 2004).

Sutherland és mts. (2004) 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*<sub>1</sub>–*S*<sub>6</sub> és *S*<sub>C</sub> 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*<sub>8</sub>–*S*<sub>16</sub>) kívül további 4 új allél (*S*<sub>17</sub>–*S*<sub>20</sub>) azonosítása is lehetővé vált. Ennek oka lehet egyrészt, hogy a degenerált primereket több különböző oligonukleotid elegye alkotja, melyek közül lehetőség nyílt 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*<sub>C</sub>- és *S*<sub>8</sub>-allélok is kimutathatók voltak, melyeket korábban 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.

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.

Az általunk azonosított új allélok közül 10 allél első intronrégiójának mérete egyértelműen különbözik a korábbiaktól, három allélhoz azonban nem tudunk pontos méretet rendelni. Ezek meghatározásához az 1. intronrégió szekvenálása szükséges az adott allélok 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 genotípusmeghatározásokhoz 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 agarózgélén 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. 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' ( $S_8S_9$ ) × 'Magyar kajsz C. 1789' ( $S_C S_8$ ) 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 Piroská'-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 (9. táblázat). Ezt az allélt csak ebben a két fajtában tudtuk kimutatni a vizsgált 74, ebből 22 magyar fajta közül, ami alapján föltételezhetjük, hogy a ‘Ceglédi Piroska’ pedigrijében pollenadóként a ‘Magyar kajszi C. 1789’ helyett a ‘Korai piros’ vett részt, feltéve, hogy a dolgozatban nem vizsgált, eredeti pollenadó ‘Magyar kajszi C. 1789’ klónfajta genotípusa megegyezik a többi Magyar kajszi  $S$ -genotípusával.

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 (10. táblázat).

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

Albuquerque és mts. (2002) megállapították, hogy a kajszi  $S$ -alléljainak száma a többi *Prunus* fajhoz képest kevés, 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), termesztett cseresznyefajtákban 14 (Sonneveld és mts., 2003; Békefi és mts. 2003), meggyfajtákban 14 (Hauck és mts., 2002; 2006), mandulában 31 (Ortega és mts., 2005, 2006; Bošković és mts., 2007; Halász et al., 2008)  $S$ -allélt írtak le. Vizsgálataink során tizenhárom új  $S$ -allélt azonosítottunk a kelet-európai és közép-ázsiai kajszi genotípusokban, mellyel az ismert kajszi allélok 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  $S_8$ -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 (Halász, 2007b). Mivel izoenzim-vizsgálatokkal egyértelműen kimutatható volt, hogy több heterozigóta öntermékenyülő fajta is két, különböző  $S$ -RN-ázzal rendelkezik, igazolódott, hogy a kajszinál nem az  $S$ -ribonukleáz enzim aktivitásvesztése okozza az öntermékenyülést, ahogyan a japánkörte és a mandula esetében (Sassa és mts., 1992; Bošković és mts., 1997).

Vizsgálataink alapján kiderült, hogy az  $S_C$ - és  $S_8$ -RN-ázok azonos izoelektromos ponttal rendelkeznek, és ezek az enzimek egyetlen NEpHGE-protokoll alapján sem voltak szétválaszthatók. 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 azonos volt. Miután az intronok nem kifejeződő szekvenciarészletek, 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. Az RHV régióknak jelentős szerepe van az allélspecifikus felismerésben (Matton és mts., 1997).

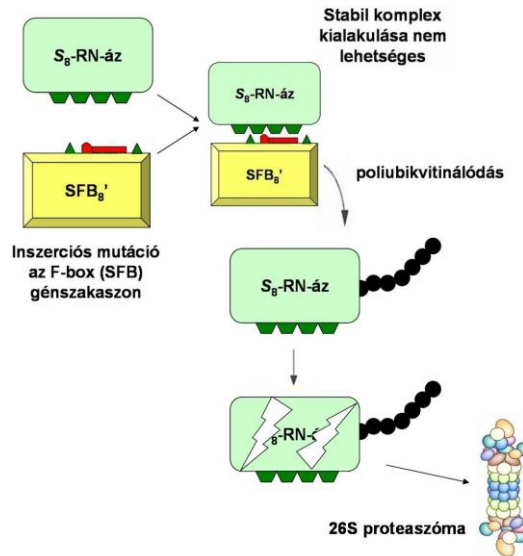
A *P. armeniaca* és *P. mume* F-box gén konzervatív szekvenciái alapján degenerált primereket terveztünk a Vaughan és mts. (2006) által cseresznye esetében alkalmazott megközelítés szerint. A 'Ceglédi óriás', 'Ceglédi arany', és 'Pannónia' fajtákban egy vagy két fragmentumot amplifikáltunk. A fragmentumok szekvenálása alapján az SFB<sub>8</sub> és SFB<sub>C</sub> 100 %-ban azonosnak bizonyult, kivéve egy, az SFB<sub>C</sub>-ben előforduló 358 bp méretű inszerciót,



melyet egy spanyol kutatócsoport (IVIA, Valencia), Vilanova és mts. (2006b) velünk egy időben azonosítottak az öntermékenyülő ‘Currot’ fajtában. Az eredeti allél (SFB<sub>8</sub>) és mutáns változatának (SFB<sub>C</sub>) összevetése alapján igazoltuk, hogy a magyar fajták által hordozott SFB<sub>C</sub>-allélban az inszerció helye azonos a spanyol kutatók által leírt pozícióval.

Az SFB<sub>8</sub> és az OriSFB<sub>C</sub> („eredeti”: inszerció nélküli) allélok csak egyetlen, az F-box régióban található aminosavban különböztek egymástól, míg a ‘Pannónia’ és ‘Currot’ fajták SFB<sub>C</sub>-alléljába ékelődő inszerciók szekvenciák között kétnukleotidos eltérést mutattunk ki. Ezáltal a cseresznyénél használt jelölési rendszer alapján (S<sub>3</sub>’ és S<sub>4</sub>’) a kajszi S<sub>C</sub>-haplotípusa valójában az S<sub>8</sub>’-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., 2004). A cseresznye öntermékenyülését a mutációs nemesítés során röntgensugárzással kezelt pollenanyasejtekből származó pollenszemek örökítették át az utódokra (Lewis és Crowe, 1954). Az SFB<sub>4</sub>’-allélnál egy négybázispáros deléció okozta kereteltolódás, míg az SFB<sub>3</sub>’-allélnál a teljes gén deléciója következett be (Ushijima és mts., 2004; Sonneveld és mts., 2005).

A kajszi öntermékenyülése a Sonneveld és mts. (2005) által leírt modell működése esetében úgy képzelhető el, hogy a sérült SFB<sub>C</sub> fehérje nem ismeri fel az S<sub>8</sub>-RN-ázt sajátjaként, nem képes azzal szoros, allélspecifikus kapcsolatot létesíteni, így a szabadon maradt S<sub>8</sub>-RN-ázok degradálódnak a 26S proteaszómában (19. ábra). Ennek következtében a fejlődő pollentömlők rRNS-molekulái sértetlenek maradnak, így a fehérjeszintézis és a tömlők növekedése, valamint a termékenyülés genetikailag akadálytalan.



19. ábra. 27A kajszi öntermékenyülését irányító folyamatok lehetséges molekuláris modellje. A pollenkomponens SFB<sub>8</sub>-allélba ékelődő inszeráció hatására a HVa és HVb régiókat nélkülöző, funkcióképtelen SFB<sub>8</sub>' fehérje nem ismeri fel sajátként a bibeszálból belépő S<sub>8</sub>-RN-ázokat, így azokkal nem képez szoros, allélspecifikus kapcsolatot. A szabadon maradt S<sub>8</sub>-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.

#### 6.4 Az F-box gén alapú S-genotípus-meghatározás

Az öntermékenyülő magoncok korai kiválogatásához az S<sub>C</sub>-haplotípusra specifikus primer szükséges. Vilanova és mts. (2005) szerint az általuk tervezett, S-RN-áz allélokat 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 kajszi és 3 japánkajszi 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<sub>C</sub>-allél egy 358 bp-os inszerációt tartalmaz, a primerek által felszaporított fragmentum mérete 1419 bp, szemben az inszerációt 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) vagy az újonnan elvégzett szabadföldi vizsgálatok eredményével.

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  $SFB_4$ '-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 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 Rózsakajsi és a Magyar kajsi fajtakörbe tartozó fajták esetében (8. és 9. 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 (8. ábra).

Az *SFB*-alapú PCR-analízissel kimutatható volt, hogy a Rózsakajsi, a 'Ceglédi kedves', a 'Nyujtó Ferenc emléke' és a 'Pannónia'  $S_C S_C$  homozigóták. Ez utóbbi fajta egy Magyar kajsi változat (feltételezhető genotípusa:  $S_C S_8$ ) és a 'Borsi-féle kései rózsza' ( $S_C S_C$ ), míg

a 'Nyujtó Ferenc emléke' a 'Kései rózsza C.320' ( $S_C S_C$ )  $\times$  'Ceglédi bíborkajszi' ( $S_C S_9$ ) 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 8. ábrán látható, 300 bp-os fragmentum PCR-műtermék. Ezzel szemben a 'Venus' és a Magyar kajszi klónok  $S_C S_8$  heterozigóta genotípusúnak bizonyultak.

Mivel 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 Primerek tesztelése a polimorfizmus kimutatás hatékonysága tekintetében

A mikroszatellit régiókat határoló szekvenciák konzervatív jellege azt a lehetőséget is magában rejti, hogy valamely faj genomi szekvenciája alapján kialakított primerkészlet nem csak az adott faj polimorfizmusának kutatására lesz alkalmazható, hanem a rokon taxonokban is lehetővé teszi a mikroszatellit régiók amplifikációját (Tautz, 1989; Bell és Ecker, 1994; Guilford és mts., 1997; Sosinski és mts., 2000). Már az első, őszibarack genomi DNS-re kidolgozott SSR-markerekről is bebizonyosodott, hogy néhány más *Prunus* faj esetében is felhasználhatók (Cipriani és mts., 1999; Sosinski és mts., 2000; Testolin és mts., 2000; Aranzana és mts., 2002; Hormaza, 2002; Dirlewanger és mts., 2002). A fenti közlemények közül csak Hormaza (2002) számolt be kajszifajták vizsgálatáról. Ezen tapasztalatok felhasználásával tudtuk az **1. kísérlet** során végrehajtani a kajszii genetikai variabilitásának tanulmányozását az őszibarackra tervezett primerek (Cipriani és mts., 1999; Testolin és mts., 2000; Aranzana és mts., 2002) alkalmazásával. A munkánk során alkalmazott primerek 70%-a képes volt amplifikálni a mikroszatellit régiókat a kajsziban, amelyek közül mindegyik polimorfnek bizonyult. A lókuszosokban átlagosan 3,1 allél volt kimutatható, ami közel megegyezik Aranzana és mts. (2002) által őszibaracknál (3,2) illetve Dirlewanger és mts. (2002) által cseresznyénél (2,8) megállapított értékekkel, de elmarad a kajszii esetében Hormaza (2002) által megállapított 4,1 lókuszonkénti átlagos allélszámtól, vagy a Testolin és mts. (2000) valamint Dirlewanger és mts. (2002) által őszibaracknál (4,5 és 4,2) tapasztalt értékektől.

Az őszibarack primerek nemcsak alkalmasnak bizonyultak a kajszii mikroszatellit régióinak amplifikálására, hanem még az amplifikált fragmentumok mérettartományai is megegyeztek azzal, amit az őszibarackban írtak le (Cipriani és mts., 1999; Testolin és mts., 2000; Aranzana és mts., 2002). Kajszibarack esetében a Hormaza (2002) által detektált allélok mérettartománya is egybeesik az általunk kapott eredményekkel. Az 1. kísérletben egy lókuszos esetében (96-005) genotípusonként több mint két sávot kaptunk a gélen, ami két vagy több lókuszos jelenlétére utal. A lókuszonkénti magas átlagos allélszám (3,1), a várható heterozigótaság értéke ( $H_e=0,46$ ) és a  $PD=0,58$  nagysága megerősítette azt a feltevésünket, hogy a mikroszatellit teljes mértékben alkalmasak a kajszifajták azonosítására. Ez a rendszer hatékonyabbnak bizonyult az izoenzimeknél (Badenes és mts., 1996.), az RFLP-nél (de Vicente és mts., 1998.) és a RAPD-nál. Annak ellenére, hogy ez utóbbi elvileg nagyfokú variabilitás kimutatására alkalmas technika, Hurtado és mts. (1999) adatai szerint, primerenként mindössze

2 allél kimutatása volt lehetséges. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az SSR primerkészlet, amelyet egy adott *Prunus* faj genomja alapján terveztek, kellően informatív lehet más *Prunus* fajok tanulmányozáskor is, legalábbis azok diverzitásának leírására, illetve a fajták azonosítására. Az őszibarack primereket később is sikeresen alkalmazták kajszinál. A megjelent publikációk közül kiemelendő a széles genetikai spektrumú fajtagyűjteményt elemző Zhbentyayeva és mts. (2003) munkája.

A más fajokban kimutatott sikeres amplifikációról szóló számos bizonyíték mellett ugyanakkor felmerültek azok a feltételezések is, amelyek szerint minél nagyobb a genetikai távolság a primerek szekvenciái kidolgozásánál alapul vett genom és a vizsgált faj között, annál inkább csökken a lókuszt amplifikálásának lehetősége és a kimutatott polimorfizmus mértéke (Hormaza, 2002; Steinkellner és mts., 1997). Továbbá, a primerek nem megfelelő helyre kötődésével gyakoribbá válhat a nullallélok előfordulása (Ciofi és mts., 1998). Ezeket figyelembe véve a **2. kísérletben** nemcsak szélesítettük a vizsgált növényanyag eredet szerinti diverzitását, hanem az őszibarack primerek mellett, először teszteltük a kajszinál DNS-re tervezett primerkészlet öt tagját (Lopez és mts., 2002).

Az ebben a munkában közölt eredmények azt mutatják, hogy a kajszigenom alapján szerkesztett homológ mikroszatellit primerek hatékonyan alkalmazhatók a kajszinál alléldiverzitás vizsgálatában. Mintegy 133 fajta esetén 10 lókuszt vizsgálva összesen 133 SSR-allélt sikerült detektálnunk, ami kimagasló, 13,30-as lókuszonkénti átlagos allélszámot eredményezett. Ez az érték nagyobb, mint a korábban Hormaza (2002) által említett, 48 különböző kajszigenotípuson 19 polimorf SSR-rel kimutatott 4,1 átlagos lókuszonkénti allélszám. Szintén kisebb értékről számoltak be Zhebentyayeva és mts. (2003), amikor 74 kajszifajta vizsgálatokor 14 polimorf SSR-rel 7,64-es átlagos allélszámot mutattak ki. E kísérletünk eredménye jelentősen felülmúlta a saját korábbi kísérletünkben kapott 3,1-es átlagos allélszámot is (Romero és mts., 2003). A második vizsgálatunkban a nagyobb allélszám a kajszinál DNS-e alapján kidolgozott és a magas szintű polimorfizmus kimutatására szelektált 5 primernek, valamint a nagyszámú tesztelt fajtának köszönhető volt.

A **3. kísérletben** egy széles mintapopuláció vizsgálatára soha korábban nem használt primerkészletet alkalmaztuk, amelyet speciálisan csak a G1 kapcsoltságú csoport mikroszatellit régióira terveztek (Vilanova és mts., 2006b). Hetvenhét fajta teszteléséből 6 polimorf lókusztban összesen 71 allélt tudtunk azonosítani, amiből az egy lókuszt számított átlagos allélszám 11,83-nak adódott. Összehasonlítva az előbb felsorolt munkák eredményei-

vel, ennél magasabb értéket csak a 2. kísérletben értük el lényegesen nagyobb mintaszám és 10 lókuszt esetében. A tesztelt SSR primerkészlet polimorfizmus kimutatására való alkalmasságának értékelésénél viszont meg kell említeni, hogy 77 vizsgált fajta között 24 (31%) közép-európai fajta volt, amelyek igen szűk genetikai variabilitását az mutatja, hogy ebben a csoportban a lókuszonkénti átlagos allélszám 3,3 volt. A fenti értékek egyértelműen mutatják a G1 kapcsoltságú csoportra tervezett primerek kiemelkedő alkalmasságát a kajszi genetikai variabilitásának jellemzésére.

Ebben a kísérletben a legtöbb allélt a kínai eredetű fajtákban mutattuk ki a vizsgált lókusztok többségében (17. táblázat). Az ázsiai, észak-amerikai és nyugat-európai fajtákat a kisebb allélszám jellemezte. A közép-európai fajtákban volt a legkisebb a detektált allélok száma az összes lókuszt esetében és konzekvensen elmaradt az összes fajtára számított átlagértéktől. Ezt a régiót képviselő fajtákat a legnagyobb részben három kiemelkedő jelentőségű fajtacsoportból – a Magyar kajszi, a Rózsabarack és az Óriás kajszi – illetve ezeknek a fajtacsoportoknak a hibridjei közül választottuk. A genetikai variabilitás ezekben a csoportokban tapasztalt korlátozottságára már korábbi vizsgálataink is utaltak (Romero és mts., 2003 és Pedryc és mts., 2002.).

## 6.6 A polimorfizmus populációgenetikai jellemzői

Az 1. kísérletben az allélszintű diverzitást kifejező  $H_e$  és PD értékek a kajszi esetében nagyobbak voltak azoknál, amelyeket az őszibarack esetében állapítottak meg (Aranzana és mts., 2002; Dirlewanger és mts., 2002). Ennek oka a kajszi fajta egy részére jellemző önmeddőség, tehát az allogámia szükségszerűsége, ami minden bizonnyal magasabb szinten tartja a  $H_e$  értéket az öntermékenyülő őszibarackhoz képest (Byrne, 1990).

A Wright-féle allél-fixációs index átlagos értéke ( $F=0,32$ ) a homozigóták nagyobb gyakoriságára utal. Ez a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés oka mindenképpen az alkalmazott nemesítési eljárásokban keresendő. Az a tény, hogy a kajszi fajta egy része önmeddő, megengedi azt, hogy a természetett fajták is nagyobb mértékű heterozigótaságot őrizzenek meg. Ezzel szemben viszont az általánosan használt nemesítési módszerek között gyakran alkalmazott öntermékenyítés, vagy a beltenyésztés kialakulásához vezető korlátozott fajtaszámmra épülő nemesítési programok minden kétséget kizáróan növelik a homozigóta lókusztok arányát a genotípuson belül (Aranzana és mts., 2002.). Hasonló eredményhez vezethet az öntermékenyülő fajta helyi spontán magoncainak szelektálása.

A **2. kísérlet** eredményei azt mutatták ki, hogy a 10 lókuszt megfigyelt átlagos heterozigótasága  $H_e=0,6281$  volt, ami magasabb, mint a Romero és mts. (2003) és Zhebentyayeva és mts. (2003) által őszibarack primerekkel megállapított értékek (az előbbi esetben 0,320, az utóbbi vizsgálatnál 0,517). A nagy allélszám és a nagy heterozigótaság, különösen alkalmassá teszi az SSR-markereket a genotípusok egyedi genetikai profiljainak leírására. Az  $F_{ST}$ -értéket a populációgenetikában a heterozigótaság (variabilitás) részpopulációkban és egész populációban való eloszlásarányának kifejezésére használják. Az ivaros úton szaporodó fajok populációinak jellemzésére használt mutatók alkalmazása a vegetatív szaporítású, termesztett gyümölcsfajták esetében óvatosan kezelendő. Ugyanakkor nem tekinthetünk el attól, hogy a jelenlegi fajtacsoportok magukban hordozzák a természetes ősi populációkra jellemző, kimutatható és bizonyos mértékben módosuló allélvariabilitást. Wright-nak megfelelően a 0,25 fölötti  $F_{ST}$ -értékek nagyon nagy genetikai differenciálódást mutatnak (Hartl és Clark, 1997). Mivel az általunk vizsgált mintákban az  $F_{ST}$ -értékek átlaga 0,5768 (14. táblázat) volt, megállapítható, hogy a fajták között relatíve nagy a genetikai különbözőség. A vizsgálatainkban megállapított magas  $F_{ST}$ -értékek a fajták közötti nagy variabilitásra utalnak, amelynek kialakulása a kismértékű génáramlással magyarázható. Erre utalnak a 3. táblázatban bemutatott  $N_m$  értékek is. Ezek az eredmények a fixált genotípusú fajták egymás közötti különbözőségének fokára utalnak, és nem adnak információt – az itt nehezen értelmezhető – egész populációra nézve.

A **3. kísérletben** a  $H_e$  érték a 0,4607–0,8339 tartományba esett, ami csak alig szűkebb a Vilanova és mts. (2006b) ugyanezzel primer-készlettel kapcsolatban leírt 0,37–0,82 közti méreteket magába foglaló tartománynál, de valamivel tágabb, mint a 2. kísérletben megállapított 0,5949–0,8487-es intervallum. A 24 tesztelt fajtából 21 öntermékenyülő (SC) volt csupán néhány, nagyon gyakori *S*-genotípussal (Halász és mts., 2007). Az SC fenotípus és az abból eredő beltenyésztés, valamint a genetikai drift mint a hagyományos fajták szelektálásának egyik következménye, szintén magyarázata lehet annak, hogy a heterozigótaság átlaga a 6 lókuszban a közép-európai fajták esetében volt a legkisebb ( $H_e=0,4405$ ). Nagyobb  $H_e$  értéket figyeltünk meg a mediterrán fajták esetében, amelyek közé két önmeddő (SI) ('Moniqui' és 'Hatif Colomer') és rendkívül eltérő eredetű SC fajták (francia, olasz, görög és marokkói) tartoznak. A vizsgált ázsiai és kínai fajták közül egyik sem rendelkezik az SC genotípus által támogatott öntermékenyülési képességgel, ami közvetett oka lehetett annak, hogy ezekben a fajtákban mértük a legmagasabb  $H_e$  értékeket. Ehhez hasonlóan Martínez-Gómez és mts. (2003) megállapították, hogy a heterozigótaság mértéke magasabb volt az SI mandulafajtákban, mint az SC őszibarackfajtáknál.



Mivel a genetikai heterozigótaság transzmissziója lehetséges a magas heterozigótaság fokú, nem rokon genotípusokkal való keresztezés révén (Sánchez-Pérez és mts., 2006), a közép-ázsiai és/vagy iráni-kaukázusi génállomány beépítése a magyar fajtákba megoldást kínálhat a hibridek genetikai variabilitásának növelésére. Ezt a stratégiát a két Magyarországon regisztrált, és a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszéken előállított fajtán, a Harmat és a Korai zamatos példáján jól lehet szemléltetni (Halász és mts., 2005). Ez a két fajta jelen vizsgálat keretében az ázsiai csoportba került, mivel iráni-kaukázusi szülőfajtáktól származnak, és hibridek lévén megőrizték a nagyobb fokú heterozigótaságot, miközben – különösen a Korai zamatos esetében – fenotípusukban kimutathatók a hagyományos magyar fajták egyes jellemzői.

## **6.7 A fajták egyedi azonosítása**

Az **1. kísérletben** a mikroszatellitok által biztosított variabilitás mértéke bőven elegendő volt az összes vizsgált fajta azonosításához, beleértve azokat is, amelyek közös szülői vonalakkal rendelkeztek. Ilyen például a Goldrich és a Harcot, amelyeknél a Perfection fajta szerepelt egyik szülőként (Brooks és Olmo, 1997.), vagy az Iszkra, Olimp és Naslazsdenje fajtáknál, ahol a Vinoszlivij volt a közös ős (4. táblázat). Néhány fajtapár genotípusai között azonban csak kismértékű eltérést tapasztaltunk. A Borsi-féle kései rózsza és Rózsakajszai C.1406 esetében például a 34 marker közül 32 azonos volt mind a két fajtában. Ez a nagymértékű egyezés a két fajta feltehető közeli rokonságára utal, mivel a fenotípusos megjelenésük alapján mindkettő a Rózsabarack fajtacsoport tagja (Della Strada és mts., 1989). A 3. kísérlet esetében, a vizsgált hat lokusz allélvariabilitása a magyar eredetű fajtákat nem minden esetben volt képes teljesen megkülönböztetni.

## **6.8 A vizsgált fajták és fajok genetikai kapcsolatainak elemzése klaszteranalízissel**

### **6.8.1 1. kísérlet**

A negyven vizsgált genotípus klaszteranalízise egybe csoportosította a kelet-európai fajtákat a Bergeron és Mitger fajtákkal, de elkülönítette azokat a nyugat-európai fajtáktól. Mindez arra utal, hogy két különálló fajtacsoportról van szó, bár világosan láthatóak a köztük közti átmenetek is, mint például a fent említett két fajta. A két csoport közötti átfedés oka egyrészt a hibridizációban, másrészt pedig a nyugat-európai fajtacsoport kialakulásának egyik potenciális módjában keresendő. Egyes szerzők szerint ugyanis feltételezhető, hogy a francia fajták azokból az ősi török fajtákból alakultak ki, amelyeket Magyarország közbeiktatásával

szállítottak Nyugat- Európába (Faust és mts., 1998). Ezt az elképzelést alátámasztja az is, hogy az első klaszter az összes kelet-európai fajtát és az ázsiai fajták többségét tartalmazza, ezzel kifejezve azok genetikai közelségét (12. ábra).

A klaszteranalízis alapján a magyar fajták is két alcsoportra oszthatók, amelyek eredetüknek felelnek meg. Az egyik a Rózsabarack fajtacsoport, a másik pedig a Magyar kajsi csoportba tartozó fajták köre. Ezen fajták eredete a török hódoltság időszakára nyúlik vissza (Nyújtó és Surányi, Faust és mts., 1998). A második klaszter is két alklaszterre oszlik. Az egyik alapvetően az amerikai, a másik pedig a nyugat-európai fajtákat foglalja magába. Az irodalmi adatoknak megfelelően az egyes amerikai fajták az európai és az ázsiai genotípusok keresztezéséből keletkeztek (Kosztina, 1969; Bailey és Hough, 1975; Badens és mts., 1996). Ez magyarázatot adhat arra, hogy a Fergani és Kok-pszár az észak-amerikai fajták csoportjába került. Nem mellékes tény, hogy néhány allél kifejezetten jellemző volt éppen erre a két csoportra, mint például a 96-018a és 98-408a. A fenti két fajtán kívül még a későn érő spanyol Tadeo is egy klaszterbe került az észak-amerikai fajtákkal. Ez az eredmény megegyezik a Hurtado és mts. (1999) által közölt adatokkal, amelyek szerint a RAPD-elemzés alapján kiszámított Nei azonossági index nagyobb volt a Tadeo és Harcot (0,68) illetve a Tadeo és Goldrich (0,73) között, mint a Tadeo és a Ginesta (0,43) illetve a Tadeo és Valenciano (0,53) között. A Ginesta és Valenciano fajták ugyanakkor számításaink szerint genetikailag nagyon közel állnak egymáshoz, ami már korábban az izoenzimintázat (Badenes és mts., 1996), valamint RAPD- és AFLP-analízisek (Hurtado és mts., 1999; Hurtado és mts., 2002) alapján is bizonyítást nyer. A harmadik klaszter, távol a többitől, az örmény fajtákat foglalja magába. A határozott elkülönítésnek egyik oka az, hogy itt nyolc olyan allélt sikerült detektálni, ami teljesen hiányzik ebből a csoportból, a többi csoportban viszont jelen van. Ez alapján levonható lenne az következtetés, mely szerint az örmény fajták, korlátozott genetikai variabilitású genotípusokból származnak, de a valósághoz hozzátartozik, hogy a tanulmányunkban kevés (mindössze 6) örmény fajtát tudtunk elemezni, melyek eredete nagy valószínűséggel a Salah fajtára vezethető vissza.

Ennek a munkának fő célja a mikroszatellit markerek alkalmazhatóságának vizsgálata volt a genetikai diverzitás vizsgálatára kajszibaracknál. Eredményeink egyértelműen kimutatták az SSR markerek előnyeit és hatékonyságát ezen a kutatási területen.

## **6.8.2 2. kísérlet**

Az UPGMA klaszterelemzés alapján készült dendrogram számos szignifikáns csoportot hozott létre, amelyek összefüggésben vannak az ezeket alkotó fajták pedigréjével, illetve a genotípusok földrajzi eredetével. A vizsgált európai fajták legtöbbször az 1.2 alcsoportba tartozik. Közép-és Kelet-Európában – elsősorban a Kárpát-medencében – elterjedt egy sor nagygyümölcsű és édes magvú fajta, amely az öntermékenyülő Magyar kajszifajtacsoporthoz tartozik. A nemesítés során ezeknek a fajtáknak számos hibridjét is létrehozták. Az egy csoportba tartozó klónok különböző elnevezései – legalább néhány esetben – valószínűleg szinonimák. A mikroszatellit variabilitásának adatai alapján megállapítható, hogy feltételezéseink szerint 18 ebbe a csoportba tartozó fajta közül 15 szoros rokonságban van, és közülük 5 (Albena, Andornaktályai magyarkajszifajta, Crvena ugarska, Gönci magyarkajszifajta és Nagygyümölcsű magyarkajszifajta) esetben az eltérő elnevezések mögött azonos genotípus jelenléte is lehetséges (14. ábra). Három fajta (Mari de Cenad, Szilisztrénka kompotna és Vesna) klasztere igen messze esett a csoport többi tagjától. Világosan elkülönül a magyar „óriás kajszifajták” csoportja. Az ide tartozó Ceglédi óriás, Szegedi mammut és Ligeti óriás fajták teljes azonosságot mutatnak. A korábbi RAPD-elemzés is azonos eredménnyel zárult e fajták esetében (Pedryc és mts., 2002; Ruthner és mts., 2003). A Ceglédi óriás és a Szegedi mammut szinonim elnevezések. A Ligeti óriás viszont kevés pomológiai bélyegben (pl. érésidő) különbözik a Ceglédi óriástól (Mády és Szalay, 2003). A ceglédi nemesítésű fajták jellegzetes klasztert alkotnak. Mind a három vizsgált fajta pedigréjében szerepel a Ceglédi óriás, de ennek ellenére viszonylag távol esnek ettől a fajtától. Feltűnő viszont a Rózsabarackokhoz való közelség. A Ceglédi arany (Rózsabarack C.1668 × Ceglédi óriás) esetében ez a fajta eredetével magyarázható, de ez lehet a magyarázat a Ceglédi kedves esetében is, amely a Ceglédi óriás szabad megporzásából jött létre (Mády és Szalay, 2003). A román nemesítési programból származó Comandor, Sirena, Litora, Selena és Sulmona fajták az Umberto, Ananas és Luizet fajták keresztezéséből jöttek létre, és ennek megfelelően a dendrogramon mind egy klaszterbe kerültek. Érdekes módon a francia Luizet fajta a Magyar kajszifajtacsoporttal egy klaszterbe került. A Magyar kajszifajta feltételezett helyéről a Luizet pedigréjében már korábbi közleményekből is tudomást lehetett szerezni (Faust és mts., 1998; Hormaza, 2002).

A tanulmányunkban az SSR-variabilitás alapján kimutatott fajtakapcsolatokat korábbi erre vonatkozó információk is megerősítették. A Hormaza (2002) által közölt dendrogramon a Bergeron, Gönci magyarkajszifajta és Luizet szorosan egymás mellett foglaltak helyet, egy klaszterben. Geune és mts. (2003) az AFLP-markerekkel kapott eredményei szerint a Budapest, Bergeron, Ananas, Comandor, Selena, Ceglédi óriás, Ceglédi bíbor és Magyar kajszifajta

---

szintén egy klaszterbe kerültek. A Bergeron RAPD-elemzések során is következetesen a Magyar kajszi fajtacsoporthoz közeli besorolást kapott (Pedryc és mts., 2002; Ruthner és mts., 2003).

A Klosterneuburger kajszi egy alsó-ausztriai helyi fajta, aminek feltehetően magyar az eredete. A vita, hogy talán azonos a Magyar kajszi valamelyik klónjával már a múlt évszázadban megkezdődött. A gyümölcsöt első alkalommal 1898-ban a bécsi, majd 1901-ben a kremsi kajsziállításon sorolták be mint Hungarian Best fajtát. Az 1943-as bécsi és kremsi kiállításon azonban a két fajtát már elkülönítették (Lösching és Passecker, 1954). Adataink világosan mutatják, hogy két külön fajtáról van szó. A Vinschger Marille és az Annanasznij cjurpinski egy klaszterbe kerültek. Közös genetikai hátterük nem kizárt.

Az 1.1 és az 1.3 alcsoportok a nyugat- és kelet-európai, valamint a legtöbb észak-amerikai fajtát magukba foglalják. A Harcot, Veecot, Bahrt (Orangered) és Morden-604 fajták közép-ázsiai fajtákkal közös helye az 1.3 alcsoportban bizonyítéka annak, hogy a legtöbb amerikai fajta mellett, hogy európai genetikai alapokra vezethető vissza ázsiai eredetű génekkel is gazdagodott. Ezek az eredmények megegyeznek azzal a feltevessel, hogy a kajszi-fajták Kínából kerültek Örményországba, majd a rómaiak (ie. 70–60) közvetítésével Görögországon és Olaszországon át kerültek Európába (White, 1970). A kajszi egyes fajtái az USA-ba az angol telepesek és a spanyol misszionáriusok révén kerültek be, részben Európából, de részben Ázsiából (Faust és mts., 1998; Hagen és mts., 2002; Mehlenbacher és mts., 1991; OECD, 2002). Hagen és mts. (2002) arról számoltak be, hogy az észak-amerikai Veecot fajta genetikai rokonságot mutat egy török fajtával, míg Geuna és mts. (2003) szerint a Veecot – más észak-amerikai fajtákkal együtt – a Jerevani (szin.: Salah) fajtával van rokonságban.

A 2. klaszter, a különböző allélok nagy változatosságával csak az ázsiai genotípusokat (pakisztáni magoncok) tartalmazta. Ez a csoport kitűnő példa arra, hogy a ma termesztett fajták elődeinek természetes populációi, mennyire voltak képesek fenntartani nagyfokú variabilitásukat. Ennek egyik legfontosabb „eszköze” az a bonyolult genetikai rendszer, amely biztosítja az allogámiát, és ennek köszönhetően gátolja az egyes allélok fixálódását homozigóta állapotban, illetve ezek kiszorulását a populáció génállományából. A vizsgálatban felhasznált pakisztáni magoncok egy ilyen populáció képviselői, amely egyrészt megtartotta egyedi voltát és emiatt vált el a többi klasztertől, de ugyanakkor a populáción belüli variabilitás nem engedte, hogy a populációból kiemelt viszonylag kisszámú minta alapján elváljanak egymástól az alklaszterek szintjén (Zohary és Hopf, 1994). Ázsia legtöbb területén, a kajszi domesztikáció-

ja a természetes magoncok révén történt meg, ami lehetővé tette a faj jelentős genetikai diverzitásának megtartását. Ezzel szemben Európában a termesztési célra leginkább megfelelő klónokat szelektálták és vegetatív szaporítás útján tartották fenn (Hagen és mts., 2002; Zhebentyayeva és mts., 2003). Ez a gyakorlat óhatatlanul jelentős génerózióhoz vezetett, amit nagyon jól példáz a magyar fajtakörben tapasztalt korlátozott variabilitás.

A 14. ábrának megfelelően a jól ismert eredetű, közép-ázsiai Zard fajta közel áll a Zaposzdojje fajtához, aminek földrajzi eredetéről nem rendelkezünk semmilyen hiteles információval. Elemzésünk azonban megerősíti az ázsiai allélok jelenlétét a Zaposzdojje fajtában.

### **6.8.3 A *Prunus armeniaca* termesztett fajtáinak, plumcot és néhány rokon faj genetikai kapcsolatának elemzése klaszteranalízissel**

A rokon fajokkal való összehasonlításban a közönséges kajszii *P. armeniaca* termesztett fajtái egy klaszterbe tartoznak, egyértelműen jelezve a közös genetikai hátteret. Ettől a csoporttól a *P. brigantiaca* áll a legtávolabb (15. ábra). Ez a faj számos morfológiai jegyben jelentősen különbözik a *P. armeniaca*-tól, amit a molekuláris elemzések többször is alátámasztottak. Takeda és mts. (1998) és Hagen és mts. (2003) RAPD- és AFLP-markerek alkalmazásával az *Armeniaca* szekción belül, a *P. brigantiaca*-t helyezte el a legtávolabb a *P. armeniaca*-tól. A *P. ×dasycarpa* és a Plumcot, a *P. armeniaca* × *P. cerasifera* és a *P. armeniaca* × *P. salicina* hibridjei. A 15. ábra szerint is a *P. brigantiaca* és más kajszii fajok között helyezhetők el a genetikai különbözőség alapján. Ezeknek a fajoknak a *P. brigantiaca*-hoz és *P. armeniaca*-hoz való viszonyát Takeda és mts. (1998) valamint Hagen és mts., (2003) szintén megerősítették.

## **6.9 Az öko-földrajzi csoportok közötti genetikai viszony**

A kajszifajták hagyományos taxonómiája a fiziológiai és morfológiai bélyegek összehasonlításán alapul és négy fő ökoföldrajzi csoportot tart számon (Kosztina, 1969). Ezek közül hármat elemezhettünk az 1. kísérlet eredményei alapján: a magyar, a nyugat-európai és az észak-amerikai fajtákat magában foglaló (1) európai csoportot, (2) az örmény fajtákat tartalmazó iráni-kaukázusi csoportot, és a (3) közép-ázsiai csoportot. A 13. ábra szemlélteti az UPGMA klaszteranalízis alapján megállapított genetikai viszonyokat a csoportok között. A számításokban nem vettük figyelembe a csoportok közötti keresztezésekből nyert hibrideket. A nyugat-európai és észak-amerikai fajták klasztereinek közvetlen kapcsolata megfelelt annak

a korábbi feltételezésnek, hogy az amerikai fajták az európai fajtacsoportnak közvetlen lezármazottjai (Kosztina, 1969; Bailey, és Hough, 1975; Badenes és mts., 1996). A **2. kísérlet** keretében is ugyanannak a három csoportnak a genetikai kapcsolatát tudtuk tanulmányozni. Ebben az esetben is egy klaszterbe került az észak-amerikai csoport és a nyugat-európai csoport, megerősítve az előbb leírt következtetéseket az amerikai fajták összetett eredetére vonatkozólag.

Az európai fajtacsoporton belüli további alcsoportok definiálása nem egyszerű, már a csoporton belüli keresztezés lehetősége miatt sem. Ennek ellenére egyes szerzők kiemelik a kelet-európai fajtacsoportot, mint az európai fajták egy jellegzetes típusát (Kosztina, 1996; Kovalev, 1970). Az **1. kísérlet** adatai alapján elvégzett klaszteranalízis a kelet-európai csoportot képviselő magyar fajtákat közelebb helyezte el az ázsiai fajtákhoz, mint a nyugat-európai fajták csoportjához. Ettől függetlenül kimutathatóak voltak olyan allélok – pl. a 96-010c, amelyek úgy a kelet-európai, mint a nyugat-európai fajtákban jelen voltak. A **2. kísérlet** is alátámasztotta az előbbi megállapításokat azzal, hogy az iráni-kaukázusi és a kelet-európai fajták csoportja ebben az esetben is közeli kapcsoltságra utaló két alcsoportot alkotnak. Ezek az eredmények a kajszi ázsiai géncentruma irányából való terjeszkedés mentén a magyar eredetű fajtakört egy közbülső állomás szerepébe helyezik. A vándorlás során fellépő, a faj genomját modifikáló folyamatok fontosságát korábban már hangsúlyozta Crossa-Raynaud (1960) és Faust és mts. (1998).

A 3. kísérlet eredményeinek kiértékelésénél a szokásos dendrogram helyett egyfajta hisztogramot szerkesztettünk az alléleloszlás ábrázolására. A kizárólag egy földrajzi régió fajtáiban azonosított egyedi allélok eloszlása könnyen követhető az 16. ábrán. Az összes kimutatott allél 35%-a egyedi volt. A legtöbbjüket (13) a kínai fajtákban figyeltük meg; miközben az ázsiai, észak-amerikai és mediterrán fajták rendre 8, 3 és 1 egyedi méretű allélt hordoztak. A közép-európai fajtákban egyetlen egy egyedi allélt sem találtunk. A csak a kínai fajtákra jellemző allélvariánsokat az őszibarack SSR-primerek alkalmazásával Zhebentyayeva et al. (2003) is kimutatta 5 lókuszban. Ugyanakkor az előző közlemény szerzői nem találtak egyedi allélokot semmilyen más ökoföldrajzi csoportban. Eredményeink azt mutatják, hogy Kínából Európa felé haladva fokozatosan csökkenő számban ugyan, de a legtöbb csoportban található egyedi allélok. Az egyedi allélok jelenléte az észak-amerikai és a mediterrán fajtákban természetes következménye az azokban a régiókban megvalósított nemesítési programoknak, amelyekben a helyi fajtákon kívül az ázsiai, marokkói alapanyagokat valamint sok esetben az

ázsiai szülőktől származó amerikai genotípusokat alkalmazták (Ledbetter és mts., 2006; Sánchez-Pérez és mts., 2005).

Az 16. ábra jól szemlélteti a különböző földrajzi génállományok közös alléljait. A földrajzi csoportokra jellemző allélmintázatokat lyukkártyaszerűen egymásra helyezve, egyfajta szintézis révén kimutathatóvá válnak az egyedi és közös allélok. Ez az elemzés azt mutatja, hogy az észak-amerikai és a mediterrán fajtákban kimutatott allélok 67%-a mind a két fajtacsoportban előfordul (17a. ábra). Ez igazolja az ezen régiók kajszinemesítési programjai között meglévő kapcsolatot. Ahogy azt az előbb is láthattuk, ez lehet a magyarázata annak is, hogy a mediterrán és az észak-amerikai fajták miért hordoznak az ázsiai és kínai fajtákkal közös allélokat. A legkevesebb közös alléllal a kínai és a közép-európai fajták rendelkeznek (17b. ábra), jelezvén, hogy ezek a csoportok csak távoli rokonságban állnak egymással. Ez az ábra a hagyományos dendrogramokhoz képest nagyon hasonló információkat tartalmaz, ráadásul nem fedi el az eredeti allélméreteket sem.

Az 16. ábrán jól látható, hogy minden lókuszon a leggyakoribb allélok mellett, jelentős számmal felfedezhetők olyan allélok, amelyek mérete kevéssel (2–8 bp) elmarad a leggyakoribb allélok méretétől. Mindez az SSR-régiók rövidülésével magyarázható. Hasonló tendenciákat más élő szervezetekben is megfigyeltek (Ellegren és mts., 1997). Az aprigms1 és az aprigms11 lókuszokat leszámítva, a kínai fajták jelentősen rövidebb allélokkal rendelkeznek, mint más genotípusok. A kínai és a közép-európai fajták közötti különbség ebben a tekintetben, talán azzal a feltevéssel magyarázható, hogy az európai fajták történetében a vegetatív szaporítás már mintegy 500 évre tekint vissza, így az ivaros úton létrejött generációk száma kevesebb, mint a hosszú időn keresztül ivaros úton szaporodó kínai kajszifajták esetében (Faust és mts., 1998). Jelenlegi ismereteink alapján azonban nem zárható ki, hogy a relatíve rövidebb SSR-allélok jelentik az eredeti állapotot és a hosszúnövekedés az ismétlődő motívumokra jellemző elongációnak vagy transzpozonszerű elemeknek köszönhető (Amos és Rubinsztein, 1996; Bennetzen, 2000; Weising és mts., 2005). Mindez összhangban van a genom méret általános növekedésével, amit viszonylag rövid evolúciós időtartam alatt is megfigyeltek számos növény esetében (Hawkins és mts., 2008). Az allélméreteket eltérésének vizsgálata érdekes evolúciós kérdéseket vethet fel.

## 6.10 Milyen információkat adhatnak a molekuláris vizsgálatok (SSR és $S$ -genotípus) a kajszi kultúrevolúciójáról?

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’, ‘Magyar kajszi’ és ‘Kései rózsá’ pollenkeverékes megporzásából keletkezett. A pollenadó fajták közül a ‘Magyar kajszi’ 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 kajszi 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 kajszifajta 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.



Ez a kapcsolat viszont a markerelemzések során többször is sikerült kimutatni. A dolgozatban bemutatott dendrogramon Luizet fajta a Magyar kajszifajtacsoporttal egy klaszterbe került. Hormaza (2002) adatai szerint is Bergeron, Gönci magyar kajszifajta és Luizet genetikai hasonlóságot mutatnak. RAPD módszerrel kimutatott variabilitást vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy Bergeron következetesen magyar fajtákkal kerül egy csoportba a klaszteranalízis során. (Pedryc és mts., 2002; Ruthner és mts., 2003). Egybevetve a *S*-lókus vizsgálatának és a különböző genetikai markerek változékonyságán alapuló tapasztalatokat, megerősödik az az elképzelés, hogy francia kajszifajták változékonyságában magyar elemek is találhatóak.

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 szelektációs 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 kajszifajta elterjedésének északi határát képezik (Faust és mts., 1998), eredményeink is alátámasztják.

Az öntermékenyülő Magyar kajszifajtakör 5 különböző országból származó 9 fajtája azonos,  $S_C S_8$ -genotípussal rendelkezik. Ez a genotípus csak a Magyar kajszifajtakörbe tartozó klónok vagy az azokkal rokon fajtákban mutatható ki. Ezek alapján feltételezhető, hogy a Magyar kajszifajta 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 pollenképes volt az öntermékenyítésre. A jelenleg ismert  $S_C S_8$ -genotípusú Magyar kajszifajta 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 Magyar kajszifajtakör rokonaként említik (Faust és mts., 1998). Mindezt a leszármazottjai között számon tartott román fajták ('Callatis', '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.

Figyelemmel kísérve az *S*-genotípus kialakulásának jellegzetességeit, az  $S_C$  allél megjelenését és terjedését, valamint szem előtt tartva a markerek biztosította genetikai polimorfizmus adatait, feltételesen felvázolhatjuk a magyar fajtákra jellemző, erősen korlátozott genetikai variabilitás okait. A polimorfizmus leírására alkalmazott paraméter egyike a megfigyelt

heterozigótaság ( $H_o$ ). Ennek értéke például a 2. kísérletünkben elemzett közép-európai fajták csoportja esetében, egyértelműen alacsonyabb a többi csoporthoz képest. A közép-európai fajták jelentős fokú heterozigótaság csökkenésére utal a megfigyelt és elméletileg várt heterozigótaság ( $H_e$ ) összehasonlítása is. Amennyiben az elméleti érték ( $H_e$ ) magasabb, mint a valóban tapasztalt heterozigótaság mértéke ( $H_o$ ), akkor a kimutatott allél frekvenciájához képest kevesebb a heterozigóta, a „hiányzó allélfrekvencia” pedig a homozigóták arányát növeli. Ez a legegyszerűbb esetben a beltenyésztés hatásával magyarázható. A beltenyésztés mindenképpen a rokonok közötti szaporodási rendszert jelenti, ami felléphet a populációméret csökkenéséből adódóan vagy azokban a nemesítési rendszerekben, ahol például visszakeresztezést vagy öntermékenyítést alkalmaznak nemesítési módszerként, esetleg korlátozott számú alapanyaggal dolgoznak.

Ezekben a számokban a hagyományos fajták – tehát nem a közelmúltban előállított hibridek – esetében több évtizedes (évszázados) múltnak a vegetatív szaporítással genotípusokban rögzített képét detektáljuk és nem egy dinamikus egyensúlyt fenntartó, vagy valamilyen hatás (mutáció, beltenyésztés stb.) miatt a genetikai szerkezetét módosító populációt elemezzük. Ez kissé hasonlít arra a helyzetre, amikor csillagász ma elemezve valamilyen csillag szinképét nem a mára, hanem néhány milliárd évvel ezelőtti világra vonatkozó információkhoz jut hozzá. Így kezelve a fent említett értékeket, feltételezhetjük, hogy a ma termesztett, egymástól alig különböző magyar kajszai klónok egy viszonylag kisméretű helyi populációban szaporodtak, és ez vezetett a variabilitás bizonyos mértékű csökkenéséhez. Ez azonban egy túlságosan leegyszerűsített magyarázat lenne. Nem szabad elfelejtenni még néhány lényeges, a populációk összetételét befolyásoló tényezőről, nevezetesen a genetikai *driftről*, a természetes és ember által kivitelezett szelekcióról, a mutációkról és ezek kölcsönhatásairól.

A kajszibarack jelentőségének növekedése Magyarországon egyértelműen a török hódoltsággal hozható összefüggésbe. A törökök a hazai, genetikailag igen változatos másodlagos géncentrumból szükségszerűen csak „mintányi” mennyiségű kajszimagot hozhattak ide. Ráadásul, semmilyen érdekük nem fűződött a véletlenszerű mintaszedéshez, sőt, nem nagy kockázattal kijelenthetjük, hogy biztos, hogy az akkori fogyasztók által preferált típusok kerültek Magyarországra. Mivel a ma termesztett hagyományos török fajták között jelentős számban található öntermékenyülő és önmeddő fajták, nagy valószínűséggel az akkor behozott növényanyagban is fellelhető volt mindkét termékenyülési fenotípus. Sajnos nincs ismeretünk arra vonatkozólag, hogy a törökök ebben az időben jelentős figyelmet szenteltek volna

az öntermékenyülő egyedek kiválogatására vagy sem. Mivel Törökországban a vadon élő vagy akár kertekben nevelt állományokat egyaránt vélhetőleg nagy diverzitás jellemezte, a termékenyülés feltehetően nem jelentett problémát. Ennek megfelelően akár oltóvessző, akár mag formájában hoztak magukkal szaporítóanyagot, ezek, ha tartalmazták is az öntermékenyülést kialakító, mutáns allélt, mellette számos „vad típusú”, önmeddőséget kódoló allél is jelen lehetett a behozott genotípusokban. Ezzel a folyamattal tulajdonképpen lezajlott az első, részpopuláció kialakításával járó *drift* hatás, tehát a véletlenül alapuló allélgyakoriság változása az eredeti populációhoz képest. Véletlen alatt ebben az összefüggésben, a természetes szelekció hatásait nélkülöző allélváltozást kell érteni.

Nincs alapja annak a feltételezésnek, hogy a későbbi években, a kajszibarack Magyarországon vadon élő populációk formájában élne, ami biztosítaná a már csökkentett variabilitás megőrzését, a beltenyésztés elkerülésével. Sokkal valószínűbb, hogy a magról történő szaporítás sok kis helyi populáción belül történt. Ezeken a területeken már megjelenhetett az öntermékenyülő formák iránti preferencia, mert ha nem állt rendelkezésre megfelelő és elegendő porzópartner, az önmeddő egyedek termékenyülése elmaradhatott az öntermékenyülöktől. Mindez további arányeltolódást jelentett a homozigótáság növekedése irányába. Viszont ez a folyamat önmagában csak reverzibilis, genotípus frekvenciát érintő eltorzításokat eredményez a Hardy-Weinberg egyensúlyhoz képest, de nem változtatja az allélgyakoriságokat, tehát elvileg a kis populációk variabilitása még nem térhetett el jelentősen a behozott mintákhoz képest. A kajszitermesztés ezen szakaszában feltehetően együttesen érvényesült a természetes szelekció és a valószínűleg nem túl szigorú, de biztosan ki nem zárható, emberi preferenciákon alapuló szelekciós hatás. A természetes szelekció hatása drámai mértékű lehetett, hiszen a kajszit Törökország viszonyaitól merőben eltérő ökológiai körülmények közé került. Ezek a szelekciós tényezők már az allélgyakoriságokat is érintik és így irreverzibilis genotípus gyakoriság-eltolódások keletkezhetnek a különböző termesztési körzetek között akkor is, ha a kezdeti minta homogén lett volna.

Az öntermékenyülés megjelenése akár a másodlagos géncentrumban, akár később, az eddigi pánmiktikus rendszertől csak kis mértékben eltérő populációkban már drasztikus hatásokkal járt. Az eddig csak a kisebb mértékű beltenyésztés és szelekciós hatások által befolyásolt populáció genotípus- és allélgyakorisága többé-kevésbe a Hardy-Weinberg egyensúly körül oszcillált. Ezek a hatások legfeljebb a nagyon ritka, vagy nagyon gyakori allélokot zárták ki vagy fixálták a helyi populációkban. A  $p=0,5$  értéket megközelítő allélok kiesése vagy

fixációja, néhány tucat nemzedék alatt ilyen körülmények között kizártnak tekinthető. Az öntermékenyülés viszont a mutáns utódokban 50%-kal növelné a homozigóta lókuszok számát a két allélos rendszerben számolva. Sokallélos lókuszokban ez a folyamat természetesen lassabb, de nagyságrenddel erőteljesebb a közel pánmiktikus állapothoz képest. Ekkora változás a genotípusban nyilván jól látható fenotípusbeli módosulásokat is eredményezett. Szem előtt tartva a mai beltenyészített hibridek előállítását, okunk van feltételezni, hogy ezzel a lépéssel az eddigi populációk fenotípusbeli megjelenése jelentős változásokon mehetett keresztül. Ehhez hozzájárult az is, hogy a populációterhet jelentő, általában kis gyakoriságú, recesszív és kedvezőtlen hatású, de a kis frekvenciájuk miatt, döntően heterozigóta formában lévő allélok hirtelen jelentek meg homozigóták állapotban, ezzel utat nyitva a természetes szelekció érvényesülésének. Minél kisebb volt a populáció, annál inkább feltűnő lehetett a nemzedékről nemzedékre fellépő fenotípus differenciálódás.

Mindezeket figyelembe véve logikusnak tűnik, hogy a magyar fajták esetében tapasztalt kisebb mértékű heterozigótaságban visszatükröződnek ezek a genotípusokat formáló események. Amennyiben így van, akkor azt is kell feltételezni, hogy a vegetatív szaporításra való áttérés csak ezután következett be. Ahogyan arra már Entz Ferenc is utalt számos írásában, valószínű, hogy az ország különböző tájain a magyar kajszit hosszú időszakon át magról szaporították. Ez az időszak lehetőséget adott a kedvezőtlen, vagy akár letális allélok kiválogatására miközben a homozigótaság jelentős mértékben fokozódott. A XX. század elején a klónszelekciós munka kezdetét követően a vegetatív szaporítás a magyar kajszi génállományában bekövetkező, és most már erőteljes *drift* hatást eredményezett, amikor az eddig fenntartott helyi populációk, néhány természetesen genotípusra szűkültek, amelyek között ma már csak a nemesítői műhelyekben következik be a géncsere. Semmi okunk nincs arra, hogy azt higgyük, hogy a vegetatív szaporítás rövid idő alatt teljesen kiszorította volna a populációk fenntartását, mint a termesztés extenzív formáját. Ezt a formát Törökországban még ma is használják. Ebben az esetben viszont megérthető, hogy mégis miért keletkeztek Magyarországon olyan fajták, mint a Mandulakajszi, vagy a Ceglédi bíbor, amelyek teljesen eltérnek a magyar kajszi típustól, és mindenek előtt, miért maradt meg az önmeddő Óriás fajták köre.

A munkánk során nyert adataink alapján a fent leírtaknak megfelelően, nagyon valószínűnek tartom, hogy a mai hagyományos magyar fajták csak a leszármazottjai azoknak az iráni-kaukázusi eredetű fajtáknak, amelyek ide kerültek a török hódoltság alatt. A magyar kajszi fajták minden valószínűség szerint jelentős genotípust formáló folyamatok révén már a

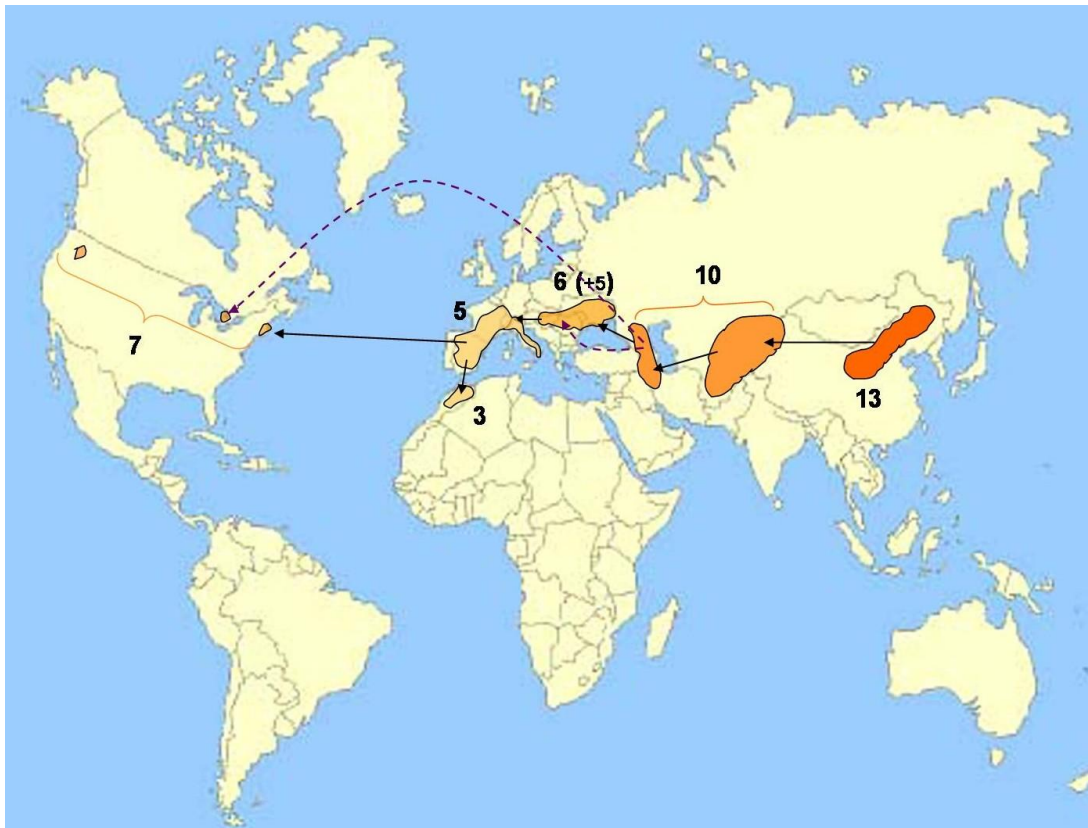
Kárpát-medencében alakultak ki. A genetikai kapcsolatuk az ősi ázsiai populációkkal viszont kétségtelenül bebizonyított a dolgozatban is bemutatott molekuláris analízisek eredményei alapján.

A fenti feltételezéseket alátámasztják ismert a tények is. A Magyar kajszit, 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 Magyar kajszit klónszelekciója Magyarországon és a környező országokban (Ausztria, Szerbia, Ukrajna, Csehország stb.) is sikeres volt (Pedryc, 1992), e nemesítési munka során alakult ki a dolgozatban vizsgált, a Magyar kajszit fajtakörbe tartozó 5 magyar, 1 szerb, 1 ukrán 1 macedón és 1 bolgár fajta.

Crossa-Raynaud (1960) hipotézise szerint a kajszit Oroszországba nyugatról érkezett a XVII. században, míg Ukrajnába közvetlenül a Közel-Keletről (Crossa-Raynaud, 1960 cit. in Faust és mts., 1998). Ukrajnában a kajszit helyi elnevezése zerdeli, ami perzsi eredetre utal, ugyanakkor a 'Nyikitszkij' annak a 'Krasznoscokij' fajtának a klónja, melynek Magyar kajszitval való azonosságát Nyujtó és Kosztina egyaránt elfogadta (Harsányi, 1981). Érdekes kérdés, hogy a Magyar kajszit őse is Közép-Ázsiából jutott-e Ukrajnába és onnan Magyarországra, vagy török közvetítéssel került Magyarországra területére, ahonnan elterjedt a környező országokba. Eredményeink alapján egyik lehetőség sem zárható ki, mivel a Magyar kajszitkra jellemző, az öntermékenyülést okozó allél nem mutáns változata ( $S_8$ ) több magyar és ukrán fajtában is megtalálható. A magyar "eredet" egyelőre inkább csak történelmi adatok valószínűsítik. Tudott, hogy a XVII. században Ukrajnába nyugatról hozták a cárok nemes kajszitfajtát, míg a magyar kajszit 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 kajszitfajtában leírt allélokat ahhoz a földrajzi területhez rendelve, ahonnan az adott fajták származnak, érdekes összefüggésekre derülhet fény (20. ábra). Euráziában nyugatról keleti irányban haladva egyre növekvő alléldiverzitás tapasztalható, mely legnagyobb értékét a közép-ázsiai térségben, illetve Kínában éri el. A kajszit 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 hegyvidé-

kein (Dzsungária, Afganisztán, Tadzsisztán és Üzbegisztán) a faj vadon élő 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 kajszültetvényeiben egy részletesebb vizsgálat számos további allélt tárna fel.



20. 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 kajszifajta 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 kajszik 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 rendelhető, 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. 'Aurora', '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 fagyűrész 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 mindeztidáig 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 kajszii elterjedésének útvonalán a Kína és Törökország közötti földrajzi térségben következhetett be. Mind a kajszii, 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 növelheték 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 kajszigenotípusok 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 feltételezhetően 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. (2006a) 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.



## 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 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 meghatároztuk.
- Meghatároztuk 51 gazdaságilag jelentős fajta és értékes nemesítési alapanyagként használt hibrid, ezen belül a Magyar kajszi és Óriás fajtacsoportok *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 interinkompatibilitási csoportba illetve az univerzális pollenadók csoportjába. Az első inkompatibilitási csoportot két fajtával bővítettük, továbbá a régebről ismert két inkompatibilitási csoport mellett meghatároztunk egy új (III.) inkompatibilitási csoportot, mely két fajtából áll. Ez a fajtatáblázat genetikai információs adatbázisként közvetlen segítséget nyújthat önmeddő fajtákból létesítendő ültetvények tervezéséhez és a keresztezéses nemesítés szülővonalainak kiválasztásához.
- Magyar fajtákból izoláltuk és jellemeztük az öntermékenyülésért felelős allél ( $SFB_8$ ) nem mutáns, funkcióképes változatát.
- A kajszi *S*-lókuszának 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 heterozióta genotípusok kimutatását is lehetővé teszik.
- Megállapítottuk, hogy a kajszi barack genomjára tervezett SSR-primerkészletek hatékonysága a kajszi mikroszatellit variabilitásának kimutatására jelentősen nagyobb, mint az egész *Prunus* nemzetségben alkalmazható őszibarack primereké.
- Eredményeink alapján megállapítható, hogy összehasonlítva a kínai, közép-ázsiai, iráni-kaukázusi, kelet-európai, nyugat-európai és észak-amerikai fajtacsoportok közötti genetikai távolságokat és egyedi és közös allélok jelenlétét a főleg magyar kajszi fajtákra épülő közép-európai kajszifajtacsoport az iráni-kaukázusi fajtákkal mutatja a legnagyobb genetikai azonosságot. Megerősítést nyert a francia Bergeron és Luizet fajták genetikai kapcsolata a magyar fajtákkal. Bebizonyítottuk, hogy az észak-amerikai fajták keletkezésében úgy az európai, mint az ázsiai génállományok szerepet játszottak. A közép-európai fajtákon kívül minden csoportban felfedeztünk egyedi allélokat. A legtöbb egyedi SSR-allél a kínai és közép-ázsiai fajtákban található. A kínai fajták SSR-polimorfizmusa jelentősen eltér a többi csoport fajtáitól.

- Kimutattuk, hogy az egy kapcsoltsági csoporthoz tartozó mikroszatellit régiók által feltárt polimorfizmus mértéke nem tér el az egész genomon belül szétszóródva elhelyezkedő SSR-lókuszok vizsgálatával felfedhető variabilitásától.
- Kísérleteink bebizonyították, hogy az alapvetően magyar fajtákból álló közép-európai fajtakörben mért genetikai diverzitás egyértelműen alacsonyabb volt, mint az összes többi fajtacsoportnál, ami a fajták keletkezését megelőző beltenyésztés illetve drift folyamatok következménye lehet.

## 8 FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Abbott, A.G., Lecouls, A. C., Wang, Y., Georgi, L., Scorza, R. and Reighard G. (2002) Peach: The model genome for Rosaceae genomics. *Acta Horticulturae*, 592: 199-209.
2. Adam-Blondon, A.F., Seignac, M., Bannerot, H., Dron, M. (1994) SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 865–870.
3. Adams, W.T. (1983) Application of isozymes in tree breeding. In: Tanksley, S.D., Orton, T.J. (Eds.): *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam, pp. 381-400.
4. Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in Plant Science. *Plant Cell Reports*, 27: 617–631.
5. Agarwal, S., and Nath, A.K. (2001) Characterisation of peach (*Prunus persica* L.) cultivars using isozymes as molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 90: 227-242.
6. Ahmad, R., Potter, D., Southwick, S.M. (2004a) Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2: 204-210.
7. Ahmad, R., Potter, D., Southwick, S.M. (2004b) Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1: 164-169.
8. Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. (1992) Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics*, 132: 1131-1139.
9. Alburquerque, 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.
10. Almeida, P., Penha-Gonçalves, C. (2004) Long perfect dinucleotide repeats are typical of vertebrates, show motif preferences and size convergence. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1226–1233.
11. 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.
12. Amirbakhtiara, N., Kiania, S., Mohammadia, Sh., Sayed-Tabatabaeib, B.E., Moradic, H. (2007) Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111: 280-292.
13. Amos, W., Rubinsztein, D.C. (1996) Microsatellites are subject to directional evolution. *Nature Genetics*, 12: 13–14.
14. Aradhya, M., K., Weeks, C., Simon, C., J. (2004) Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae*, 103(1): 131-144.
15. Aranzana, M.J., Arús, P., Carbó, J., and King, G.J. (2001a) AFLP and SSR markers for genetic diversity analysis and cultivar identification in peach (*Prunus persica* (L) Batsch). *Acta Horticulturae*, 546: 367–370.

16. Aranzana, M.J., de Vicente, M.C. and Arús, P. (2001b) Comparison of fruit and leaf DNA extracts for AFLP and SSR analysis in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Acta Horticulturae*, 546: 297-300.
17. Aranzana, M.J., Garcia-Mas, J., Carbo, J., Arus, P. (2002) Development and variability of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, 121: 87–92.
18. Arbeloa, A., Doarden, M.E., Garcia, E., Andreu, P., Wünsch, A., Hormaza, J.I., Marin, J.A. (2006) Rootstock breeding programme for apricot through interspecific crosses of Myrobalan X Apricot: Significant effect of accidental pollinations. *Acta Horticulturae*, 717: 133-136.
19. Arulsekhar, S., Parfitt, D. E., Beres, W., Hansche, P. E. (1986b) Genetics of malate dehydrogenase isozymes in the peach. *The Journal of Heredity*, 77(1): 49-51.
20. Arulsekhar, S., Parfitt, D.E. (1986) Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. *HortScience*, 21(4): 928-933.
21. Arulsekhar, S., Parfitt, D.E., and Kester, D.E. (1986a) Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *The Journal of Heredity*, 77: 272-274.
22. Ayanoglu, H., Bayazit, S., Inan, G., Bakir, M., Akpınar, A.E., Kazan, K., Ergül, A. (2007) AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region. *Scientia Horticulturae*, 114(4): 263-267.
23. Bachellier, S., Clément, J.M., Hofnung, M. (1999) Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey. *Research in Microbiology*, 150(9-10): 627-639.
24. Badenes, M.I., Cuenca, J., Romero, C., Martinez, J. and Llácer, G. (2002) Description of peach cultivars from Spain. Identification of closely related clones by SSR markers. *Acta Horticulturae*, 592: 211-216.
25. Badenes, M.L., Asins, M.J., Carbonell, E.A., Llácer, G. (1996) Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant Breeding*, 115: 133–139.
26. Badenes, M.L., Martínez-Calvo, J., Llácer, G. (1998) Analysis of apricot germplasm from the European eco-geographical group. *Euphytica*, 102: 93–99.
27. Bailey, C.H., Hough, L.F. (1975). *Apricot. Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana. pp. 367–383.
28. Baránek, M., Raddova, J., Pidra, M. (2006) Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia horticulturae*, 108(3): 253-259.
29. Bartolozzi, F., Warburton, M.L., Arulsekhar, S., Gradziel, T.M. (1998) Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of the American Horticultural Science*, 123: 381-387.
30. Battistini, S., Sansavini, S. (1991) Electrophoretic analysis of isozyme variability in apricot cultivars. *Journal of Genetics and Breeding*, 45: 117–122.
31. 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.

32. Belkum, A., Scherer, S., Alphen, L., Verbrugh, H. (1998) Short-Sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2): 275-293.
33. Bell, C.J., Ecker, J.R. (1994) Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arabidopsis*. *Genomics*, 19: 137—144.
34. Bell, G. I., Selby, M.J., Rutter, W.J. (1982) The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295: 31-35.
35. Benedikova, D. (2004) The importance of genetic resources for apricot breeding in Slovakia. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12: 107–113.
36. Bennetzen, J.L. (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42: 251–269.
37. Ben-Njima, N., Socias i Company, R. (1995) Characterization of some self-compatible almonds. I. Pollen tube growth. *HortScience*, 30: 318–320.
38. 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. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78: 315–318.
39. 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.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77: 658–664.
40. Bianchi Valmor, J., Fachinello, J.C ; Venturi, S., Tartarini, S., Sansavini, S. (2002) Molecular AFLP and SSR markers resolutive for genetic identification of plum cultivars (Amplified Fragment Length Polymorphism - Single Sequence Repeats - *Prunus domestica* L - *Prunus salicina* Lindl. - *Prunus cerasifera* Ehrb). *Rivista di Frutticoltura*. 64(4): 83-87.
41. Birnboim, H.C., Straus, N.A. (1975) DNA from eukaryotic cells contains unusually long pyrimidine sequences. *Canadian Journal of Biochemistry*, 53(5): 640-643.
42. Boritzki, N.I., Plieske, J., Struss, D. (2000) Cultivar identification in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using AFLP and microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 538: 505-510.
43. Bošković, R., Tobutt, K.R. (1996) Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica*, 90: 245–250.
44. Bošković, R., Tobutt, K.R. (1999) Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. *Euphytica*, 107: 29–43.
45. Bošković, R., Tobutt, K.R. (2001) Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 475–485.
46. Bošković, R., Tobutt, K.R., Batlle, I., Duval, H. (1997b) Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica*, 97: 167–176.
47. 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.

48. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 800–810.
49. Bošković, R., Tobutt, K.R., Nicoll, J.F. (1997) Inheritance of isoenzymes and their linkage relationships in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* 93: 129-143.
50. Bošković, R., Tobutt, K.R., Ortega, E., Sutherland, B.G., Godini, A. (2007) Self-(in)compatibility of almonds *P. dulcis* and *P. webbii*: detection and cloning of ‘wild-type *Sf*’ and new self-compatibility alleles encoding inactive *S*-RNases. *Mol Genet Genomics*, 278: 665–676.
51. Bošković, R., Wolfram, B., Tobutt, K.R., Cerović, R., Sonneveld, T. (2006) Inheritance and interactions of incompatibility alleles in the tetraploid sour cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 315–326.
52. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
53. Bouhadida, M., Casas, A.M., Moreno, M.A., Gogorcena, Y. (2004) Genetic diversity of *Prunus* rootstocks using microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 663: 625-628.
54. Bouhadida, M., Casas, A.M., Moreno, M.A., Gogorcena, Y. (2007) Molecular characterization of Miraflores peach variety and relatives using SSRs. *Scientia Horticulturae*, 111: 140-145.
55. Bowcock, A.M., Ruiz-Lineares, A., Tonföhrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L. (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368: 455–457.
56. Brooks, R.M., Olmo, H.P. (1997) *The Brooks and Olmo register of fruit and nut varieties*. 3rd ed. ASHS Press, Alexandria, Va.
57. Broothaerts, W., Janssens, G.A., Proost, P., Broekaert, W.F. (1995) cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology*, 27: 499–511.
58. Broothaerts, W., Van Nerum, I. (2003) Apple self-incompatibility genotypes: an overview. *Acta Horticulturae*, 622: 379–387.
59. Brózik, S., Nyéki, J. (1975) A kajszi termékenyülési viszonyai. In: Brózik, S., Nyéki, J. (Szerk.). *Gyümölcsstermő növények termékenyülése*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 173–176.
60. Burgos, L., Berenguer, T., Egea, J. (1993) Self- and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience*, 28: 148–150.
61. 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. *Journal of Horticultural Science*, 72: 147–154.
62. 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.
63. Burgos, L., Pérez-Tornero, O., Ballester, J., Olmos, E. (1998) Detection and inheritance of stylar ribonucleases associated with incompatibility alleles in apricot. *Sexual Plant Reproduction*, 11: 153–158.

64. Byrne, D.H. (1989) Electrophoretic variability in four diploid stone fruits. *Acta Horticulturae*, 254: 29-33.
65. Byrne, D.H. (1990) Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *The Journal of Heredity*, 81: 68–71.
66. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1988a) Electrophoretic characterization of diploid plums of the Southeastern United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113: 918-924.
67. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1988b) Verification of the parentage of presumed peach × almond hybrids by isozyme analyses. *Fruit Varieties Journal*, 42: 130-134.
68. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1989a) Characterization of isozyme variability in apricots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114: 674-678.
69. Byrne, D.H., Littleton, T.G. (1989b) Interspecific hybrid verification of plum × apricot hybrids via isozyme analyses. *HortScience*, 24: 132-134.
70. Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M., Struss, D. (2001) DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 205–209.
71. Casas, A.M., Igartua, E., Balaguer, G., Moreno, M. A. (1999) Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica*, 110: 139–149.
72. 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*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1115–1122.
73. 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*). *Sexual Plant Reproduction*, 19: 175–183.
74. Ciofi, C., Funk, S.M., Coote, T., Cheesman, D., Hammond, R.L., Saccheri, I.J., Bruford, M.W. (1998) In: Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. (Eds.) *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp. 413–417.
75. Cipriani G., Lot G., Huang W. G., Marrazzo M. T., Peterlunger E., Testolin R. (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch) : Isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 65-72.
76. Clarke, A.E., Newbigin, E. (1993) Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annual Review of Genetics*, 27: 257–279.
77. Clarke, J.B., Ortega, E., Sutherland, B., Marchese, A., Tobutt, K.R. (2004) Some new cherry microsatellites and their transferability to other stone fruits. *Acta Horticulturae*, 663: 83-86.
78. Clarke, J.B., Tobutt, K.R. (2003) Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Molecular Ecology Notes*, 4: 578-580.
79. Cociu, V. (1993) *The apricot (in Romanian)*. Editura Ceres, Bucuresti.
80. Condit, R., Hubbell, S.P. (1991) Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34: 66-71.
81. Crane, M.B., Brown, A.G. (1937) Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *Journal of Pomology HortScience*, 15: 86–116.

82. Crane, M.B., Lawrence, W.J.C. (1929) Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology HortScience*, 7: 276–301.
83. Crossa-Raynaud (1960) Problèmes d'arboriculture fruitière en Tunisie. Abricotiers. *Ann. L'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie*, 33: 39–63.
84. Daorden, M.E., García, E., Wunsch, A., Hormaza, J.I., Marín, J.A. (2006) Significant effect of accidental pollinations on the progeny of low setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica*, 3: 389–394.
85. De Vicente, M.C., Truco, M.J., Egea, J., Burgos L., Arús, P. (1998) RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding*, 117: 153–158.
86. Decroocq, V., Hagen, L.S., Fave, M.G., Eyquard, J.P., Pierronnet, A. (2004) Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats. *Molecular Breeding* 13:135–142.
87. Decroocq, V., Favé, M.G., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S. (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(5): 912–22.
88. Della Strada, G., Pennone, F., Fideghelli, C., Monastra, F., Cobianchi, D. (1989) Monografia di cultivar di albicocco. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. Direzione Generale della Produzione Agricola. Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Roma, Italia.
89. Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., Laigret, F. (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 127–138.
90. Dirlewanger, E., Duha, S., Viruel, M.A. and Saunier, R. (1998a) Identification of peach varieties using molecular markers. *Acta Horticulturae*, 465: 69–78.
91. Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Calderé, F. G., Cosson, P., Howad, W., Arús, P. (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9891–9896.
92. Dondini, L., Lain, O., Geuna, F., Banfi, R., Gaiotti, F., Tartarini, S., Bassi, D., Testolin, R. (2007) Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* maps. *Tree Genetics & Genomes*, 3: 239–249.
93. Downey, L. D., Lezzoni, A. F. (2000) Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125: 76–80.
94. Durham, R.E., Moore, G.A., Sherman, W.B. (1987) Isozyme banding patterns and their usefulness as genetic markers in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112: 1013–1018.
95. Egea, J., Burgos, L. (1996) Detecting cross-incompatibility of three North-American apricot cultivars and establishing the first incompatibility group in apricot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 1002–1005.
96. Egea, J., García, J.E., Egea, L., Berenguer, T. (1991) Self-incompatibility in apricot cultivars. *Acta Horticulturae*, 293: 285–293.



97. 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.
98. Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435–445.
99. Ellegren, H., Moore, S., Robinson, N., Byrne, K., Ward, W., Sheldon, B.C. (1997) Microsatellite evolution – a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 854–860.
100. 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 to Cells*, 8: 203–213.
101. Epplen, J.T., McCarrey, J.R., Sutou, S., Ohno, S. (1982) Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(12): 3798–3802.
102. Faust, M., Surányi, D., Nyujtó, F. (1998) Origin and dissemination of apricot. *Hortic. Rev.*, 22: 225–266.
103. Foolad, M.R., Arulsekhar, S., Becerra, V., Bliss, F.A. (1995) A genetic map of *Prunus* based on an inter-specific cross between peach and almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 262–269.
104. Franklin-Tong, V.E., Franklin, F.C. (2003) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science*, 8: 598–605.
105. Fujimori, S., Washio, T., Higo, K., Ohtomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S., Tomita, M. (2003) A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Letters*, 554: 17–22.
106. Gangwal, K., Sankar, S., Hollenhorst, P.C., Kinsey, M., Haroldsen, S.C., Shah, A.A., Boucher, K.M., Watkins, W.S., Jorde, L.B., Graves, B.J., Lessnick, S.L. (2008) Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 29: 10149-54.
107. Garza, J.C., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1995) Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 594–603.
108. Gerlach, H.K., Stösser, R. (1997) Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angewandte Botanik*, 71: 212–218.
109. Geuna, F., Toschi, M., Bassi, D. (2003) The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breeding*, 122: 526–531.
110. Gilson, E., Clement, J. M., Brutlag, D., Hofnung, M. (1984) A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *The EMBO Journal*, 3:1417-1421.
111. Gogorcena, Y., Parfitt, D. E. (1994) Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Scientia Horticulturae*, 59: 163-167.

112. Goulao, L., Monte-Corvo, L., Oliveira, C.M. (2001) Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. *Journal of the American Horticultural Science*, 126: 72–77.
113. Graetz, D.K. (2006) Breeding apricot cultivars for drying in Australia. *Acta Horticulturae*, 717: 197-198.
114. Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P., Sambrook, J. (1974) Physical mapping of temperaturesensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 39: 439-446.
115. Guerriero R., Monteleone P., D'Onofrio C., Ruiz C., Asins M. J., Carbonel E. A. (2006) Characterisation of Italian apricot germplasm by phenotypic and microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 717:237-242.
116. Guilford P., Prakash S., Zhu J. M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., Forster R. (1997) Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 249–254.
117. Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1996) Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, 70: 45–54.
118. Gupta, P.K., Varshney, R.K. (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113: 163–185.
119. Hagen L. S., Khadari B., Lambert P., Audergon J.-M. (2002) Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 298-305.
120. Hagen, L.S., Chaib, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, J.P., Lambert, P., Audergon, J.M. (2004b). Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4: 742-745.
121. Hagen, L.S., Favé, M.-G., Eyquard, J.-P., Pierronnet, A. (2004a) Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats. *Molecular Breeding*, 2: 135-142.
122. Halász, J. (2007a) A kajszi önmeddőségét meghatározó S-allél-rendszer molekuláris háttere. Doktori (PhD) értekezés. Budapest, Budapesti Corvinus Egyetem.
123. Halász, J. (2007b): Review of self-(in)compatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *World J. Agric. Sci.*, 3(5): 670–677.
124. 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. *Scientia Horticulturae* 116(4): 448–451.
125. Halász, J., Hegedűs, A., Hermán, R., Stefanovits-Bányai, É., Pedryc, A. (2005) New selfincompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis. *Euphytica*, 145: 57–66.
126. Halász, J., Pedryc, A., Hegedűs, A. (2007) Origin and dissemination of the pollen-part mutated  $S_C$ -haplotype that confers self-compatibility in apricot (*Prunus armeniaca*). *New Phytologist*, 176: 793–803.
127. Hartl, D.L., Clark, A.G. (1997) *Principles of population genetics*, 2nd edn. Sinauer, Sunderland

128. Hauck, N.R., Yamane, H., Tao, R., Iezzoni, A.F. (2002) Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 15: 39–46.
129. 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.
130. Hawkins, J.S., Grover, C.E., Wendel, J.F. (2008) Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. *Plant Science*, 174: 557–562.
131. He, T.M., Chen, X.S., Xu, Z., Gao, J.S., Lin, P.J., Liu, W., Liang, Q., Wu, Y. (2007): Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 563-572.
132. Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G., Lawson, D.M. (1994) Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity*, 85: 4–11.
133. Hentschel, C.C. (1982) Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S1 nuclease. *Nature*, 295: 714–716.
134. Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 425-479.
135. Higgins, C.F., Ames, G.F.L., Barnes, W.M., Clement, J.M., Hofnung, M. (1982) A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature*, 298: 760-762.
136. Higgs, D.R., Goodbourn, S.E., Wainscoat, J.S., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. (1981) Highly variable regions of DNA flank the human alpha globin genes. *Nucleic Acids Research*, 9(17): 4213–4224.
137. Hormaza, J.I. (2001) Identification of apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using microsatellite and RAPD markers. *Acta Horticulturae*, 546: 209-215.
138. Hormaza, J.I. (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321–328.
139. Horn, J. (1939) Kajszi, cseresznye és meggy termesztése. *Növényvédelem és Kertészet Kiadása, Budapest*.
140. Hunter, R.L., Markert, C.L. (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125: 1294-1295.
141. Hurtado, M.A., Badenes, M.L., Llácer, G. (1999) Random amplified polymorphic DNA markers as a tool for apricot cultivar identification. *Acta Horticulturae*, 488: 281–288.
142. Hurtado, M.A., Badenes, M.L., Llácer, G., Westman, A., Beck, E., Abbott, G.A. (2001) Contribution to apricot genetic analysis with RFLP, RAPD and AFLP markers. *Acta Horticulturae*, 546: 417-420.
143. Hurtado, M.A., Westman, A., Beck, E., Abbott, G.A., Llácer, G., Badenes. M.L. (2002) Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica*, 127: 297–301.
144. Hutchinson, C., Newbold, J., Potter, S., Edgell, M. (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251: 536.
145. Igic, B., Kohn, J.R. (2001) Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 13167–13171.

146. Ikeda, K., Iqic, B., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N.R., Nakano, R., Sassa, H., Iezzoni, A.F., Kohn, J.R., Tao, R. (2004) Primary structural features of the *S* haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reproduction*, 16: 235–243.
147. Ingram, C. (1948) *Ornamental cherries*, Country life limited, London
148. Ioerger, T.R., Gohlke, J.R., Xu, B., Kao, T-h. (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, 4: 81–87.
149. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neumann, R., Keyte J. (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*, 16(23): 10953-10971.
150. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985a) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
151. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985b) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76 - 79.
152. 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. *Biotechnology Letters*, 27: 1205–1209.
153. Joobeur, T., Viruel, M.A., de Vicente, M.C., Jauregui, B., Ballester, J., Dettori, M.T., Verde, I., Truco, M.J., Messeguer, R., Battle, I., Quarta, R., Dirlewanger, E., Arús, P.A. (1998) Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond × peach F2 progenies. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1034–1041.
154. Jun, J.H., Chung, K.H., Jeong, S.B., Lee, H.J. (2002a) Development of RAPD and SCAR markers linked to flesh adhesion gene in peach. *Book of Abstracts of the XXVI International Horticultural Congress*. Toronto, Canada. p. 335.
155. Jun, J.H., Jeong, S.B., Chung, K.H. (2002b) Selection of species-specific RAPD markers and genetic relationships among *Prunus* taxa. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 43: 517-522.
156. Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A., Main, D. (2008) GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucleic Acids Research*, 36: 1034-1040.
157. Kao, T-H., Tsukamoto, T. (2004) The molecular and genetic bases of *S*-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, 16: 72–83.
158. Kawata, Y., Sakiyama, F., Tamaoki, H. (1988) Amino-acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry*, 176: 683–697.
159. Kester, D.E., Gradziel, T.M., Micke, W.C. (1994) Identifying pollen incompatibility groups in Californian almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 106–109.
160. Kiss, G.B., Csanadi, G., Kalman, K., Kalo, P., Okresz, L. (1993) Construction of a basic linkage map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 238: 129–137.
161. 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.

162. Kloosteran, A.D., Budowle, B., Daselaar, P. (1993) PCR amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 105: 257–264.
163. Konieczny, A., Ausubel, F.M. (1993) Procedure for mapping arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal*, 4(2):403-10.
164. Kosztina, K.F. (1969) The use of varietal resources of apricots for breeding. *Trud. Nikit. Bot. Sad.* 40: 45–63.
165. Kosztina, K.F. (1970) Selekcionnoe ispolzovanie sortuv fondov abrikosa. In Ajzenberg, V.J. (Ed.): *Abrikos. Ajastan, Yerevan, Armenia*. pp. 177–189.
166. Kosztina, K.F. (1970) Self-fertility studies in apricot. *Trud. Gos. Nikit. Botan. Sada, XLV*: 7–17.
167. Kovalev, N.V. (1970) Ustojcivost abricosa k klajsterosporiozu v svjazi s geografickim i geneticeskim proishozsdeniem. In Ajzenberg, V.J. (Ed.): *Abrikos. Ajastan, Yerevan, Armenia*. pp. 169–172.
168. Krichen, L., Mnejja, M., Arùs, P., Marrakchi, M., Trifi-Farah, N. (2006) Use of Microsatellite Polymorphisms to Develop an Identification Key for Tunisian Apricots. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1699-1706.
169. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150–163.
170. La Rota, M., Kantety, R.V., Yu, J.K., Sorrells, M.E. (2005) Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. *BMC Genomics*, 6: 23.
171. Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21: 1111-1115.
172. 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 Molecular Biology*, 50: 29–42.
173. Ledbetter, C., Peterson, S., Jenner, J. (2006) Modification of sugar profiles in California adapted apricots (*Prunus armeniaca* L.) through breeding with Central Asian germplasm. *Euphytica*, 148: 251–259.
174. Leland, B., Shannon, B. (1968) Plant isoenzymes. *Annual Review of Plant Physiology*, 19: 187-210.
175. Lester, D.H., Russell, G.C., Barendse, W., Williams, J.L. (1996) The use of gradient gel electrophoresis in mapping the bovine tumor necrosis factor  $\alpha$  locus. *Mammalian Genome*, 7: 250–252.
176. Levinson, G., Gutman, G.A. (1987a) High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 15: 5323–5338.
177. Levinson, G., Gutman, G.A. (1987b) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 203–221.
178. Lewis, D. (1949) Structure of the incompatibility gene. II. Induced mutation rate. *Heredity*, 3: 339–355.

179. Lewis, D., Crowe, L.K. (1954) Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutations in *Prunus avium* L. *Heredity*, 8: 357–363.
180. Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 991–1007.
181. Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Aas, L., Vardund, T., Kapperud, G. (2007) Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1): 197-205.
182. Litt, M., Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.
183. Lomakin, E.N. (1975) Female sterility of apricot flowers. *Byull. Vsesoyuznogo Ordena Lenina Instituta*, 54: 40–43.
184. Lopes, M.S., Sefc, K.M., Laimer M., Da Câmara Machado, A. (2002) Identification of microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 2: 24–26.
185. Löschnig, J., Passecker, F. (1954) Die Marille und ihre Kultur. Öst. Agrarverlag, Vienna.
186. Lu, Z.X., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G., Rajapakse, S. (1996) Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *HortScience*, 31: 127-129.
187. Lu, Z.X., Sosinski, B., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G., (1998) Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, 41: 199-207.
188. Lupski J. R. Weinstock G. M. (1992) Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes. *Journal of Bacteriology*, 4525-4529.
189. Mády, R., Szalay, L. (2003) Kajszi. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.) Kajszi. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 85–126.
190. 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 Genetics and Genomics*, 1: 151–165.
191. Mahács, M. (1922) Gyakorlati gyümölcsstermesztés. Légrády testvérek kiadása, Budapest.
192. Major, A., Pedryc, A., Jahnke, G. (1999) Comparison of the starch and polyacrylamide gel electrophoresis in the evaluation of isozyme polymorphism in apricot. *Acta Horticulturae*, 484: 373–376.
193. Maliga, P. (1966) Kajszi. In: Kajszi. In: Péntes, B., Szalay, L. (Szerk.) Kajszi. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 85–126.
194. Manganaris, A.G., Karayiannis, I., Nianiou, E. (1999b) Polymorphism and genetic studies of isozymes in apricots. *Acta Horticulturae*, 488: 303–308.
195. Manganaris, A.G., Mainou, A. Goudaras, A., Ledbetter C. (1999a) Identification of plum x apricot interspecific hybrids using isoenzyme polymorphism. *Acta Horticulturae*, 488: 361-368.
196. Manubens, A., Lobos, S., Jadue, Y., Toro, M., Messina, R. Lladser, M., Seelenfreund, D. (1999) DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(3): 255-267.

197. Marchese A., Tobutt K., Campisi G., Cartabellotta D., Di Martino V., Marrone G., Caruso T. (2006) Peach germplasm in Sicily: variation in phenology, morphology and molecular traits (*Prunus persica* (L.) Batsch); Il germoplasma autoctono del pesco (*Prunus persica* (L.) Batsch) in Sicilia: aspetti fenologici, morfologici e molecolari. *Italus Hortus*, 13: 118-122.
198. Mariniello, L., Sommella, M.G., Sorrentino, A., Forlani, M., Porta, R. (2002) Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnology Letters*, 24: 749-755.
199. Markert, C.L., Hunter, R.L. (1959) The distribution of esterases in mouse tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 7(1): 42-49.
200. Markert, C.L., Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45:753-763.
201. Marra, G., Schär, P. (1999) Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochemical Journal*, 338: 1-13.
202. Martin, G.B., Williams, J.G.K., Tanksley, S.D. (1991) Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 2336-2340.
203. Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M. (2002) New approaches to almond breeding at the University of California-Davis Program. *Acta Horticulturae*, 591: 253-256.
204. Martínez-Gómez, P., Sozzi G. O., Sanchez-Perez, R., Rubio, M., Gradziel, T. M. (2003) New approaches to *Prunus* tree crop breeding. *Food, Agriculture & Environment*, 1(1): 52-63.
205. Martins, M., Farinha, K., Ferreira, E., Cordeiro, V., Monteiro, A., Tenreiro, R., Oliveira, M. (2001) Molecular analysis of the genetic variability of portuguese almond collections. *Acta Horticulturae*, 546: 449-456.
206. Mase, N., Iketani, H., Sato, Y. (2007) Analysis of Bud Sport Cultivars of Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) by Simple Sequence Repeats. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1: 20-27.
207. Matityahu, A., Stern, R.A., Schneider, D., Goldway, M. (2005) Molecular identification of a new apple *S*-RNase –*S29*– cloned from ‘Anna’, a low-chilling-requirement cultivar. *HortScience*, 40: 850-851.
208. 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*, 540-544. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal.
209. 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.
210. 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.
211. 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.
212. McCubbin, A.G., Kao, T.H. (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16: 333-364.

213. 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. International Society for Horticultural Science, Wageningen, pp. 65–107.
214. Mehlenbacher, S.A., L.F. Hough, and A. Voordeckers. (1987) Jerseycot apricot. *HortScience*, 22:680-681.
215. Messina, R. , Lain, O., Marrazzo, M. T., Cipriani, G., Testolin, R. (2004) New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 3: 432-434.
216. Metzgar, D., Thomas, E., Davis, C., Field, D., Wills, C. (2001) The microsatellites of *Escherichia coli*: rapidly evolving repetitive DNAs in a non-pathogenic prokaryote. *Molecular Microbiology*, 39(1): 183-90.
217. MingLiang, Y., RuiJuan, M., JianLan, X., ZhiJun, S., Zhen, Z. (2004) Identification of genetic relationship of peach species by SSR. *Journal of Fruit Science*, 21: 106-112.
218. Modrich, P., Lahue, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 101–133.
219. Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30(2):194-200.
220. Mowrey, B.D., Werner, D.J. (1990) Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isoenzyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 129-133.
221. Mullis, K.B., Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 350–355.
222. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., et al. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235(4796): 1616–1622.
223. Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 3321–3323.
224. Nei, M., Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269–5273.
225. Nettancourt, de D. (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* , 10: 185–199.
226. Nettancourt, de D. (2001) Incompatibility in angiosperms. New York: Springer-Verlag.
227. Nikaido, T., Nakai, S. and Honjo, T. (1981) Switch region of immunoglobulin Cmu gene is composed of simple tandem repetitive sequences. *Nature*, 292(5826): 845-848.
228. Nishitani, C., Kimura, T., Ueda, E., Howad, W., Arús, P., Yamamoto, T. (2007) Tri-/Hexanucleotide Microsatellite Markers in Peach Derived from Enriched Genomic Libraries and Their Application in *Rosaceae*. *Breeding Science*, 57: 289-296.
229. 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.
230. Nyujtó, F., Brózik Jr., S., Brózik, S., Nyéki, J. (1985) Fruit set in apricot varieties. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 34: 65–72.



231. 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.
232. OECD (2002) Consensus document on the biology of *Prunus* sp. (stone fruits): series on harmonization of regulatory oversights in biotechnology nr. 24. <http://www.oilis.oecd.org/oilis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono>
233. Ohta, S., Nishitani, C., Yamamoto, T. (2005) Chloroplast microsatellites in *Prunus*, *Rosaceae*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 837–840.
234. 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. *Molecular Genetics and Genomics*, 276: 413–426.
235. Ortega, E., Dicenta, F. (2004) Suitability of four different methods to identify self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 79: 747–753.
236. 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.
237. Orti, G., Pearse, D.E., Avise, J.C. (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Evolution*, 94: 10745–10749.
238. Ortiz, A., Renaud, R., Calzada, I., Ritter, E. (1997) Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *Journal of Horticultural Science*, 72: 1–9.
239. Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in Biosciences*, 12:357–358.
240. Pairon, M. C., Jacquemart, A.L. (2005) Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (*Rosaceae*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 5: 729-734.
241. Panaud, O., Chaib, A., Sarr, A. (2002) Dynamic conservation of apricot *Prunus armeniaca* in saharian oases: use of AFLP markers to assess genetic diversity in traditional orchards. *Euphytica*, 128: 301-305.
242. Paran, I., Kesseli, R.V., Michelmore, R.W. (1991) Identification of RFLP and RAPD markers to downy mildew resistance genes in lettuce with near isogenic lines. *Genome*, 35: 1021-1027.
243. 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.
244. Pedryc, A. (2003) A kajszi nemesítése. In: Péntzes, B., Szalay, L. (Eds.): Kajszi, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
245. Pedryc, A., Ruthner, Sz., Bisztray, Gy.D., Laimer, M. (2006) Characterization of different apricot cultivars grown in Hungary with SSR markers. *Acta Horticulturae*, 725: 691-698.
246. Pedryc, A., Ruthner, Sz., Bisztray, Gy., Laimer, M. (2002) A Magyarországon termesztett kajszi barack fajták azonosítása RAPD markerekkel. VIII. Növénynevelési Tudományos Napok Összefoglalói, 26.

247. Petes, T.K., Botstein, D. (1977) Simple mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5091-5095.
248. Pimienta, E., Polito, V.S., Kester, D.E. (1983) Pollen tube growth in cross- and self-pollinated 'Nonpareil' almond. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 643–647.
249. Popat, S., Hubner, R., Houlston, R S. (2005) Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 609-618.
250. Potter, S.S., Newbold, J.E., Hutchison, C.A. III, Edgell, M.H. (1975) Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72: 4496–4500.
251. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996) Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
252. Pupko, T., Graur, D. (1999) Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 313–316.
253. Quarta, R., Dettori, M.T., Verde, I., Broda, Z., Gentile, A. (1998) Genetic analysis of agronomic traits and genetic linkage mapping in a BC1 population using RFLPs and RAPDs. *Acta Horticulturae*, 465: 51–59.
254. Rajapakse, S., Belthoff, L.E., He, G., Estager, A.E., Scorza, R., Verde, I., Ballard, R.E., Baird, W.V., Callahan, A., Monet, R., Abbott, A.G. (1995) Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 503–510.
255. Ricciardi, L., Giorgio, V., de Giovanni, C., Lotti, C., Gallotta, A., Fanizza, G. (2002) The genetic diversity of Apulian apricot genotypes (*Prunus armeniaca* L.) assessed using AFLP markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 431-436.
256. Rohlf, F.J. (1993) NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8. Exeter Publications, Setauket, N.Y.
257. Rohrer, J.R., Ahmad, R., Southwick, S.M., Potter, D. (2004) Microsatellite analysis of relationships among North American plums (*Prunus sect. Prunocerasus*, *Rosaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 244: 69-75.
258. Romero, C., Llacer, G., Badenes, M.L., Pedryc, A. (2006) Relationship among apricot cultivars from Hungary and a South European Pool determined by SSR Markers. *Acta Horticulturae*, 701: 233-240.
259. 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 Molecular Biology*, 56: 145–157.
260. Rose, O., Falush, D. (1998) A threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 613–615.
261. Rubinsztein, D.C. (1999) Trinucleotide expansion mutations cause diseases which do not conform to classical Mendelian expectations. In: Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, 80–97.

262. Ruthner, S., Pedryc, A., Krska, B., Romero, C., Badenes, M.L. (2006) Molecular characterisation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars using cross species SSR amplification with peach primers. *International Journal of Horticultural Science*, 12(3): 53-57.
263. Saghai-Marooif, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5466-5470.
264. Sánchez-Pérez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arús, P., Martínez-Gómez, P. (2006a) Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticultura*, 108: 310-316.
265. Sánchez-Pérez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., Martínez-Gómez, P. (2005) Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterisation, protection and genetic relationships. *Scientia Horticulturae*, 103: 305–315.
266. Sánchez-Perez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., Martinez-Gomez, P. (2006b) SSR-Based Genetic Diversity Assessment Among Apricot Cultivars and Breeding Lines, and Its Relationship With Agronomic Traits. *Acta Horticulturae*, 717: 243-246.
267. Sassa, H., Hirano, H., Ikehashi, H. (1992) Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) *Plant Cell Physiology*, 33: 811–814.
268. Sassa, H., Hirano, H., Ikehashi, H. (1993) Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Molecular and General Genetics*, 241: 17–25.
269. Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T., Ikehashi, H. (1996) Self-incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics*, 250: 547–557.
270. Sathe, S.K., Teuber, S.S., Gradziel, T.M., Roux, K.H. (2001) Electrophoretic and immunological analyses of almond (*Prunus dulcis* L.) genotypes and hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2043-2052.
271. 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’. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71: 342–347.
272. Schlötterer, C. (1998) Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology*, 8: 132-134.
273. Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371.
274. Schlötterer, C., Amos, B., Tautz, D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354: 63–65.
275. Schmidt, L. (1997) Tree improvement glossary. Technical note No. 46. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Dánia.
276. Schueler, S., Tusch, A., Schuster, M., Ziegenhagen, B. (2003) Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) — markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.

277. Schultz, J.H. (1948) Self-incompatibility in apricots. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 51: 171–174.
278. Schwartz, D. (1960) Genetic Studies on Mutant Enzymes in Maize: Synthesis of Hybrid Enzymes by Heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(9): 1210-1215.
279. Scorza, R., Melnicenco, L., Dang, P., Abbott, A.G., Johnson, R.S., Chrisosto, C.H. (2002) Testing a microsatellite marker for selection of columnar growth habit in peach [*Prunus persica* (L.) Bastch]. *Acta Horticulturae*. 592: 285-289.
280. Serrano B., Gómez-Aparisi, J., Hormaza, J.I. (2002a) Fingerprinting of *Prunus* rootstocks with microsatellites. *Acta Horticulturae*, 591: 77-81.
281. Serrano, B., Gomez-Aparisi, J. Hormaza, J.I. (2002b),: Molecular fingerprinting of *Prunus* rootstocks using SSRs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77: 368-372.
282. Sharopova, N. (2008) Plant simple sequence repeats: distribution, variation, and effects on gene expression. *Genome*, 51: 79-90.
283. Shimada, T., Haji, T., Yamaguchi, M., Takeda, T., Nomura, K., Yoshida, M. (1994) Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) by RAPD assay. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 63: 543–551.
284. Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M., Yoshida, M. (1999) Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA analysis. *Euphytica*, 109: 143–147.
285. Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle, H.S., Folta, K.M., Lezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T M., Gardiner, S.E., Potter, D., Veilleux, R.E. (2008) Multiple Models for *Rosaceae* Genomics. *Plant Physiology*, 147: 985–1003.
286. Sicard O., Marandel G., Soriano J. M., Lalli D. A., Lambert P., Salava J., Badenes M. L., Abbott A., Decroocq V. (2007) Flanking the major Plum pox virus resistance locus in apricot with co-dominant markers (SSRs) derived from candidate resistance genes. *Tree Genetics & Genomes*, 4: 359-365.
287. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1046–1055.
288. 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.
289. Sonneveld, T., Tobutt, K.R., Robbins, T.P. (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 1059–1070.
290. 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.
291. Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T.M., Epperson, B.K., Martínez-Gómez, P., Asadi, E. (2007) Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild

- species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 156(3): 327-344.
292. Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L.D., Beck, L.E., King, G.J., Ryder, C.D., Rajapakse, S., Baird, W.V., Ballard, R.E., Abbott, A.G. (2000) Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 421–428.
  293. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among dna fragments separated by gelelectrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.
  294. Stebbins, G. L. (1989) Introduction. In: Soltis, D.E., Soltis, P. S. (Eds.): *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1–3.
  295. Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., Glössl, J. (1997) Conservation of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6: 1189–1194.
  296. Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., Petes, T.D. (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365: 274–276.
  297. Stringer, J. R. (1982) DNA sequence homology and chromosomal deletion at a site of SV40 DNA integration. *Nature*, 296: 363-366.
  298. Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M., Boritzki, M. (2003) Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6): 904-909.
  299. Surányi, D. (2003) A kajszi jelentősége, termesztésének története és helyzete. In: Péntzes, B., Szalay, L. (Szerk.) *Kajszi. Mezőgazda Kiadó, Budapest*. pp. 11–29.
  300. Sutherland, B.G., Robbins, T.P., Tobutt, K.R. (2004) Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. *Plant Breeding*, 123: 582–584.
  301. Szabó, Z., Nyéki, J. (1991) Blossoming, fructification and combination of apricot varieties. *Acta Horticulturae*, 293: 295–302.
  302. Szabó, Z., Nyéki, J., Andrásfalvy, A., Szalay, L., Pedryc, A. (1999) Evaluation of some Romanian apricot varieties in Hungary. *Acta Horticulturae*, 488: 211–214.
  303. 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.
  304. Szóts, S. (1941) *Kajszi- és szilva-termesztés. A magyar gyümölcs kiadása, Budapest*.
  305. Takeda, T., Shimada, T., Nomura, K., Ozaki, T., Haji, T., Yamaguchi, M., Yoshida, M. (1998) Classification of apricot varieties by RAPD analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67: 21-27.
  306. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 344–349.
  307. Tanksley, S.D., Orton, T.J. (1983) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam
  308. Tao, R., Habu, T., Namba, A., Yamane, H., Fuyuhiko, F., Iwamoto, K., Sugiura, A. (2002) Inheritance of Sf-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 222–228.

309. 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.
310. Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T.M., Dandekar, A.M., Sugiura, A. (1997) Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). Plant Cell Physiology, 38: 304–311.
311. 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. Journal of the American Society for Horticultural Science, 124: 224–233.
312. Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA. Nucleic Acids Research, 17: 6463–6471.
313. Tautz, D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In DNA fingerprinting: state of the science. Edited by S.D.L. Pena. Birkhauser, Basel, Switzerland. pp. 21–28.
314. Tautz, D., Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12(10): 4127–4138.
315. Tavaud, M., Zanetto, A., David, J.L., Laigret, F., Dirlewanger, E. (2004) Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus gondouinii* and *Prunus cerasus*). Heredity, 93: 631–638.
316. Tavaud, M., Zanetto, A., Santi, F., Dirlewanger, E. (2001) Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry trees using AFLP markers. Acta Horticulturae, 546: 263–269.
317. Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, T., Pancaldi, M., Sansavini, S. (2000) Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome, 43: 512–520.
318. The Huntington Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell. 72: 971–983.
319. 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 Research, 22: 4673–4680.
320. 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*. Scientia Horticulturae (Amsterdam), 66: 159–167.
321. Torres, A.M. (1983) Fruit trees. In: Tanksley, S.D., Orton, T.J. (Eds.): Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, Amsterdam, pp. 401–421.
322. Torres, A.M., Weeden, N.F., Martin, A. (1993) Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers. Plant Physiology, 101: 394–452.
323. Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research, 10: 967–981.
324. 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. Sexual Plant Reproduction, 5: 256–263.

325. Tufts, W.P., Philp, G.L. (1922) Almond pollination. California Agricultural Experimental Station Bulletin, 346: 35.
326. 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.
327. 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*. *Molecular and General Genetics*, 260: 261–268.
328. 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 Journal*, 39: 573–586.
329. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 856–866.
330. Vavilov, N.I. (1926) The mountainous districts as the home of agriculture. Studies on the origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany in: Plant Breeding*, 16: 218–220.
331. Vavilov, N.I. (1951) Phytogeographic basis of plant breeding. *Chronica Botanica*. pp. 13–54.
332. Verde, I., Georgi, L.L., Reighard, G.L., Forrest, S.D., Muñoz-Torres, M., Baird, W.V., Abbott, A.G. (2007) Construction of a genetic linkage map and identification of molecular markers in peach rootstocks for response to peach tree short life syndrome. *Tree Genetics and Genomics*, 4: 341–350.
333. Vierstra, R.D. (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science*, 8: 135–142.
334. Vilanova S., Badenes M.L., Burgos L., Martínez-Calvo J., Llácer G., Romero C. (2006a) Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology*, 142: 629–641.
335. 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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 893–898.
336. Vilanova, S., Soriano, J.M., Lalli, D.A., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L. (2006b) Development of SSR markers located in the G1 linkage group of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using a bacterial artificial chromosome library. *Molecular Ecology Notes*, 6: 789–791.
337. Viruel, M.A., Messeguer, R., de Vicente, M.C., Garcia-Mas, J., Puigdomenech, P., Vargas, F., Arús, P. (1995) A linkage map with RFLP isozyme markers for almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 964–971.
338. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.
339. Wang, D., Karle, R., Brettin, T.S., Lezzoni, A.F. (1998) Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1217–1224.

340. Wang, Y., Georgi, L.L., Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Scorza, R., Abbott, A.G. (2002) High-throughput targeted SSR marker development in peach (*Prunus persica*). *Genome*, 45(2): 319–328.
341. Warburton, M.L., Bliss, F.A. (1996) Genetic Diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *Journal of the American Horticultural Science*, 12: 1012–1019.
342. Weber, I.L. (1990) Informativness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 4: 524-530.
343. Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.
344. Weeden, N.F. (1994) Approaches to mapping in horticultural crops. In: Gresshoff, P.M. (Ed.): *Plant Genome Analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 57-68.
345. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. (2005) *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
346. Wendel, L.F. (1989) Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, E.D., Soltis, P.S. (Eds.): *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, pp. 5–45.
347. Wenz, H.M., Robertson, J.M., Menchen, S., Oaks, F., Demorest, D.M., Schiebler, D., Rosenblum, B.B., Wike, C., Gilbert, D.A., Efcavitch, J.W. (1998) High precision genotyping by denaturing polyacrylamide electrophoresis. *Genome Research*, 8: 69-80.
348. White, K.D. (1970) *Roman farming*. Cornell University Press, Ithaca
349. Wierdl, M., Dominska, M., Petes, T.D. (1997) Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*, 146: 769–779.
350. Wiersma, P.A. (2003) Reproductive barriers in tree fruit crops and nuts. *Acta Horticulturae*, 622: 369–377.
351. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 700–708.
352. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
353. Wright, J.M., Bentzen, P. (1994) Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in The Journal of Fish Biology: Fish*. 4: 384-388.
354. Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395–420.
355. Wu, J., Shu, H.R., Zhang, X.N., Zhang, K.C., Wang, L.J. (2004) Cloning and sequence analysis of AFLP-specific fragment related to fruit non-acid/acid trait of peach. *Journal of Fruit Science*, 21(6): 526-529.



356. Wünsch, A., Carrera, M., Hormaza, J.I. (2006) Molecular Characterization of Local Spanish Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) Germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 5: 925-932.
357. Wünsch, A., Gella, R., Hormaza, J.I. (2004),: Molecular characterization of rootstocks for sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Horticulturae*, 658: 599-602.
358. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2002a) Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L) Batsch) SSR sequences. *Heredity*, 89: 56-63.
359. Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2002b) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125: 59–67.
360. Wyman, A.R., White, R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11): 6754–6758.
361. Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y., Ma, R.C. (2006) SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2: 366-372.
362. Xu, D.H., Wahyuni, S., Sato, V., Yamauchi, M.H., Tsunematsu, H., Ban, T. (2006) Genetic diversity and relationships of japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5): 883-889.
363. Xu, Y, Ma, R.C., Xie, H., Liu, J.T., Cao, M.Q. (2004) Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome*, 47: 1091-104.
364. 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.). *Sexual Plant Reproduction* , 13: 251–257.
365. 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*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 661–667.
366. Yang, G.P., Saghai-Maroo, M.A., Xu, C.G., Zhang, Q., Biyashev, R.M. (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular and General Genetics*, 245: 187-194.
367. Yon, M., RongCai, M. (2004) Identification of genetic relationship among almond accessions by AFLP. *Journal of Fruit Science*, 21(6): 552-555.
368. 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.). *Sexual Plant Reproduction*, 20(1): 1-8.
369. Zhebentyayeva T., Reighard G., Gorina V., Abbott A. (2004) Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(3): 435-444.
370. Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Lalli, D., Gorina, V.M., Krška, B., Abbott, A.G. (2008) Origin of resistance to plum pox virus in Apricot: what new AFLP and targeted SSR data analyses tell. *Tree Genetics and Genomes* 3: 403-417.
371. Zhebentyayeva, T.N., Sivolap, Y.M. (2000) Genetic diversity of apricot determined by isoenzyme and RAPD analyses. *Acta Horticulturae*, 538: 525-529.

372. Zhou, L., Kappel, F., Hampson, C., Viersma, P.A., Bakkeren, G. (2002) Genetic Analysis and Discrimination of Sweet Cherry Cultivars and Selections Using Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(5): 786—792.
373. Zhu, M., Zhang, X., Zhang, K., Jiang, L., Zhang, L. (2004) Development of a simple molecular marker specific for detecting the self-compatible S4' haplotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 387–398.
374. Zisovich, A.H., Stern, R.A., Shafir, S., Goldway, M. (2004) The RHV region of S-RNase in European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sexual Plant Reproduction*, 17: 151–156.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom minden tanszéki dolgozónak, akikkel az utóbbi években együtt dolgoztam, és akik segítségével és munkája nélkül a kajszi barack kutatására vonatkozó elképzeléseim nem megvalósulhatnának meg.

Különös köszönet illeti meg **Halász Júliát, Hermán Ritát** és **Hegedűs Attilát**, akiknek a konstruktív kritikájuk, biztatásuk, rendszerezési készségük és önzetlen segítségük nélkülözhetetlen volt a mindennapi feladatok elvégzése és a tudományos munkám folytatása során, valamint a disszertáció anyagának összeállításakor.

Annak ellenére, hogy a dolgozatban az utóbbi nyolc év kutatásairól számolok be, ezt a dolgozatot az elmúlt huszonöt év szakmai tevékenységének összegzéseként tekintem. Éppen ezért köszönetet szeretnék mondani Mády Rezsőnek, hogy évekkel ezelőtt nagy szakmai tudásával bevezetett a kajszi különleges világába, valamint egykori munkatársamnak Bozsik Józsefnek, aki nagy lelkesedéssel segített a nemesítői pályám első lépéseinél.

Végül köszönettel tartozom a családomnak is, hogy türelemmel és megértéssel segítették a disszertáció írás időszakát.