

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Gyümölcsstermő Növények Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Történelmi almafajták ploiditás vizsgálata

Nagyistván Orsolya
Kertészmérnök MSc II. évfolyam

Konzulens: Király Ildikó, egyetemi tanársegéd
Dr. Békefi Zsuzsanna, adjunktus

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés, célkitűzés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Termesztett alma rendszertani besorolása és kialakulása	5
2.2. Történelmi almafajták jelentősége.....	5
2.3. Virágrészek kialakulása	6
2.4. Almafajták megporzási és termékenyülési sajátosságai	7
2.4.1. Önmeddőség	7
2.4.2. Kölcsönös termékenyülés	7
2.4.3. Pathenokarpia	8
2.4.4. Pollen csírákéesség, pollenmorfológia, életkéesség	8
2.5. Mesterséges keresztezés.....	9
2.6. Kötődés és befolyásoló tényezői	10
2.7. Molekuláris markerezés mikroszatellit (SSR) markerekkel	12
2.8. Flow cytometria	13
3. Anyag és módszertan	15
3.1. Kísérlet helye	15
3.2. Vizsgálatok anyaga és időtartama	16
3.3. Vizsgálatok módszere	17
3.3.1. Molekuláris markerezés mikroszatellit (SSR) markerekkel	17
3.3.2. Flow Cytometria	20
3.3.3. Keresztezés	21
3.3.4. Kötődött gyümölcsök magtartalmának vizsgálata	23
3.3.5. Pollenmorfológia	23
3.3.6. Pollen csírázó kéesség	23
4. Eredmények.....	25
4.1. Molekuláris markerezés mikroszatellit (SSR) markerekkel:	25
4.2. Flow Cytometria	25

4.3. Keresztezés	28
4.4. Kötődött gyümölcsök magtartalmának vizsgálata	30
4.5. Pollenmorfológia	31
4.6. Pollen csírázó képesség	33
5. Következtetések.....	34
6. Összefoglalás.....	37
7. Köszönetnyilvánítás	38
8. Irodalomjegyzék.....	39
9. Mellékletek	46

1. Bevezetés, célkitűzés

Az alma a világ negyedik legnagyobb mennyiségben termelt gyümölcse, a mérsékelt égövben pedig a legjelentősebb gyümölcsfaj. 2010-ben a világ almatermése mintegy 69 millió tonna volt a FAO (2010) adatai alapján. Magyarországon is – mennyiségét tekintve – a legjelentősebb gyümölcsfaj, volt olyan év, amikor 1,2 millió tonna termett belőle, de ez a '90-es évek elején 550-580 ezer tonnára csökkent. Az évenkénti termésmennyiség azóta is e körül az érték körül ingadozik, a KSH adatai alapján 2011-ben 292 ezer tonna alma termett az országban.

Az alma a legrégebben termesztett gyümölcsök közé tartozik. Magyarországon az 1800-as évek elejére sajátos, egyedi fajtarendszer jött létre. E folyamat gyökere a középkorig visszavezethető. Keletkezésük pontos módja az idő homályába vész, és napjainkra már, mint egy-egy tájegység jellemző fajtája váltak ismerté. Jelentős genetikai és kulturális értéket képviselnek. Mivel örökségünk e része nem újrateheremthető, megőrzésük kiemelt fontosságú.

Az utóbbi években egyre növekvő érdeklődés fordul a történelmi gyümölcsfajták felé. A különböző alternatív termesztésmódok művelői és a helyi különlegességeket felkaroló termelők kitüntetett figyelmét élvezik a Kárpát-medence régi fajtái. Így végre a történelmi almafajták ismét szerephez juthatnak. A génbankban található fajták egy része nemcsak a nemesítésben hasznosítható, hanem pl. a biogazdálkodásban is, ezért szükségessé vált a régi almafajták újraértékelése. A génbankunkban található régi magyar almafajták bevonásával végzett széleskörű kutatások keretében fontos feladatnak tekintettük a korábbi magyar pomológiai szakirodalom alapján a régi fajták vizsgálatát, újbóli leírását.

A Gyümölcstermő Növények Tanszéken 2007-ben kezdett egyik munka célja a génbanki gyűjtemény genetikai diverzitásának meghatározása, amelynek során single-lókuszos SSR markerek használata esetén több fajtánál, több lókuszon is három allélt detektáltunk. Ezek az adatok adták jelen dolgozat célkitűzésének a kiinduló pontját.

Ha újra termesztésbe szeretnénk vonni a régi fajtákat, a termesztésükhöz elengedhetetlen ismeret a megporzási viszonyai, ezen belül a ploiditásuk is.

Dolgozatom céljai között szerepel a kiválasztott történelmi fajták ploiditási szintjének vizsgálata különböző laboratóriumi módszerekkel, mint a molekuláris markerezés mikroszatellit markerekkel, Flow cytometria valamint szabadföldön beállított keresztezési kísérlettel. További céljaim között szerepelt a vizsgált fajták pollenmorfológiai, valamint tömlőhajtó képesség alapján való összehasonlítása bizonyítottan diploid fajtákkal.

Dolgozatomban össze kívánom hasonlítani a különböző módszerek alkalmazhatóságát, és a vizsgálatok eredményeit valamint a szakirodalmi eredményeket és következtetni a vizsgált történelmi almafajták ploiditási szintjére.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Termesztett alma rendszertani besorolása és kialakulása

Rendszertanilag az alma a *Rosaceae* (Rózsafélék) család *Pomoideae* (Almafélék) alcsaládjába tartozik. A nemes alma (*Malus x domestica*) egy összetett hibrid, amely sok ezer év alatt alakult ki. Feltételezések szerint az almát már i.e. 6500 óta termesztik. Ezt bizonyítják az azokból az időkből származó, a Jordán völgyében talált alma maradványok (Tóth, 2005 a).

A termesztett nemes alma (*Malus x domestica*) eredete több ösre vezethető vissza. A régi almafajták legtöbbször vad őse az európai vadalma (*Malus sylvestris*) és a törpe vadalma (*Malus pumila*), melyekhez később a szilvalevelű (kínai) vadalma (*Malus prunifolia*) is hozzájárult. Mind a három fajnak sokoldalú a polimorfizmusa, ami az élőhelyek környezeti feltételeinek változatossága által keltett alkalmazkodóképesség következménye (Nagy-Tóth, 1998).

2.2. Történelmi almafajták jelentősége

Napjainkban a legtöbb gyümölcstermő növényfaj esetében a fajtahasználat beszűkülése tapasztalható, ami hosszú távon a biológiai sokféleség eltűnését eredményezheti. A hazai almafajta szortimentben ma már nem találhatók meg a régi, több évtizeddel ezelőtt keletkezett fajták. Előnytelen tulajdonságaik vagy a piaci igények változása miatt ezek kiszorultak a piacról, és már csak kevés gyümölcstermesztő foglalkozik a termesztésükkel. A biodiverzitás fenntartására és a biotermesztésre (pl. ökológiai gazdálkodásban) irányuló törekvések azonban arra ösztönzik a környezettudatos termelőket, hogy a lassan feledésbe merülő fajtákat újra termesztésbe vonják (Király és Tóth, 2009). Mindezek mellett jelentőségük a nemesítés, a fajtabővítés, a génbanki megőrzés és a térségfejlesztés területén lehet meghatározó (Szani, 2007).

Egyes történelmi fajták a kipusztulás szélén állnak, mert a régi még fellelhető pár példányuk már idős, rossz állapotú, és a szaporításukkal a faiskolák a jelenlegi törvényi szabályozás mellett nem foglalkozhattak. A vidékfejlesztési miniszter 27/2012. (III. 24.) számú VM rendelete a gyümölcs tájfajták állami elismeréséről, valamint szaporítóanyagaik előállításai és forgalomba hozatali feltételeiről lehetőséget ad a tájfajták törvényes szaporítására. Továbbá a történelmi fajták megmenthetők a génbankokban történő fenntartással, és megőrizhető az alma biológiai sokszínűsége, amely az új fajták előállításához nélkülözhetetlen.

A régi tájfajták napjainkban a rezisztencia-nemesítés alapjául szolgálnak, melyek helyenként még napjainkban is fellelhetők szórványgyümölcsösökben intenzív növényvédelmet nélkülöző viszonyok között. Ebben a programban nagy jelentőséget kapnak az alma venturiás varasodással, tűzelhalással, almafa lisztharmattal szemben ellenálló genotípusok. A hibridizáción alapuló

rezisztencia-nemesítés során rezisztens gént hordozó vad fajokat, illetve fajtákat kereszteznek fogékony, jó minőségű fajtákkal.

A nemesítési programok mellett, a legjobb minőségű régi fajták alkalmasak lehetnek újbóli termesztésre tájképi elemként, út menti sorfaként, vagy extenzív léalmatermő ültetvénynek (Tóth, 2005 c, Holler, 2007). Mindemellett az ellenálló régi fajtáknak szerepük lehet az ökológiai rendszerben termelő ültetvényekben, házikertekben, ahol extenzív körülmények között vegyszermentes gyümölcsöt termesztenek. A régi fajták kevésbé intenzív, ipari célú ültetvények anyagát is képezhetik (Balikó, 2000).

A megőrzés mellett nagy hangsúlyt kell fektetni arra, hogy ezeket a lassan feledésbe merülő fajtákat megismertessük a fogyasztókkal. Régi fajtáink többsége sok vonatkozásban különbözik a mai üzemi termesztésben ismert világfajtáktól. Például a gyümölcsök alakja nem minden esetben felel meg a gépesített osztályozás és a korszerű áruvá készítés követelményeinek. Ugyanakkor rendkívüli alakgazdaságuk, sajátos zamatok miatt elsősorban a régi ízek kedvelői és a változatosan étkező, igényes fogyasztók körében kedveltek (Király és Tóth, 2009).

2.3. Virágrészek kialakulása

A virágrügy differenciálódás kezdetétől a virág teljes kifejlődéséig mintegy 9-10 hónap szükséges (Bubán és Faust, 1982).

A virágrügyek képződése több fázison keresztül valósul meg. Az első az indukció, egy hormonálisan programozott folyamat, mely a rügyek szövettani szerkezetében nem okoz változást. Az iniciálódás a vegetatív tenyészőkúp szövettani differenciálódásával kezdődő és az ivarszerv kezdemények megjelenésével záródó folyamat (Bubán, 1996). A folyamat utolsó részében az ivarszervek teljessé szerveződése, az érett pollen és az embriózsák kialakulása zajlik le. A folyamat a virágnírással fejeződik be (Bubán, 1997)

A virágok hím ivarszerve porzószálból és a portokokból álló porzó. A porzók fejlődése a portokkezdemény megjelenésével kezdődik, a porzószálnak megnyúlása nem sokkal a virágníráás előtt történik (Pethő, 1984). A portokkezdemény belső részét az archeosporium szövet tölti ki, amely a pollenképződés helyéül szolgál.

A pollenképződés vagy mikrosporogenezis során az archeosporium sejtjeinek elkülönülésével jönnek létre a pollenanyasejtek és ezek kétszeri osztódásával keletkeznek a pollen tetrádok. Az első, meiotikus osztódásnál feleződik meg a kromoszómaállomány, s alakul ki az ivarsejtekre jellemző haploid kromoszómaszám (Papp, 2003).

A testi sejtekre jellemző kromoszómaszám az ivari sejtékének a kétszerese tehát diploid. Ez esetben a diploid almafajták kromoszómaszáma $2n=34$. Tehát a diploid fajták esetében a virágpor kialakulása szabályos, rendellenességet nem okoz.

Triploid fajták esetében a szomatikus (testi) sejtek kromoszómaszáma $3 \times 17 = 51$. Az 51 kromoszóma a meiózisban nem tud szabályosan párosodni és pontos feleződés sem lehetséges, aminek eredménye a szabálytalan virágpor keletkezés. A virágporszemek különböző nagyságúak, sok közöttük a zsugorodott. Triploid almafajták a termesztett típusok között is előfordulnak, ilyen fajta a 'Jonagold', 'Mutsu' (Davary-Nejad, 1992), vagy a régi almafajták közül a 'Kanadai renet' is (Muraközy és mtsai, 1963).

2.4. Almafajták megporzási és termékenyülési sajátosságai

Megporzás vagy pollenátvitel során a pollenzsákból az érett virágpor kiszabadul, valamilyen (általában rovar) közvetítéssel a bibére kerül, és ott megtapad. Ezek után a pollen a bibétől vizet, tápanyagot és élettanilag fontos biokémiai anyagokat vesz fel. Ezt követően néhány órán belül csírázik, majd tömlőt hajt (Papp, 2003).

A gyümölcsfajták termékenyülő és termékenyítő képessége genetikailag meghatározott tulajdonság, amelynek mértéke váltakozó, és azt az ökológiai tényezők, különböző évjáratok, a termőhely, a megporzás és megtermékenyülés körülményei, a fák kondíciója befolyásolja (Nyéki, 1970).

2.4.1. Önmeddőség

A jelenleg ismert almafajták vagy teljesen önmeddők, vagy részlegesen öntermékenyek. Az az almafajta lenne öntermékenynek tekinthető, amelyik a saját fajtájának virágporától megporzódva a gazdaságos termesztéshez minden termőhelyen rendszeresen megfelelő terméskötődést és a kiváló minőségű gyümölcsök kifejlődéséhez kellő mennyiségű magtartalmat biztosítana (Soltész 2002). Bár almánál egyes szerzők (Childers, 1975, Blazek et al, 1977, Milutinovic et al, 1996, De Witte et al, 1996) bizonyos mértékű öntermékenyülésről beszámolnak, az így létrejött termés mennyiség nagyon csekély, ezért használatos, és általánosan elterjedt, elfogadott az almánál a „gyakorlatilag önmeddő” fogalom. Az alma virágaira jellemző a dichogámia jelensége, ami azt jelenti, hogy a porzók és a termő eltérő időben válnak ivaréretté, tehát a virágon belüli önmegporzás általában kizárt (Maliga, 1956, Porpáczy, 1964).

2.4.2. Kölcsönös termékenyülés

Az almafajták kölcsönös termékenyülő képességét genetikailag a Rosaceae családra jellemző gametofitikus inkompatibilitás határozza meg.

A gyakorlatban több szerző is foglalkozik két fajta kölcsönös termékenyülő képességével. Soltész (1996) az alma esetén 3-20% terméskötődést tart kielégítőnek. Wertheim (1996) definíciója szerint, ha a szüretkor tapasztalt kötődési érték 4%-nál kisebb, akkor a terméskötődés gyenge, ha 5-

9% között van, akkor közepes, 10-24% között jó és 25% felett igen jó. Fischer (2002) a 8% alatt kötődő fajtakombinációkat inkompatibilisnek tekinti.

2.4.3. Parthenokarpia

Természetes parthenokarpiának tekintjük a termésfejlődésnek azt az esetét, amikor megtermékenyülés nélkül is fejlődik gyümölcs, a létrejött magvakban azonban nem fejlődik csíra, azok léhák maradnak (Papp, 2003). Almafajták termékenyülés nélkül ritkán és kis százalékban hoznak gyümölcsöt, csupán néhány fajtánál állapítottak meg természetes parthenokarpiát. Azonban nem minden telt mag nélküli gyümölcs parthenokarp. Ez létrejöhet az embrió korai abortálódása miatt is, amit a szakirodalom álparthenokarpiaként nevez meg (Davary-Nejad, 1992).

2.4.4. Pollen csírákéesség, pollenmorfológia, életkéesség

A pollen életkéességről első megközelítésben mikroszkópos vizsgálattal győződhetünk meg. A kicsi, deformált, összezsugorodott pollenszemek nem életképesek (Stösser et al, 1996). Marks (1954) kármínecetsavas festéssel vizsgálta a pollen életkéességet.

Az almafajták között lényeges eltérések állnak fenn a pollenek mérete, alakja és felületi mintázottsága alapján. Nem azonos morfológiai sajátosságok jellemzik a leginkább csíráképes, illetve hosszabb tömlő fejlesztésére képes pollenszemcséket. A diploid és triploid almafajták csoportjának elkülönítése felületmorfológia alapján nem lehetséges (Davary-Nejad, 1992).

A pollen nagysága bizonyos mértékig jelzi a pollen csírázási képességét és tömlőfejlesztési készségét is. A pollenek tömlőfejlesztő képessége az életkéességnél is reálisabban jellemzi a pollenek termékenyítő képességét. Az a pollen, amely morfológiailag egységes, jól csírázik, azonban amelyik kicsi és deformált szemcsékből áll, rosszul csírázik (Papp, 2003). A hőmérsékletnek igen fontos szerepe van a pollentömlő növekedésében. Az almánál *in vivo* körülmények között 20°C-on 3,5-ször gyorsabban nő a pollentömlő, mint 10°C-on. A pollentömlő fejlesztéshez szükséges hőmérsékleti minimum 4,5-5°C körül van (Nyéki, 1980).

A tömlőfejlesztő képességét fajtatulajdonságnak tekinthetjük. A pollen termékenyítő képessége akkor jó, ha a pollenszemcsék legalább 70%-a tud tömlőt hajtani (Lalatta, 1982). Mértéke nem megfelelő, ha 50% alatt van és jó ha 50 és 70% közötti.

A csírákéesség vizsgálatára a legtöbb szerző különböző töménységű szacharóz oldatot javasol. Bellani et al. (1997) 5-10-15-20%-os szacharóz oldatban csíráztatott alma pollent, a legjobb csírázási eredményt a 15%-os töménység adta. Grausland (1996) és Wertheim (1996) szintén 15%-os szacharóz oldatot javasol alma pollen csírázásának vizsgálatára, az utóbbi szerző szerint 25%-os csírázás alatt gyengén csírázónak tekinthető egy fajta pollenje. Janick et al. (1996) a 10%-os szacharóz oldattöménységet tartja a legmegfelelőbbnek. Thompson és Batjer (1950) a csíráztató közeghez 10 ppm bór hozzáadása után magasabb csírázási erélyt tapasztalt.

Hugard (1978) 54-82%, Bellani et al. (1997) pedig különböző kezelések hatására 70-90% közötti pollencsírázást tapasztalt almánál. Fischer (2002) 10%-ban, Ro (1929 cit. in Nyéki, 2008) pedig 15%-ban határozza meg a minimális pollencsírázási szintet ahhoz, hogy egy fajta pollenadónak alkalmas lehessen. Nyéki (1980) szerint 30% alatti csírázás esetén egy fajta rossz pollenadó, az igazán jó pollenadó fajta pollenje 70% feletti csírázást produkál.

Stösser et al. (1996) jelzi, hogy a gyümölcskötődési vizsgálatok és az egyéb pollen tömlőhajtó képesség vizsgálatok eredményei nincsenek mindig összhangban egymással. Soltész (2002) szerint sincs szoros összefüggés a virágpor *in vitro* csírázóképessége és a későbbi terméskötődés között, sőt a fajtára jellemző pollenproduktum sem mindig utal a termékenyítőképességre. Ugyanannak a fajtának a virágpóra eltérő mértékben csírázik a különböző fajták virágainak bibéin, éppen ezért fontos azt is vizsgálni, hogy a virágpor *in vivo* körülmények között hogyan csírázik. *In vivo* körülmények között emellett még számos, az eredmények összehasonlíthatóságát nehezítő tényező befolyásolja a pollencsírázást (pl. hőmérséklet, fák kora, kondíciója, virág fejlettsége).

Scott (1972) úgy találta, hogy a triploid pollenek csírázása 10% alatt maradt.

2.5 Mesterséges keresztezés

A keresztezéses megporzás során a terméskötődést több tényező befolyásolja: a fajták kompatibilitása, a pollengyűjtés és tárolás körülményei, a megporzás ideje és módja.

Wertheim (1996) módszertani összefoglalója alapján, ahhoz hogy megfelelő információt kapjunk pollenadónak való alkalmasságról, kombinációnként 100 virág keresztezésére van szükség lehetőleg 10 fán elosztva. Korlátozott növényanyag esetében a fákon való eloszlás tág határok között mozoghat, jóval kevesebb fát is használhatunk, azonban a 100 virág keresztezése ajánlott az értékelhetőség miatt. Wertheim (1996) virágzatonként 2-2 virág megporzását javasolja, a középső és a kései virágok eltávolításával. Ez gyakorlati szempontból is praktikus, hiszen a keresztezést ballon stádiumban levő virágokon célszerű elvégezni. Ilyen stádiumú virágokból pedig akkor találunk a legtöbbet a fákon, amikor a virágzatok középső virága már kinyílt. Bodor (2009) szerint célszerű továbbá a kijelölt ágakon a keresztezésbe be nem vont virágzatok megtartása, annak elkerülése érdekében, hogy a keresztezett virágokon abnormálisan magas kötődési értékeket kapjunk. Azonban ez esetben fontos szempont, hogy hány fán végeztük a keresztezést, hisz minél kevesebben, annál célszerűbb a környező virágok kicsípése, ezzel védve a keresztezés hitelességét.

A virágok kasztrálásáról is megoszlik a szakirodalom véleménye. De Witte et al. (1996) szignifikánsan kisebb gyümölcskötődést tapasztalt ugyanazon keresztezési kombináció esetén a virágok kasztrálása mellett, mint kasztrálás nélkül.

Eltérő nézőpontok léteznek a keresztezett virágok további megporzódásának védelméről. Általánosan elterjedt a papír, nylon és tüll izolátorok használata. Izolátor használata nélkül a bibék vazelines kezelésével biztosítható, hogy további pollen ne kerüljön a bibére. A kasztrált virágok esetén nincs szükség semmilyen izolálásra, hiszen a rovarok a kasztrált virágot nem látogatják, a széllel szállított pollennel való megtermékenyülés esélye pedig igen csekély.

Legtöbb szerző a ballon stádiumban végzett keresztezést ajánlja. Wertheim (1996) triploid fajták esetén, a petesejt későbbi érése miatt, két nappal később a keresztezés megismétlését javasolja triploid anyafajta esetében. A keresztezés ismétlését más szakirodalmak is javasolják főleg amiatt a tény miatt, hogy a méhek 10-20 alkalommal is felkeresnek egy virágot, tehát ez esetben a többszörös megporzás hatására nagyobb mértékű a terméskötődés.

A keresztezés utáni végső kötődési érték a hullási periódusok után alakul ki. A terméskezdemények hullásának három periódusát különböztetjük meg (Haraszty, 1979). A virágzás utáni vagy más néven tisztuló hullás, amikor is a rosszul kötődött vagy életképtelen, sérült gyümölcskezdeményeket ledobja a növény. A hullás maximuma a második időszakra, a júniusi hullási periódusra esik. A harmadik periódus a kései vagy érés előtti gyümölcshullás. A terméskezdemények többsége a tisztuló és a júniusi hullási periódusban leválik, és ezt követően a hullás mértéke már nem jelentős, legfeljebb 10%-kal csökken a termések száma (Davary-Nejad, 1992).

2.6. Kötődés és befolyásoló tényezők

A gyümölcskötődés az a jelenség, amikor a virágzás után megtermékenyült virágok fejlődésnek indulnak, és a fán maradnak.

Az alma gyümölcskötődését hagyományosan a megporzástól egészen a júniusi hullás végéig számítjuk. Ez alatt az 50-60 nap alatt dől el, hogy mennyi gyümölcs marad a fán. Ez alatt a 6 hónap alatt a következő 4 szakaszra tagolható a kötődés folyamata (Nyéki, 1980):

- Virágok fejlődése
- Megporzás
- Kötődés primer szakasza
- Kötődés szekunder szakasza.

A virágok fejlődése az előző évi virágzástól tart egészen a tárgyévi virágzásig. Ezen időszak alatt két kritikus periódus a szeptember-október és a március-áprilist felölelő 4 hónap. Ez idő alatt megy végbe a virágok legnagyobb léptékű szerveződése, és ennek kimenetelétől függ a virágok végleges funkcionális értéke. A két őszi hónapban a hőmérséklet és a korai fagyok szerepe a legnagyobb. Sok év tapasztalata szerint a meleg őszt mindig jó termés követi, ha a virágzás kielégítő és a tavaszi fagyok se zavarják a kötődést (Pethő, 1984). A korai fagyok a lombozat

károsításával akadályozhatják a kötődést. Ugyanis a gyümölcskötődés alapvető feltétele, hogy a fák szüret után felszabadulva az addig nevelt gyümölcsök alól, az ép lombzat segítségével feltöltsék az addig hiányosan ellátott szöveteiket asszimilátumokkal. A tavaszi két hónap folyamatait legfőbbképpen az őszi hónapok környezeti és kondicionális feltételei határozzák meg (Nyéki, 1980).

Megporzáskor a virágpor a bibe ragadós felületén megtapad. A megporzást befolyásolhatja az időjárás és az éghajlati viszonyok, a virágpor minősége, mennyisége és kiszóródása a portokokból. Fontos megemlíteni a rovarlátogatások intenzitását és a rovarok teljesítményét, valamint a virágzási idő hosszát, és a pollenadó fajták összetételét és számát (Papp, 2003). A portokok megérését a pollenszák kinyílása jelzi. A kinyílástól számított 1-2 napon belül kiszóródik belőlük a virágpor. Egyes fajták pollenje könnyen szóródik, és ez esetben a szemcsék nem tapadnak össze. A pollenszóródást a hőmérséklet igen erősen befolyásolja, a napi maximuma a legmelegebb déli órákra esik. A pollenszóródás időtartama a néhány órától a néhány napig is eltarthat (Nyéki, 2002, Nyéki és Soltész, 1996).

A kötődés primer szakasza a megporzással kezdődik, és a szíromhullást követő harmadik hét végén fejeződik be. A gyümölcskötődés sikerét három tényező kölcsönhatása határozza meg. A megelőző virágfejlődés eredménye, a beporzás sikere és a virágzás alatti és utáni hőmérséklet. Ebben a szakaszban a hőmérséklet az, ami lehetővé teszi, vagy megghiúsíthatja a következő folyamatok érvényesülését (Pethő, 1984). A „hatékony megporzási időszak” fogalmát Williams (1966) vezette be és a virágnyílást közvetlenül követő időszakra korlátozódik. Ennek az időszaknak a tartama megegyezik a petesejt élettartamából levont pollentömlő embriózáskig hatolásához szükséges idővel. Triploid almafajták esetében a petesejt csak 2-3 nappal a virág kinyílása után érik és jelentősen hosszabb a hatékony megporzási időszakuk (Nyéki, 1980). A triploid fajták pollentermelése többszöröse a diploid fajtáénak, bár a triploid almafajták polleníének életképessége sokkal gyengébbnek bizonyult (Larsen és Tung, 1950). A bibére jutott pollen 4-6 óra múlva csírázik és kedvező körülmények között az embriózáskig 1-2 nap alatt ér le, azonban kedvezőtlen körülmények között a pollentömlő növekedése akár 10 napig is eltarthat, vagy be sem következik. Alma esetében az eltelt idő 2-12 nap között változik (Wilcox, 1962). A triploid fajták pollentömlőfejlesztő képessége kicsi, ezért megtermékenyítésre alkalmatlanok. A triploid almafajtákat a megporzás biztosítása érdekében diploid fajtákkal javasolják telepíteni (Krapf, 1975, Soltész, 1982).

A szekunder vagy befejező szakasz a primer szakasz végétől egészen a júniusi gyümölchullás végéig, kb. 5 hétig tart. Elméletben a primer gyümölcskötődés és az első gyümölchullás után fán maradt gyümölcs érett terméssé fejlődhet. Azonban ezen gyümölcsök még legalább 50%-a lehullhat a júniusi hullás következtében. Amennyiben a fák asszimilátum kínálata

egyaránt tudja fedezni a gyümölcs és hajtásnövekedés igényeit is, nem következik be júniusi hullás, bár ez viszonylag ritkán fordul elő (Nyéki, 1980). A gyakorlatban az asszimilátum kínálat csak a gyümölcsök egy résznek a kötéséhez elég, ezért a versenyképtelen gyümölcsök lehullanak (Pethő, 1984).

Gyümölchulláshoz vezethet az is, ha a gyümölcs kevés életképes magot vagy magkezdeményt tartalmaz. A kis magtartalom mellett alacsony mértékű a kötődés. Közepes (5-7 db/gyümölcs) magtartalom elegendő a gyümölcs normális fejlődéséhez. A megfelelő magtartalom nélkülözhetetlen feltétele a terméskezdemények fán maradásának. A magvaknak, mint hormontermelő és tápanyag vonzó centrumoknak jelentős szerepe van a gyümölcs kötődésében és fejlődésében. Tehát a terméskötődés mértéke és a gyümölcsök magtartalma kapcsolatban áll (Davary-Nejad, 1992). A magtartalmat a virágok elhelyezkedése, illetve a termékenyülési viszonyok befolyásolják leginkább (Silbereisen, 1970). A gyümölcsönkénti szükséges magtartalom annál több, minél nagyobb a virágsűrűség és a megtermékenyült virágok aránya. Bő termés esetén a háromnál kevesebb magot tartalmazó gyümölcsök lehullanak (Teskey és Shoemaker, 1972).

A virágok virágzaton belüli helyzetének jelentős a hatása a magtartalomra és a terméskötődésre. A középső virágokból kötődött termések magtartalma nagyobb. Az oldalvirágok terméskötődését akadályozza a középső virágból már korábban kötődött termés (Howlet, 1926). A gyümölcskötődés júniusi szakaszában is érvényesülnek a kötődés előző szakaszainak hatásai, hiszen minél tökéletesebb volt a primer kötődés, annál nagyobb a gyümölcsök esélye a további fejlődésre és a fán maradásra. Azonban ha túl sok az ilyen gyümölcs a fán, egymással is versenyben kell lenniük, mivel egymás kötődési esélyeit is rontják. Ilyen esetben is bekövetkezhet tömeges júniusi hullás (Pethő, 1984).

Ezek a szakaszok egymásra hatásaikban szorosan épülnek és együttesen alakítják ki a végleges termésmennyiséget.

A kötődést befolyásoló tényezőket 3 csoportba sorolhatjuk. Az évről évre állandóan ható tényezők, mint például a fajta, a gyümölcsös fekvése, domborzati viszonyai, az alanyhatás, valamint a telepítési rendszer. Vannak évente változó tényezők, melyek a csapadék, hőmérséklet, napfény és a szél. Továbbá a 3. csoport a módosítható tényezők, mint a tápanyagellátás, vízellátás, metszés, méhcsaládok (Nyéki, 1980).

2.7. Molekuláris markerezés mikroszatellit (SSR) markerekre

A genetikai marker felismerhető fenotípust, tulajdonságot meghatározó gén (Kiss 2005).

SSR markerek:

A két nukleotid ismétlődésből álló egységeket leggyakrabban mikroszatellitnek (Litt és Luty, 1989) vagy SSR-nek (simple sequence repeat – egyszerű szekvencia ismétlődés) (Jacob és

mts., 1991) nevezzük (cit. in: Hajosné, 1999). Ezek az elemek nagy polimorfizmust mutató részek a genomok nem kódoló régióiban, kodominánsan, a mendeli törvények szerint öröklődnek.

Az ideális markerekkel szembeni elvárások: nagyfokú polimorfizmus, kodomináns öröklődés, az allélek egyértelmű jelölése (megkülönböztethetősége), reprodukálhatóság, költségtakarékosság, az adatok kicserélhetősége a laboratóriumok között (Bretting és Widrlechner, 1995, Kiss, 1999a).

Az elmúlt évtizedben a mikroszatellit markerek fejlesztésére és felhasználására számos kutatás indult gazdasági növények, pl.: szója (*Glycine max* (L.) Merr.), kukorica (*Zea mays* L.), búza (*Triticum aestivum* L.), napraforgó (*Helianthus annuus* L.) esetében (Brunel 1994, Devos et al. 1994, Senior *et al.* 1996, Cregan *et al.* 1999). A rózsafélék (*Rosaceae*) közül leginkább az alma, cseresznye, kajszli- és őszibarack esetében indultak meg az SSR vizsgálatok (Pedryc *et al.* 2002). Almában 1997-ben azonosították Guilford *et al.* az első mikroszatellit markereket a 'Royal Gala' fajtából (Halász, 2010).

A morfológiai fajta jellemzések mellett egyre terjed a DNS szintű azonosítás, leggyakrabban mikroszatellitek (SSR-ek) alkalmazásával. Napjainkban az alma esetében már csaknem 300 mikroszatellit marker áll a kutatók rendelkezésére (Guilford et al, 1997, Hokanson et al, 2006) Az SSR markerek alkalmazási köre almánál rendkívül sokoldalú: a génbanki gyűjtemények genetikai diverzitásának meghatározásától (Guarino et al, 2006, Potts et al, 2011), a fajtaazonosításon át (Guilford et. al, 1997, Laurens et al, 2004, Galli et al, 2005, Wichmann et al, 2007) a szülők, illetve a származás azonosításáig (Kitahara et al, 2005, Reim et al, 2008, Király et al, 2009, Moriya et al, 2012, Evans et al, 2011).

A régi almafajták esetében korábban elkülönülten alkalmazták a fajták azonosítására a genetikai, avagy a morfológiai vizsgálatokat, illetve pomológiai leírásokat, viszont egyre több munka számol be a párhuzamosan végzett genetikai, morfológiai és biológiai vizsgálatok, s az eredmények között kimutatható statisztikai összefüggések kereséséről (Gasi és mtsai, 2010, Király és mtsai, 2012). A Gyümölcsstermő Növények tanszéken 2007-óta folyó egyik munka célja a genetikai diverzitás meghatározása a génbanki gyűjteményben. A single-lókuszos SSR markerek használatakor több fajta esetében is 3 allélt detektáltunk több lókuszon.

2.8. Flow cytometria

Az áramlási citometria („Flow cytometria”) sejtek gyors, multiparaméteres vizsgálatára alkalmas laboratóriumi módszer. Segítségével kevert sejtpopulációkban az egyes sejttípusok külön mérhetőek, analizálhatók és szeparálhatóak fenotípusuk, vagy funkcionális állapotuk szerint.

A flow cytometria egy lézer alapú biofizikai technológia, amit többek között használnak sejtek számlálására, szétválasztására, biomarkerek detektálására, és ploiditás mérésére. A mérés elve,

hogy a sejtek áramlását megállítja a folyadékban és egy elektronikus detektáló készülékkel vizsgálja őket. Ez lehetővé teszi több ezer részecske egy másodperc alatt történő vizsgálatát.

Használata főként az orvostudományban elterjedt, használják egészségügyi zavarok diagnosztizálására, különösen a vérrák megállapítására, de sok másalkalmazása is van a klinikai gyakorlatban.

Az első Coulter elven alapuló impedancia alapú flow cytométert 1953-ban szabadalmaztatta Wallace H.Coulter. Mack Fulwyer volt a feltalálója a mai flow cytométerek elődjének(Dolezel et al, 2007)

Az első fluorescens alapú flow cytométer készüléket (ICP 11) 1968-ban fejlesztette ki Wolfgang Göhbe a Münsteri Egyetemen. Ebben az időben az abszorpciós módszereket támogatták széles körben a fluorescens módszerekkel ellentétben, azonban hamarosan új cytometriás eszközöket fejlesztettek, mint például az első FACS készülék Becton Dickinson-tól 1974-ben. Az áramlási cytometria eredeti neve az impulzus cytometria volt, ami az első szabadalmaztatott alkalmazáson a fluorescens technikán alapszik (Sack et al, 2006)

A flow cytometria gyorsan, pontosan és kényelmesen képes a nukleáris DNS mérésre ezért egyre inkább elterjedt és kedvelt módszer a ploid szint meghatározására (Benett and Leitch,1995, Galbraith et al, 1983).

Arumuganathan és Erle (1991) a nukleáris DNS mérésre kialakított egy protokollt melynek segítségével meghatározta több mint száz fontos növényfaj ploiditását.

Svéd almafajták ploiditás vizsgálatánál már eredményesen alkalmaztak flow cytometria vizsgálatokat és fedtek fel vele triploid és tetraploid fajtákat (Garkava-Gustavson, 2008).

Több történelmi fajta esetében történt már Flow cytométeres vizsgálat a ploiditás bizonyításának céljából. Halász (2011) többek között a 'Vajki almát', 'Kanadai renetet' és a 'Nemes sóvári' valamint a 'Marosszéki piros' fajtát is vizsgálta ezzel a módszerrel.

3. Anyag és módszertan

3.1. Kísérlet helye

A vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcstermő Növények Tanszék soroksári génbanki gyűjteményében végeztük (1. ábra). A Gyümölcstermő Növények Tanszék soroksári génbanki gyűjteményében mintegy 200 régi almafajta található, amelyek különböző gyűjtési helyről származnak. A gyűjtemény harmadát azok a régi kárpát-medencei fajták teszik ki, amelyeket az Angol Nemzeti Fajtagyűjteményből hoztunk vissza. A többi fajta Kárpátaljáról, Erdélyből, az Aggteleki Nemzeti Park területéről és a Mecsekből került begyűjtésre. A fákat 2002-ben telepítették, MM106-os alanyon.



1. ábra. Soroksári történelmi alma fajtagyűjtemény (Fotó: Király)

Soroksár az Alföld északnyugati részén, a Duna öntésterületén helyezkedik el, így a talajok nagy része a Duna meszes homokhordalékán képződött. A területre jellemző a száraz, gyakran aszályos alföldi klíma. Szász és Tőkei (1997) szerint a terület évi átlaghőmérséklete 11,3 °C, napsütéses órák száma 2079 óra, az átlagos éves csapadékmennyiség 560 mm. 2010-es talajvizsgálati adataink szerint az ültetvény talaja alacsony kalciumtartalmú (2,44%) homokos vályogtalaj, a szénsavas mésztartalom 5,04%. A talaj pH-ja 7,86, Arany-féle kötöttsége (KA) <30, humusztartalom 0,891%

A markeranalízist a Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcstermő Növények Tanszék Molekuláris biológiai laboratóriumában (2. ábra), míg a pollen morfológiai, valamint a pollentömlő hajtás vizsgálatot a Rügyvizsgáló laboratóriumában végeztük. Flow cytometria mérésre az MTA Szegedi Biotechnológiai Intézetében került sor.



2. ábra. Gyümölcsstermő Növények Tanszék molekuláris laboratóriuma (Fotó: Király)

3.2. Vizsgálatok anyaga és időtartama

Vizsgálatainkat 2011- és 2012-ben végeztük. Egyes fajták esetében csak egyik vagy másik módszert tudtuk megvalósítani a 2 év során.

A vizsgált fajták a következők voltak:

- 'Entz Rozmaring'
- 'Dániel féle renet'
- 'Kanadai renet'
- 'Cigány alma'
- 'Nyári fontos'
- 'Nemes sóvári'
- 'Vajki alma'
- 'Liberty'
- 'Cserepánya'
- 'Csíkos óriás halasi'
- 'Marosszéki piros'
- 'Cordelia' (diploid kontroll)

A 'Liberty' fajta esetében a vizsgálatot az tette indokoltá, hogy a szakirodalom triploid fajtaként írja le, Hegedűs (2008) három S allélt említ a fajtánál azonban a nemesítésben mint diploid fajtát használták eddig porzó partnerként és kielégítő kötődést tapasztaltak. Broothaerts et al.(2004) is felhívja a figyelmet a 'Liberty' fajta ploiditásának torzulására.

A 'Cserepánya', 'Csíkos óriás halasi' és a 'Marosszéki piros' fajták esetében csak flow cytométeres vizsgálatot, valamint SSR markerezést végeztünk, mivel a többi kísérlet elvégzéséhez elegendő virágot, ezzel együtt pollent nem tudtunk begyűjteni.

3.3. Vizsgálatok módszere

A már fenn említett fajták ploiditásának vizsgálata során több módszerrel is próbáltuk bebizonyítani, hogy diploid vagy triploid fajtákról van-e szó. Ezen módszereket szeretném a továbbiakban részletesen ismertetni.

3.3.1. Molekuláris markerezés mikroszatellit (SSR) markerekkel

A vizsgálatot 2011-2012-ben végeztük a következő fajtákon. 'Cigány alma', 'Dániel féle renet', 'Entz rozmaring', 'Kanadai renet', 'Nemes sóvári', 'Nyári fontos', 'Vajki alma', 'Liberty'. Diploid kontrollként a 'Jonathan M41'-et használtuk. Valamint bevontuk még a vizsgálatba a 'Cserepánya', a 'Csíkos óriás halasi', valamint a 'Marosszéki piros fajtákat' is.

A mintavételezés során lehetőség szerint fiatal, 1-2 cm hosszú, még összesodrott leveleket gyűjtöttünk tavasszal, kora nyáron. A mintákat hűtve szállítottuk, és - 20°C-on tároltuk a DNS izolálás megkezdéséig.

A genomi DNS-t a friss vagy fagyasztott fiatal levelekből vagy rügyekből DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kivonó-szett használatával a gyártó leírása alapján vontuk ki. A DNS minőségét 1%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztük.

A molekuláris vizsgálatokat 19 nagymértékű polimorfizmust mutató mikroszatellit lókuszon (1. táblázat) végeztük, kivéve a 'Cserepánya', 'Csíkos óriás halasi' és a 'Marosszéki piros' fajták esetében, melyeket csak 12 lókuszon vizsgáltunk. A primerpárok forward tagja fluoreszcens festékkel (JOE; FAM) volt jelölve.

1. Táblázat. Felhasznált primerek és jellemzőik

Név	Szekvencia	Festék	Fragment (bp)	LG	Hivatkozás
CH01f02 F	acc aca tta gag cag ttg agg	JOE	174–206	12	Gianfranceschi 1998;
CH01f02 R	ctg gtt tgt ttt cct cca gc				
CH01h01 F	gaa aga ctt gca gtg gga gc	JOE	114–134	17	Gianfranceschi 1998;
CH01h01 R	gga gtg ggt ttg aga agg tt				
CH02c09 F	tta tgt acc aac ttt gct aac ctc	6FAM	233–257	15	Liebhard 2002
CH02c09 R	aga agc agc aga gga gga tg				
CH02c11 F	tga agg caa tca ctc tgt gc	6FAM	219–239	10	Liebhard 2002
CH02c11 R	ttc cga gaa tcc tct tcg ac				
CH02d08 F	tcc aaa atg gcg tac ctc tc	6FAM	210–254	11	Liebhard 2002
CH02d08 R	gca gac act cac tca cta tct ctc				
CH02c02a F	ctt caa gtt cag cat caa gac aa	JOE	129–176	2	Liebhard 2002
CH02c02a R	tag ggc aca ctt gct ggt c				
CH05e03 F	cga ata ttt tca ctc tga ctg gg	6FAM	158–190	2	Liebhard 2002
CH05e03 R	caa gtt gtt gta ctg ctc cga c				
CH04e03 F	ttg aag atg ttt ggc tgt gc	6FAM	179–222	5	Liebhard 2002
CH04e03 R	tgc atg tct gtc tcc tcc at				
CH05d11 F	cac aac ctg ata tcc ggg ac	JOE	171–211	12	Liebhard 2002
CH05d11 R	gag aag gtc gta cat tcc tca a				
CH03g07 F	aat aag cat tca aag caa tcc g	6FAM	119–181	3	Liebhard 2002
CH03g07 R	ttt ttc caa atc gag ttt cgt t				
CH03a02 F	ttg tgg acg ttc tgt gtt gg	6FAM	124–184	14	Liebhard 2002
CH03a02 R	caa gtt caa cag ctc aag atg a				
CH05c04 F	cct tcg tta tct tcc ttg cat t	6FAM	186–258	13	Liebhard 2002
CH05c04 R	gag ctt aag aat aag aga agg gg				
CH01f03b-F	gag aag caa atg caa aac cc	6FAM	139–183	9	Liebhard 2002
CH01f03b-R	ctc ccc ggc tcc tat tct ac				
CH01h10-F	tgc aaa gat agg tag ata tat gcc	6FAM	94–114	8	Gianfranceschi 1998;
CH01h10-R	agg agg gat tgt ttg tgc ac				
CH04c07-F	ggc ctt cca tgt ctc aga ag	6FAM	98–135	14	Liebhard 2002
CH04c07-R	cct cat gcc ctc cac taa ca				
CH04e05*-F	agg cta aca gaa atg tgg ttt g	6FAM	174–227	7	Liebhard 2002
CH04e05*-R	atg gct cct att gcc atc at				
GD12-F	ttg agg tgt ttc tcc cat tgg a	6FAM	141–191		Hokanson 1998
GD12-R	cta acg aag ccg cca ttt ctt t				
GD147-F	tcc cgc cat ttc tct gc	6FAM	135–155	13	Hokanson 1998,
GD147-R	gtt taa acc gct gct gct gaa c				
Hi02c07-F	aga gct acg ggg atc caa at	6FAM	108–150	1	Silfverberg 2006
Hi02c07-R	gtt taa gca tcc cga ttg aaa gg				

A DNS szakaszok felszaporítása Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 típusú PCR készülékben történt 25 µl végtérfogattal, DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas), 25 ng DNS, 0,2 µM primer használatával. :

Ennek megfelelően egy PCR csőbe a következő mennyiségek kerültek:

- Dream Taq Green PCR Master Mix: 12,5µl
- Forward primer (10x): 2µl
- Reverse primer (10x): 2µl
- Steril desztillált víz: 7µl
- DNS: 1,5µl

végtérfogat: 25µl

Azonban minden egyes minta esetében csövenként elkészíteni a mintát időigényes, így minden primer esetében egy Master mix segítségével gyorsabb és legalább olyan hatékony munkát végezhetünk.

A primerenkénti Master mixet megfelelően feliratozott eppendorf csövekbe állítjuk össze, azonban a DNS nem kerül bele ebbe a mixbe. A DNS mennyiséget PCR csövenként adagoljuk, csövenként 1,5 µl mennyiséget. Ez után adjuk bele a 23,5 µl Master mixet a már DNS-t tartalmazó PCR csőbe. A DNS szakaszok felszaporítása Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 típusú PCR készülékben történt 25 µl végtérfogattal Galli et al. (2005) által alkalmazott programmal (2. táblázat). A program kiválasztása után indul a folyamat, mely összesen 1,5-2 órát vesz igénybe.

2. Táblázat. A PCR reakció során alkalmazott program (Galli et al. 2005)

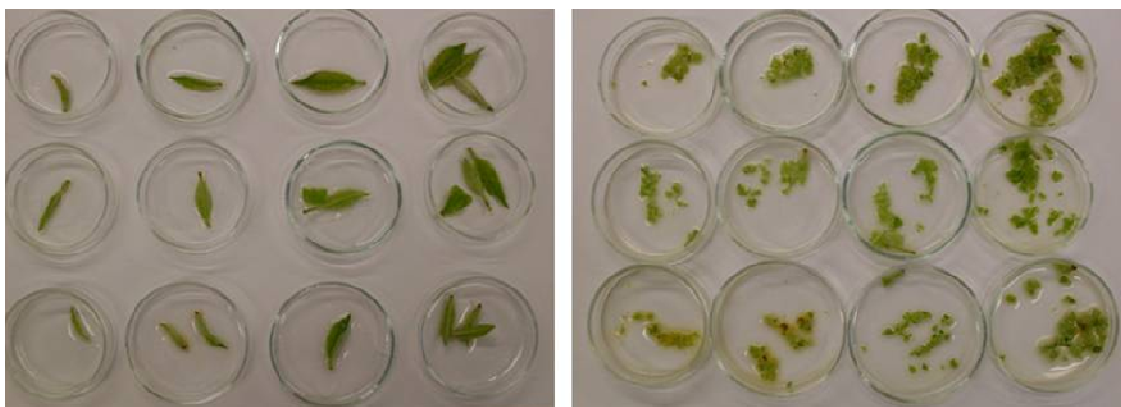
Ciklusszám	Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam
	Elődenaturáció	94°C	2 perc
35x	Denaturáció	94°C	20 másodperc
	Primerek bekötése	56°C	30 másodperc
	Lánchosszabbítás	72°C	1 perc
	Utóbefoltozás	72°C	5 perc
	Hűtés	4°C	∞

A PCR-termékeket előzetesen 1%-os agaróz gélen GR Safe (Lab Supply Mall) festéssel UV fényben teszteltük. A fluoreszcens festékekkel (JOE; FAM) jelölt PRC termékből a különböző fragmentumok detektálását ABI Prism 3100 Genetic Analyzer és ABI 3130xl (Applied Biosystems) szekvenáló készülékkel a Biomi Kft. (Gödöllő) készítette. A fragmentumok hosszúságának

meghatározása, eredmények kiértékelése GenoGrapher 1.6 és Peak Scanner v1.0 szoftverek segítségével készült.

3.3.2. Flow Cytometria

A minták elkészítéséhez két-három darab, növekedésben lévő hajtáscsúcsi legfiatalabb levél csúcsi részét (mintegy 1 cm²-nyi levéldarabot) egy 5 cm átmérőjű Petri csészében borotvapengével 1 ml izoláló puffer jelenlétében apróra daraboltunk. A vizsgálathoz leginkább megfelelő méret elérése érdekében aprítási sort készítettünk. A levélkéket 3 méretre vágtuk össze 4 különböző mennyiségben (3. ábra).



3. ábra Minta előkészítés (Fotó: Király)

A sejtmagok izolálásához első alkalommal egy széles körben elterjedt izoláló puffert alkalmaztunk (Galbraith et al., 1983) melynek összetevői 20 mmol/l 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 34 mmol/l Na₃ citrát valamint 45 mmol/l MgCl₂. Második alkalommal már az LB01-es puffert, mely alkalmasabbnak bizonyult a vizsgálat során, melynek összetevőit a 3. táblázatban tüntettem fel.

3. Táblázat. LB01 puffer receptje

Összetevők	Mennyiség
TRIS 15mM	366.4 mg
Na2EDTA 2 mM	149.9 mg
Spermine 0.5 mM	20.2 mg
KCl 80 mM	1.193 g
NaCl 20 mM	233.8 mg
Mercaptoethanol 15 mM	220 µl
TRITON X-100 0,1 %	200 µl

Ezt követően a szuszpenziót egy 30 µm-es CellTricks (Partec GmbH) átszűrtük, s a mintákat bemérésig 4°C-on hűtve tároltuk. A DNS jelölésére szolgáló fluoreszcens festéket (propidium-jodid) közvetlenül a mérés előtt adtuk a mintákhoz (20 µl/minta), így a propidium-jodid koncentrációja a mintákban 4 µg/ml. A műszeres mérést az MTA Szegedi Biotechnológiai Intézet FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométerével (4. ábra) Kotogány Edit és Fehér Nóra irányításával végeztük el. A diploid kontroll 200-as sávra lett kalibrálva és ehhez képest a triploidok 300-nál, míg a tetraploid fajták várhatóan 400 körül adnak csúcsot. A vizsgálatot az összes fajtán elvégeztük, diploid kontrollként a 'Jonathan' fajtát használtuk, míg triploidként a 'Jonagold Wilmuta' fajtát.



4. ábra. FACSCalibur áramlási citométer

3.3.3. Keresztezés

A szabadföldi vizsgálatokat az alma virágzásának kezdetétől (április) az érési időszak végéig (szeptember) végeztük 2011-ben és 2012-ben.

Anya partnerként 'Jonathan M41', 'Watson Jonathan', 'Szatmárcsekei Jonathan', valamint 'Jonathan Csány 1' fajtákat használtam. A kombinációkat az 4. és 5. táblázat tartalmazza. Pollenadó fajtánként mindegyikkel 100 virágot poroztam be fogpiszkáló vagy fültisztító pálcá segítségével. Azonban a beporzás megkezdése előtt a megporzandó virágot szzirombimbó stádiumban kasztrálni kellett a körülötte lévő többi bimbót vagy virágkezdeményt pedig kicsípni. Virágzatonként egy, maximum kettő virágot hagytunk. Kasztrálás során fontos volt, hogy ne túl mélyen végezzük, mivel azzal a bibe könnyen megsérthető lenne. Azokat a vesszőket, melyeken keresztezést végeztem, faiskolai címkével jelöltem, valamint keresztezési adatlapokra is felvezettem az adatokat.

A keresztezést követően az egyes kombinációkban a terméskötődés mértékét három időpontban értékeltük. Az első kötődés értékelését a tisztuló hullás után végeztük, amikor a nem termékenyült terméskezdemények lehullottak néhány héttel a keresztezés után. A második

értékelést a júniusi gyümölcshullás után végeztük. Az első két alkalommal csak megszámláltam a keresztezésből származó kötődött gyümölcsöket, míg harmadik számolás akkor volt, amikor vizsgálat céljából begyűjtöttem őket.

4. Táblázat. 2011 évi keresztezési kombinációk

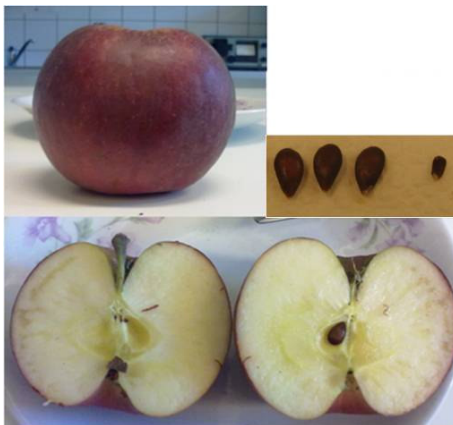
Anya	Apa
Csány 1	Dániel féle renet
Jonathan Csány 1	Cordelia
Jonathan Csány 1	Entz Rozmaring
Watson Jonathan	Entz Rozmaring
Watson Jonathan	Cigány alma
Jonathan M 41	Liberty
Jonathan M 41	Kanadai renet
Jonathan M 41	Nyári Fontos
Szatmárcsekei Jonathan	Vajki alma

5. Táblázat. 2012 évi keresztezési kombinációk

Anya	Apa
Jonathan M 41	Cordelia
Szatmárcsekei Jonathan	Cordelia
Szatmárcsekei Jonathan	Cordelia
Szatmárcsekei Jonathan	Entz Rozmaring
Szatmárcsekei Jonathan	Entz Rozmaring
Jonathan Csány 1	Liberty
Watson Jonathan	Dániel féle renet
Watson Jonathan	Cigány alma
Watson Jonathan	Kanadai renet

3.3.4. Kötődött gyümölcsök magtartalmának vizsgálata

A beérett gyümölcsökben megszámoltuk az ép és léha magvakat, hogy az a 5. ábrán is látható. A vizsgálatban azok a gyümölcsök szerepeltek melyek az 4. és 5. táblázatban látható szülők keresztezéséből származtak.



5. ábra Gyümölcsök magtartalmának vizsgálata

3.3.5. Pollenmorfológia

A vizsgálat 2011-ben tavasszal, míg 2012-ben az őszi hónapokban zajlott le. A második vizsgálati évben a polleneket felhasználás előtt 5 hónapig fagyasztoóban tároltuk.

A módszer itt is a tárgylemezre fültisztítóval felvitt pollenekkel kezdődik. Azonban a továbbiakban csak 3-4 csepp kármínecetsavat csöppentek rá és lezárom tárgylemezzel. Ez esetben is legalább 1 hét várakozási időre van szükség a vizsgálat kiértékeléséhez. A vizsgálat értékeléséhez szükséges fényképek Zeiss Axio Vision típusú mikroszkóppal készültek differenciál-interferenciakontraszt (Nomarski-DIC) módban. A vizsgálatban szereplő fajtákat a 6. táblázat tartalmazza.

3.3.6. Pollen csírázó képesség

A vizsgálatokat 2011 tavaszán, valamint második évben 2012 őszén végeztük.

Tavasszal a virágzás megindulásakor, illetőleg előtte április hónapban ballon stádiumú virágokat gyűjtöttünk. Ezekből a teljesen kifejlett virágokból már életképes polleneket tudtam kinyerni. A virágok begyűjtése után azonnal kiszedtem a portokokat. Fajtánként elszeparálva legalább 3-4 napig szárítottam őket hűvös, száraz, napfénytől védett helyen, míg a portokokból el nem kezdtek a pollenek kiszóródni. Ezek után jól zárható vattával kibélelt műanyag dobozban tároltam a portokokat egészen a felhasználásukig. Az első évben a friss mintával készítettem el a

csíráztatást, míg idén a második évben fagyasztott mintákkal dolgoztam a 6. táblázatban felsorolt fajtákkal.

A módszer pontos menete a következő:

A vizsgálat első évében üveg keverőpálca segítségével közvetlen a tárgylemezen törtük fel a portokokat. A következő évben fültisztító pálca segítségével vittem fel a polleneket a tárgylemezre.

A pollenek megfelelő felvitele után a tárgylemezek stabil, lehetőleg háborítatlan, vízszintes helyre kerültek, hogy a továbbiakban ne kelljen mozgatni őket. A pollenekre 10 és 15%-os cukoroldatból csöppentettünk 6-8 cseppet. A csöppentés után legalább 6 órát hagyni kellett állni, közben folyamatosan ügyelve arra, hogy az oldat ne száradjon fel róla. A 6 órás várakozás után 3-4 csepp kármínecetsavval festettem meg a már előkészített polleneket. A megfestett mintát fedőlemezzel lezártam és minimum 1 hétig hagytam állni a megfelelő száradás érdekében. Teljesen száraz állapotban vizsgáltam Olympus BX41 fénymikroszkóp alatt többféle nagyítással (10, 20, 40x), valamint fényképeket készítettem 20-szoros nagyítás mellett.

6. táblázat Pollen csírázás és pollen morfológia vizsgálatban szereplő fajták

2011	2012
Kanadai renet	Kanadai renet
Dániel féle renet	Dániel féle renet
Entz rozmaring	Entz rozmaring
Cigány alm	Cigány alma
Nemes sóvári	Nemes sóvári
Vajki alma	Vajki alma
Liberty	Liberty
Nyári fontos	Cordelia
Cordelia	

4. Eredmények

4.1. Molekuláris markerezés mikroszatellit (SSR) markerekkel:

Azok a fajták tekinthetők triploidnak a kísérlet szempontjából, melyeknél egy lókuszon három fragmentet is kaptunk.

A markerezés eredményét bemutató táblázatokat az I. számú mellékletben közöltem nagy terjedelme miatt itt csupán az összegzett adatokat kívánom bemutatni. 'Cigány alma' 7, 'Dániel féle renet' 7, 'Entz rozmaring' 10, 'Kanadai renet' 10, 'Nemes sóvári' 12, 'Nyári fontos' 6, 'Vajki alma' 6 míg a 'Liberty' 2 fragmentnél mutatott triploiditást a 19-ből. A 'Cserepánya' 9, 'Csíkos óriás halasi' 4 fragment esetében bizonyult triploidnak a 12-ből (7. táblázat).

4.2. Flow Cytometria

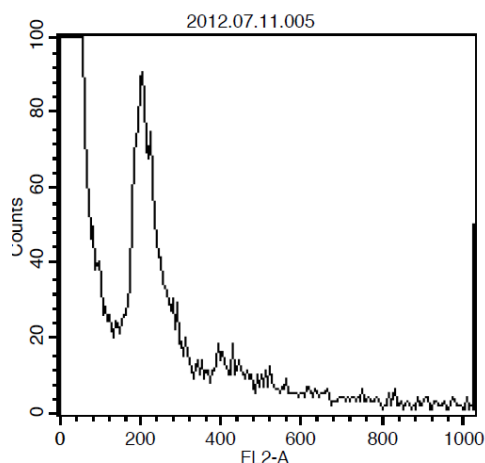
A ploiditás mérésnek ezt a módját 2012-ben végeztük. Hazai kutatók (Bodor, 2009, Halász, 2011) is leírták már, és mi is azt tapasztaltuk, hogy vizsgálat sikere olyan mértékben függ a minta előkészítéstől, hogy csak hosszadalmas előkísérletek után, nagy rutin esetén lehet sikeres eredményeket kapni. Négy alkalommal különféle aprítási nagyság és többféle mennyiség használatával kísérleteztünk. Az első mintaelőkészítés után azt tapasztaltuk, hogy a kevésbé zsege levelek aprítása nehezebb, és nem tartalmaz megfelelő mennyiségű, osztódásban lévő sejtmagot. A nagy mennyiségű minta szintén kerülendő, mert sokkal több szennyeződés (egyéb sejtalkotók) kerül így a pufferbe, és a flow cytométeres mérést lehetetlenné teszi. A következő mintaelőkészítések során már csak a csúcsi, legzsengébb, még összesodrott állapotú leveleket használtuk. Ezekből kb. 1 cm² területű levéldarab elegendőnek tűnt. A következő megoldásra váró probléma az aprítási méret volt. Háromféle aprítási méretet készítettünk: kb. 1 mm, 0,5 mm, és egy 0,5 mm-nél kisebb nagyságú darabokra vágott mintát teszteltünk. Azt tapasztaltuk, hogy a kisebb mértékű aprítás (tehát a nagyobb szemcseméret) nem adott megfelelő mennyiségű, mérhető sejtmagot. A túl kicsi szemcseméretű (0,5 mm alatti) minta viszont túl sok szennyeződést tartalmazott, ami zavarta a mérést.

A második alkalom után már be tudtuk állítani a megfelelő levélmennyiséget és az aprítási mértéket. Ezt alkalmaztuk a következő mintaelőkészítés során. Sajnos ekkor sem kaptuk egyértelmű eredményeket a műszeres mérés során, így folytattuk a probléma okának keresését. Ekkor (június közepén) a vártnál korábban beköszöntött a kánikula, és tartósan 30 foknál melegebbek voltak a nappalok, viszont még találtunk fejlődésben lévő leveleket, így tovább próbálkoztunk.

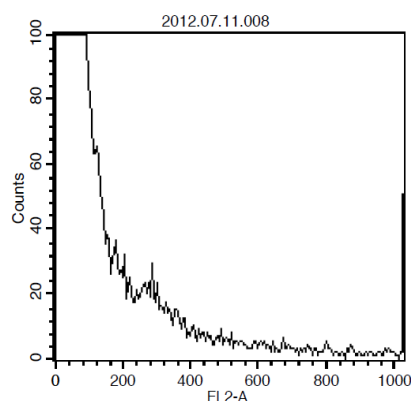
7. táblázat Molekuláris markerezés eredményei (X-el jelölt lókuszokon 3 allélt detektáltunk)

Fajta	CH01f02	CH01h01	CH02c02a	CH02c09	CH05e03	CH04e03	CH05d11	CH03g07	CH02c11	CH02d08	CH03a02	CH05c04	CH01f03b	CH01h10	CH04c07	CH04e05	GD12	GD147	Hi02c07	Triploid lókuszok aránya
Cordelia																				0/19
Jonathán M 41																				0/19
Cigány alma	x							x		x					x	x	x		x	7/19
Dániel féle renet	x							x		x					x	x	x		x	7/19
Entz Rozmaring			x	x	x	x	x	x		x					x	x		x		10/19
Kanadai renet		x	x	x	x	x		x	x	x			x				x			10/19
Nemes Sóvári	x		x	x	x		x		x	x		x			x	x	x	x		12/19
Nyári fontos				x			x		x				x		x		x			6/19
Vajki alma	x		x					x	x							x		x		6/19
Liberty											x								x	2/19
Cserepánya	x	x	x	x	x		x		x		x	x								9/12
Csíkos óriás halasi	x		x					x		x										4/12
Marosszéki piros																				0/12

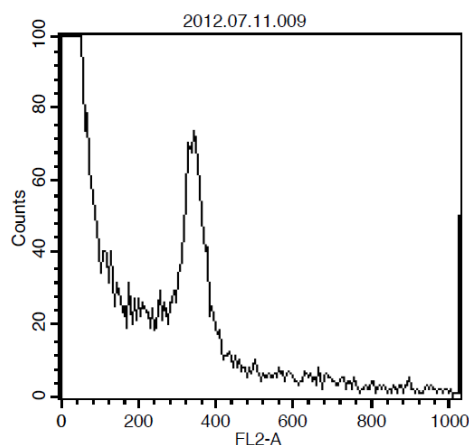
Az előkészített mintákat eddig jégakku - a minták és a jégakku közé papírt helyezve - szállítottuk Szegedre, a műszeres mérés helyszínére. A minták nagyon érzékenyek a melege (4 °C az optimális tárolási és szállítási hőmérséklet), és megfagyni sem szabad a szuszpenzióknak. Az esetleges helytelen szállítási körülmények kiküszöbölése érdekében a negyedik alkalommal csak pár előre elkészített mintát vittünk, és elvittük a maradék levélmintákat is Szegedre. Az előre elkészített minták szintén nem voltak bemérhetőek, de a kutató intézetben segítők sem tudták megmondani, mi lehet a probléma. Ezért a helyszíni mintaelőkészítést is kipróbáltuk az eddig alkalmazott Galbrith puffer, és egy eltérő összetételű LB-01 puffer használatával. A Galbrith pufferrel előkészített minták így sem voltak bemérhetőek. Az okát nem tudjuk. Viszont az LB-01 puffer néhány minta esetében sikeresen működött. A kontroll 'Jonathan' nagyon szépen adta 200-nál a csúcsot (6. ábra) ami a diploid fajtákra jellemző, míg 'Entz rozmaring' 300-nál mutatta a csúcsot vagyis triploidként értékelhető a 'Vajki alma' 400 körüli csúcsot adott (8. ábra), amiből következtetni lehet, hogy a fajta vélhetően tetraploid. Értékelhető eredményt kaptunk a 'Marosszéki piros' (III/a melléklet) esetén melynél 200 körüli csúcsot kaptunk tehát a fajta diploid valamint 300-nál adott csúcsot a 'Jonagold Wilmuta' (7. ábra) mely érték szerint triploid, továbbá a 'Csíkos óriás' és a 'Cserepánya' fajtánál közel 400-as érték szerint vélhetően tetraploid. Az utóbbi két fajta mérésének képet a III. számú melléklet tartalmazza.



6. ábra 'Jonathan' (diploid kontroll) Flow cytometria eredménye



7. ábra 'Jonagold Wilmuta' (triploid kontroll) Flow cytometria eredménye



8. ábra 'Vajki alma' Flow cytometria eredménye

4.3. Keresztezés

2011-ben végzett keresztezés (8. táblázat) eredményein jól látszik a 3 hullási periódus, mely során a rosszul kötődött gyümölcsöket a fa lerúgta. A legtöbb gyümölcs, mely a keresztezésből származott, a diploid kontrollként használt 'Cordelia' fajtából maradt a fán. Azonban a legtöbb triploidnak vélt fajtával való keresztezés eredményeként 0 vagy épp csak 1-2 gyümölcs maradt.

2012-ben az eredmények már sokkal kaotikusabban, hisz a diploid kontrollként használt Cordelia fajtával való keresztezés után kevesebb gyümölcsöt kaptunk, mint némelyik triploidnak vélt után. A lehetséges magyarázat a tavasszal, április 10-én bekövetkezett mínusz 7°C-os majd az április 14-én történt -4°C-os lehülés, amely néhány fajtán jelentős fagykárokat okozott. A 9. táblázatban jól látszik, hogy az első alkalommal, április 23-án végzett keresztezések nagyon alacsony kötődési százalékokat mutattak. Ennek oka, hogy a fagy bekövetkezte után néhány nappal lehullanak a károsodott bimbók, illetve virágok, és ezeket értelemszerűen már nem tudjuk keresztezni. Viszont a fagy fellépésének idejéhez közelebbi keresztezés elvégezhető volt, mert gyakran a bibéken nem látszott a fagykár, ennek ellenére károsodhatott a termő.

8. Táblázat. 2011-es keresztezés kombinációi és részletei

Anya	Apa	Kijelölt virág	I (össz)	II (össz)	III. (szedés)	Összesen kijelölt virág	Kötődött gyümölcs (szedés)	Keresztezés időpontja
Jonathan	Dániel féle renet	100	44	5	4	100	3%	2011 04 21
	Entz rozmaring	66	23	2	1	101	1%	2011 04 21
		35	10	0	0			
	Cigány alma	114	19	3	1	114	1%	2011 04 21
	Liberty	82	50	7	3	82	4%	2011 04 21
	Kanadai renet	102	47	4	1	102	1%	2011 04 21
	Nyári Fontos	58	26	4	0	58	0%	2011 04 21
	Vajki alma	119	50	0	0	119	0%	2011 04 21
	Cordelia (diploid kontroll)	98	32	6	5	98	5%	2011 04 21

9. Táblázat. 2012-es keresztezés kombinációi és részletei

Anya	Apa	Kijelölt virág	I (össz)	II (össz)	III. (szedés)	Összesen kijelölt virág	Kötődött gyümölcs (szedés)	Keresztezés időpontja
Jonathan	Dániel féle renet	102	42	6	5	102	5%	2012 04 26
	Entz rozmaring	42	31	7	2	103	2%	2012 04 23
		61	26	0	0			
	Cigány alma	109	82	11	4	109	4%	2012 04 26
	Liberty	101	47	4	3	101	3%	2012 04 23
	Kanadai renet	102	30	5	5	102	5%	2012 04 26
	Cordelia (diploid kontroll)	26	15	2	1	101	2%	2012 04 23
		24	14	0	0			
		51	27	5	1			

4.4. Kötődött gyümölcsök magtartalmának vizsgálata

A keresztezésből származó gyümölcsöket mindkét évben laboratóriumban vizsgáltuk magjaik száma és életképessége szempontjából.

2011-ben a gyümölcsökből származó magok(10. táblázat) több mint 95%-a ép és telt volt, míg csak alig 5% volt a léha magok száma. Fajtákra levetítve mindez csupán annyit jelent, hogy az 'Entz Rozmaring' és a 'Dániel féle renet' 'Jonathan Csány 1'-el való keresztezésein kívül másból nem kaptunk léha magvakat. Az ez évi átlagos ép magszám a gyümölcsökben 4 darab volt. A legnagyobb magszámot a 'Liberty'-vel való keresztezés eredményezte, az összes gyümölcsben 23 mag volt található, egy gyümölcsben pedig átlagosan 7 mag volt, továbbá ebből a keresztezésből olyan gyümölcs nem maradt a fán, melyben léha mag volt. A legkevesebb mag a 'Kanadai renet'-tel való keresztezésből származó egyetlen gyümölcsben talált 2 ép mag volt.

10. Táblázat. Gyümölcsök magtartalma 2011

Anya	Apa	Vizsgált gyümölcs	Telt magok	Léha magok	Összes mag	Telt magvak száma	Léha magvak száma
Jonathan	Dániel féle renet	4 db	0	1	11	10	1
			3	0			
			5	0			
			2	0			
	Kanadai renet	1 db	2	0	2	2	0
	Liberty	3 db	7	0	23	23	0
			7	0			
			9	0			
	Entz Rozmaring	1 db	1	2	3	1	2
	Cigány alma	1 db	3	0	3	3	0
	Cordelia	5 db	5	0	19	19	0
			3	0			
			5	0			
			5	0			
			1	0			

11. Táblázat. Gyümölcsök magtartalma 2012

Anya	Apa	Vizsgált gyümölcs	Telt magok	Léha magok	Összes mag	Telt magvak száma	Léha magvak száma
Jonathán	Dániel féle renet	5 db	3	1	29	23	6
			5	1			
			5	2			
			3	1			
			7	1			
	Kanadai renet	5 db	5	1	31	27	4
			7	0			
			4	2			
			5	0			
			6	1			
	Liberty	3 db	3	6	21	15	6
			6	0			
			6	0			
	Entz Rozmaring	2 db	5	1	11	9	2
			4	1			
	Cigány alma	4 db	2	1	22	21	1
			8	0			
			7	0			
			4	0			
	Cordelia	2 db	4	0	11	11	0
			7	0			

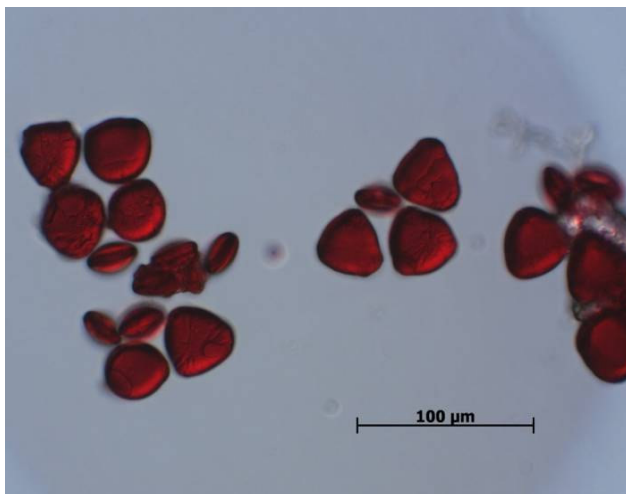
A 2012-ben elvégzett gyümölcs vizsgálatokból (11. táblázat) kiderül, hogy az összes vizsgált mag mintegy 82 % az, mely ép, míg a 18 % léha magnak számít. Az előző évhez képest 2012-ben sokkal több gyümölcs vizsgálatánál találtunk léha magvakat. Az átlagos ép magok száma 5 db volt gyümölcsönként, míg a léha magoké 1 db. A vizsgált gyümölcsök közül a 'Kanadai renet' emelkedett ki a legtöbb telt maggal, 32 darabbal melyből 5 db bizonyult léha magnak. A legkevesebb telt mag az 'Entz rozmaring' fajtával való keresztezésből származott mindössze 9 db. A legtöbb léha magot a 'Kanadai és a Dániel féle renet', valamint a 'Liberty' fajta tartalmazta.

4.5. Pollenmorfológia

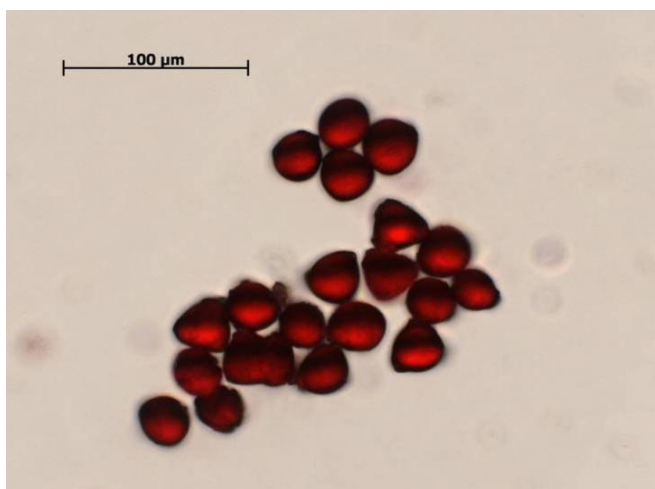
A vizsgálatot kitevő két évben egy fajta kivételével ugyanazon fajtákkal sikerült elvégeznünk a kísérletet. 2012-ben rajtunk kívülálló okokból (fagy, alternancia) a 'Nyári fontos fajtákról' pollent nem tudtunk gyűjteni.

A vizsgálat során a 'Cordelia' diploid kontroll fajta pollenjéhez (9. ábra) hasonlítottam hozzá a többi pollenből készült mintát. Teljesség igénye nélkül az eredmények részbe csak egy fajta

a 'Cigány alma' pollen morfológia fotóját tettem közzé (10. ábra) a további morfológia képeket a II. számú mellékletekben közöltem.



9. ábra. Cordelia fajta pollenmorfológiája (Fotó: Erős-Honti)



10. ábra. Cigány alma pollenmorfológiája (Fotó: Erős-Honti)

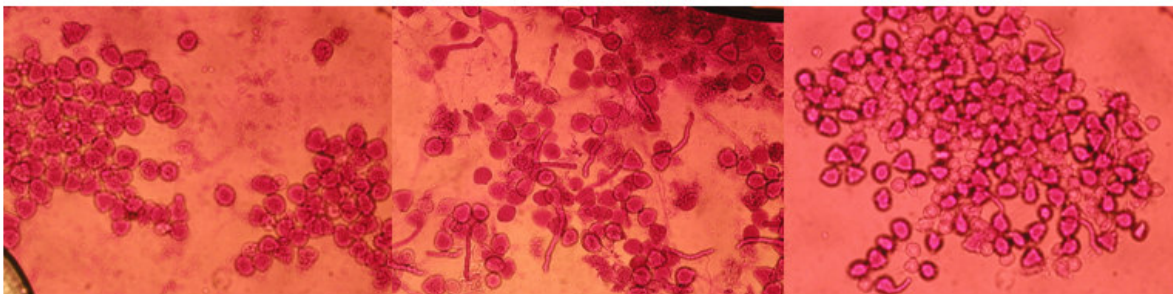
Mindkét évben arra az eredményre jutottunk, hogy a pollenek méretében, valamint alakjában különbség nincs a triploid fajták, valamint a kontroll diploid fajta között. Azonban teljes 100%-os megegyezés nem mondható a fajtákra, hisz alak tekintetében az enyhén háromszögletűtől a gömbölydedig minden forma megtalálható, azonban a legtöbb esetben az enyhén háromszögletes pollenek vannak domináns többségben. Méret tekintetében kevésbé szembetűnőek a különbségek, a pollenek túlnyomó többsége 15-30 µm nagyság között változik. A legnagyobb a 'Cordelia' fajta pollen mérete 30-35µm nagysággal míg a 'Liberty' esetében a legkisebbek a pollenszemcsék 15-20 µm-rel. A többi fajta tekintetében a nagyság minden esetben 25-35 µm közé esik. A mellékletekben

közölt további morfológiai képeken is jól láthatóak, hogy szinte minden esetben előfordulnak zsugorodott, túlságosan deformálódott, valószínűleg életképtelen pollenek.

4.6. Pollen csírázó képesség

A két vizsgálati évben kismértékben eltérő módszereket használtunk az „Anyag és módszer” fejezetben leírtak szerint. Eredményeink alapján a minta előkészítés akkor eredményesebb, ha a pollenszemeket nem üveg keverőpálcával, hanem fültisztító pálcá segítségével visszük fel a tárgylemezre, valamint a portokokat nem törjük meg, hanem néhány nap várakozás után azok maguktól felrepednek.

Egyik évben sem mutattak a fajták jelentős csírázást. Azon fajták esetében ahol mégis tapasztaltunk csírázást, ez az érték mindig 5% alatti volt. Azonban a legtöbb esetben egyáltalán nem mutattak csírázást a fajták. A diploid kontrollként használt 'Cordelia' fajta 15%-os csírázást mutatott, míg a triploid fajták egy kivételével egyik évben sem mutattak semmilyen csírázást a kivétel a 'Liberty' fajta volt, melynél 5%-os csírázás volt látható. A vélhetően tetraploid fajta ('Vajki alma') esetében 1% csírázás volt megfigyelhető (11. ábra).



11. ábra Pollen csírázás (Balról: 'Kanadai renet' (3n), 'Cordelia' (2n), 'Vajki alma' (4n))

5. Következtetések

Eredményeink meggyőzően bizonyítják, hogy a single-lókuszos mikroszatellit markerek jól alkalmazhatóak a fajták ploiditás szintjének ellenőrzésére. A triploid és tetraploid fajták leleplezhetők azzal, ha több mint 2 allél található egy lókuszon. A diploid fajták 2 fragmentet mutattak minden lókuszon. Ahol csak egy fragment volt detektálható ott homozigótának tekintettük, de a null allél jelenléte nem rekeszti ki azt, hogy heterozigóta legyen (Garkava 2008)

Halász et al. (2011) régi magyar almafajták S-allél összetételének, valamint ploid szint alapján, míg Király et al. (2011, 2012) mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálata alapján a 'Nemes sóvári' és 'Kanadai renet' fajtákat triploidnak találta. Broothaerts (2004) S-allél vizsgálatok tekintetében a Kanadai renet fajtát triploidnak találta. Tehát a szakirodalmi leírások és az általunk kapott SSR markerezési eredmények megegyeznek.

További pontosításra szorulnak a 'Liberty' fajta szóban forgó genetikai adottságai, hiszen Sakurai (2000) S-allél alapján diploidnak írta le a fajtát, míg Broothaerts et al. (2003), Tóth (2009) és Hegedűs (2010) a három S-allél alapján triploidnak. E fajtaival kapcsolatos SSR markerezési eredményeink alapján a fajta diploidnak mutatkozik.

A 'Vajki alma' esetében a molekuláris markerezés nem bizonyította, hogy a fajta tetraploid volna. Azonban Halász (2011) S-allél és flow cytométeres mérései alapján- melyek eredménye egyezik az általunk kapott flow citométeres mérés eredményével- a fajta vélhetően tetraploid.

Az 'Entz rozmaring', a 'Kanadai renet' és 'Cserepánya' fajták esetében a lókuszok több mint 50%-a esetén triploidnak mutatkoztak. A kísérletben szereplő többi fajtánál ('Dániel féle renet', 'Czigány alma', 'Nyári fontos', 'Csíkos óriás halasi'), pedig a lókuszok 30%-ban jelentkezett 3 allél. Flow cytometriás méréssel sikerült még a 'Jonathan', 'Vajki alma', 'Entz rozmaring', 'Marosszéki piros', 'Jonagold Wilmuta' fajták ploiditását meghatározni. Sikerült még bemérnünk a 'Csíkos óriás' és a 'Cserepánya' fajtákat. Mindkét esetben tetraploidnak tűnnek a fajták hisz közel 400 körüli értéknél adtak csúcsot.

Ahogy már az eredményeknél is említettem a flow cytometriavizsgálat szempontjából tökéletes módszert még nem sikerült kikísérleteznünk. A legjobban működő puffert megtaláltuk, de a hajtáscsúcsok korán bekövetkezett csúcsrügyben záródása miatt többször már nem tudtuk megismételni a kísérletet. Hisz a túl meleg időben a sejtek osztódása leállt, és a hajtás növekedés is megszűnt. Célunk, hogy jövő tavasszal a lombfakadás után folytassuk a vizsgálatot.

Az első évben végzett keresztezés végén a szakirodalommal egybecsengő eredményeket kaptunk, vagyis hogy a triploid fajták termékenyítő képessége alacsonyabb a diploidokhoz viszonyítva. Második évben a triploid keresztezésekből származó adatok ismét alátámasztották a szakirodalom állítását, miszerint a triploid fajták rossz pollenadók, sok pollenszem steril tehát

gyenge terméskötődés várható (Nyéki, 1980, Pethő, 1984). Azonban a második vizsgálati évben a diploid kontrollal való keresztezésből kevesebb gyümölcsöt kaptunk, mint a triploid keresztezésekből. Erre egyetlen logikus magyarázatként a virágzás ideje alatt sújtó kései fagykárt tudjuk felhozni. Ugyanis Davary-Nejad (1992) dolgozatában beszámol egy, a kísérlete alatt jelentkező fagykarról a virágzás előtt. És az azt követő keresztezés első értékelésekor 70-80%-os terméskötődéséről ír. A második értékelés időpontjára is csak 15-25%-al csökkent a kötődés értéke. Ezt követően azonban felgyorsult a hullás és a fajták többségénél 10% alatti volt a beérett gyümölcsök aránya szemben a fagymentes években tapasztalttal. A 2012-es keresztezési adatokat nézve ez a mi esetünkben is helytálló.

A kötődés vizsgálatához szorosan hozzátartozik a beérett gyümölcsök magtartalmának vizsgálata is, hiszen a gyümölcsök életképes telt magtartalma és a terméskötődés mértéke között pozitív összefüggést figyelhetünk meg. A kis magtartalom mellett alacsony mértékű a kötődés. Közepes (5-7 db/gyümölcs) magtartalom elegendő a gyümölcs normális fejlődéséhez. A megfelelő magtartalom nélkülözhetetlen feltétele a terméskezdemények fán maradásának (Davary-Nejad, 1992). Esetünkben a beérett gyümölcsök ép magtartalma mindkét évben a diploid kontrollnál beleesett a közepes tartományba, a triploidnak vélt fajták közül soknál fordult elő a három vagy kevesebb telt vagy a nagy számú léha mag. A gyümölcs fejlődésének első szakaszában a magok száma kedvező hatását gyakorol a gyümölcs méretére (Deveronico-Marro 1980). A magtartalmat a virágok elhelyezkedése, illetve a termékenyülési viszonyok befolyásolják leginkább (Silbereisen 1970). A gyümölcsönkénti szükséges magtartalom annál több, minél nagyobb a virágsűrűség és a megtermékenyült virágok aránya. Bő termés esetén a háromnál kevesebb magot tartalmazó gyümölcsök lehullanak (Teskey és Shoemaker 1972). A gyümölcsönkénti magkezdemények száma szintén befolyásolja a hullás mértékét (Davary-Nejad, 1992)

A pollenmorfológia vizsgálatok elsődleges célja az volt, hogy feltárja az esetleges különbségeket a triploid és diploid fajták pollenjei között. A pollenek mérete és felületi mintázottsága több szerző Fogle és Faust (1975), Maas (1977), Westwood (1978), valamint Martens és Fretz (1980) szerint alkalmas gyümölcsfajok és fajták megkülönböztetésére. Megfigyeléseink szerint azonban a diploid és triploid fajták pollenjének alakja egyforma, illetőleg nagyon hasonló és a méretbeli különbségek is igen csekélyek. Davary-Nejad (1992) is megerősítte dolgozatában, hogy fénymikroszkópos vizsgálattal különbség nem mutatható ki egyes fajták pollenmorfológiájában. Véleménye szerint a pollenszemcsék mérete és alakja egy adott fajta esetében teljesen egyforma, és a diploid almafajtákkal történő összehasonlítás esetén a triploid fajták semmilyen különleges sajátosságot sem mutatnak. Azonban a pollenek jellegzetességei segítségünkre lehetnek a fajták azonosításánál abban az esetben, ha más pomológiai ismertetőjegyekkel kombináljuk őket (Marucci et al, 1984). Seilheimer és Stösser (1982) szerint egyes triploid fajtáknál nagy számú a szabálytalan

alakú pollenszemek aránya. Tulajdonképpen minden fajta esetében megtalálhatóak voltak deformált pollenek, de a számuk igencsak elenyésző volt, valamint ez a szabálytalan alak betudható mind a triploiditásnak, mind annak, hogy a szorosan összetapadó pollenek alakváltozást idéznek elő egymáson.

Fontos célja volt dolgozatomnak a kijelölt fajták pollenjének csírázó képességének vizsgálata, labor körülmények között ezzel is alátámasztva a szabadföldi kísérletek eredményeit. Hisz ha laborban ideális körülmények között a pollen rossz csírázó képességet mutat, akkor a természetes körülmények között, ahol a körülmények nem tökéletesek, sem mutathat jobb eredményt. A legtöbb vizsgálat arról számol be, hogy a triploid almafajták gyenge csírázó képességűek és rossz termékenyítő tulajdonsággal rendelkeznek. Egyes triploid fajtáknál viszonylag magas a normálisan fejlődött pollenszemek aránya, a pollencsírázás mesterséges táptalajon és a bibén lényegesen csekélyebb, mint a diploid fajtáknál (Lalatta, 1982). A triploid almák fajtáinként különböző mértékben szabálytalan és nem csírázóképes pollent hoznak (Kobel, 1954). Brojanov és Donneveri (1984) szerint is a triploid almafajták pollenjének csírázása igen gyenge, ezek a fajták csak 5-10 %-os csírázási eredményt adnak. Ezt az állítást vizsgálataim alapján megerősíthetem, hisz mindkét évben többszöri ismétlés után is arra jutottunk, hogy az általunk vizsgált vélhetően triploid fajták pollen tömlőhajtó képessége sem haladta meg sosem a 10 %-ot, sőt legtöbb esetben csírázást alig mutattak. A mérsékelt pollentömlő növekedés a triploid almafajták esetében valószínűleg a pollenszemek kiegyensúlyozatlan kromoszóma viszonyaira vezethető vissza (Lalatta, 1982). Tehát szinte az összes szakirodalom, valamint vizsgálataink eredményei azt támasztják alá, miszerint a triploid fajták pollentömlőfejlesztő képessége kicsi, ezért megtermékenyítésre alkalmatlanok. A triploid almafajtákat a megporzás biztosítása érdekében diploid fajtákkal javasolják telepíteni (Krapf, 1975, Soltész, 1982).

6. Összefoglalás

Dolgozatom célja a kiválasztott történelmi almafajták ploiditásának vizsgálata különböző módszerekkel. Valamint az ezekből származó eredmények szakirodalommal való összevetése. Továbbá azt is vizsgáltam, hogy a különféle módszerek mennyire alkalmasak a ploiditás mérésére. Hisz ha újra termesztésbe szeretnénk vonni a régi fajtákat, a termesztésükhöz elengedhetetlen ismeret a megporzási viszonyaik, ezen belül a ploiditásuk is.

A vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcstermő Növények Tanszék soroksári génbanki gyűjteményében, a tanszéki laboratóriumokban valamint az MTA Szegedi Biotechnológiai Intézetében végeztük. 2011 és 2012 tavaszán és őszén.

Végeztünk keresztezést, SSR markerezést, Flow cytometriát, valamint vizsgáltuk a pollenek morfológiáját és csírázó képességét.

Azok a fajták, melyeken az összes vizsgálatot sikeresen végrehajtottuk egyik vagy másik évben a következők voltak: 'Czigány alma', 'Dániel féle renet', 'Entz rozmaring', 'Kanadai renet', 'Nemes sóvári', 'Nyári fontos', 'Vajki alma', 'Liberty' és a diploid kontroll a 'Cordelia'. A 'Cserepánya', 'Csíkos óriás', 'Marosszéki piros' fajták csak az SSR markerezésben és a flow cytometriás vizsgálatokban szerepelnek, mivel elegendő virágot nem hoztak a többi vizsgálathoz. A Liberty ugyan nem történelmi fajta, vizsgálatára azért van mégis szükség, mivel több szerző is S allél alapján triploidnak tartja azonban SSR markerek szerint diploid.

Az eredményekből is kitűnik, hogy a pollen morfológia vizsgálata nem alkalmas a diploid és triploid fajták elkülönítésére, valamint a csíráztatás sem ad megfelelően biztonságos eredményt. A keresztezés eredményeiből konzekvens megállapítást nem tudtunk levonni hisz a két év eredményei igen eltérőek voltak vélhetően a második évben tapasztalt fagy miatt. Azonban az SSR és a flow cytometria vizsgálatok megbízható eredményt adnak.

Bár a legtöbb eredményünk biztos kijelentéséhez további vizsgálatok szükségesek, de vélhetően a 'Kanadai renet', 'Nemes sóvári' és a többi vizsgált történelmi fajta triploid, kivéve a 'Vajki alma', 'Cserepánya', 'Csíkos óriás halasi', melyek valószínűleg tetraploidok. A 'Liberty' fajta ploiditás szintjének biztos megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Tóth Magdolna Tanszékvezető asszonynak a lehetőséget, hogy ebben a témában dolgozhattam, és hogy a fajtagyűjteményben végezhettem el megfigyeléseimet és vizsgálataimat. Továbbá köszönettel tartozom a soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság igazgatójának Dr. Nádosy Ferencnek, valamint a gyümölcs ágazat minden dolgozójának, hogy segítségemre voltak kísérletem során.

Köszönettel tartozom még Dr. Pedryc Andrzejnek, amiért engedélyezte a minták Genetika és növénynemesítés tanszéken előkészítését és Forgács Istvánnak, hogy segítségemre volt a minták előkészítése során. Szeretnék köszönetet mondani Erős-Honti Zsoltnak a Növénytan tanszék munkatársának, aki a morfológiai minták fényképezésével volt segítségemre. Valamint köszönöm Fehér Nóra és Kotogány Edit Flow cytometria-i mérések folyamán tanúsított segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni konzulenseimnek, Király Ildikónak és Dr. Békefi Zsuzsannának a közreműködését és rengeteg segítségét és támogatását, amit dolgozatom írása során nyújtott.

A kutatómunkát a TÁMOP 4.2.1./B-09/01/KMR/2010-0005, TÁMOP 4.2.2B-10/1-2010-0023, VM Állami Génmegőrzési Feladatok É-45343 programok támogatták.

8. Irodalomjegyzék

1. Arumuganathan, K. and Earle, E.D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. In: Plant Mol. Biol. 9. p.229-241
2. Balikó E. 2000. Történelmi almafajták felkutatása Kárpátalján. Diplomadolgozat
3. Bellani, L. M., Rinallo, C., Muccifora, S., Gori, P. 1997. Effects of stimulated acid rain on pollen physiology and ultrastructure in the apple. In: Biology, 24. p: 397-400.
4. Blasse W. 1976. Blüten und Früchten beim Obst. Berlin p: 44-58.
5. Blazek J., Blazkova J., Drobkova R., Kloutvor J., Kucera J. 1977. Results of investigation on the state of pollination in commercial apple orchards. *Sborník ÚVTIZ, Zahradnictví*. 7. p: 259-268.
6. Bodor P. 2009. Varasodásrezisztens almafajták és több betegséggel szemben ellenálló magyar fajtajelöltek virágzásfenológiai és termékenyülésbiológiai sajátosságai. Budapesti Corvinus Egyetem. Doktori értekezés.
7. Bretting, P.K., Widrechner, M.P. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm.
8. Brunel, D. 1994. A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. Plant Molecular
9. Bubán T. 1996. Flower development and formation of sexual organs. In: Nyéki J. and Soltész M.(eds): Floral biology of temperate zone fruit trees and small fruits. Akadémia kiadó. Budapest. pp. 3-54
10. Bubán T. 1997. Virágrügy képződés. In: Soltész M. Integrált gyümölcstermesztés. Mezőgazda kiadó. Budapest. p: 332-352
11. Bubán T., Faust M. 1982 Flower bud induction in apple trees: internal control and differentiation. In: Horticult. Rev. 4 p: 174-203
12. Childers, N. F. 1975. Modern Fruit Science. Somerville, New Jersey: Somerset. 976 p.
13. Cregan, P.B., Jarvik T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., VanToai, T.T., Lohnes, D., Chung, G.J., Specht, J.E. 1999. An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. In: Crop Science, 39: p. 1464-1490.
14. Davary-Nejad Nejad Gholam-Hassain. Almafajták virágzásbiológiája, termékenyülése és fajtatársítása. 1992. Budapest. Kandidátusi értekezés.
15. De Witte, K., Vercammen, J., Daele, G., Keulemans, J. 1996. Fruit set, seed set and fruit weight in apples as influenced by emasculation, self-pollination and cross-pollination. In: Acta Hort. 423. p. 177-184.
16. Devos, K.M., Chao, S., Li, Q.Y., Simonetti, M.C., Gale, M. D. 1994. Relationship between chromosome 9 of maize and wheat homoeologous group 7 chromosomes. In: Genetics, 138: p. 1287-1292.

17. Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda, J. 2007. Flow cytometry with plant cells
18. Dr. Nyéki J. 2002. Gyümölcsstermő növények virágzása és termékenyülése, ültetvények fajtatársítása. Egyetemi jegyzet. Debreceni egyetem agrártudományi centrum.
19. Dr. Nyéki J. 2002. Gyümölcsstermő növények virágzása és termékenyülése, ültetvények fajtatársítása. Debrecen. Egyetemi jegyzet
20. Dr. Pethő F. 1984. Alma. Budapest. Mezőgazdasági kiadó.
21. Dr. Sipos B. Z. 1994. Gyümölcsösgazdák könyve. Mezőgazda kiadó. Budapest.
22. Dr. Szalai I. 1974. Növényélettan II. Tankönyvkiadó. Budapest.
23. Dr. Tóth Magdolna. 2009 Gyümölcsfaj és fajtaismeret. Egyetemi jegyzet. Budapesti Corvinus egyetem. Kertészettudományi kar. Budapest
24. Dr. Tóth Magdolna. 2009. Térségi és az országos almatermesztés fejlesztésére alkalmas hazai nemesítésű fajtajelöltek és további értékes genotípusok vizsgálata. In:Tóth Magdolna.2009. Versenyképes gyümölcsvertikum.Budapest. Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar.
25. Evans, K. M., Patocchi, A., Rezzonico, F., Mathis, F., Durel, C. E., Fernández-Fernández, F., Boudichevskaja, A., Dunemann, F., Stankiewicz-Kosyl, M., Gianfranceschi, L., Komjanc, M., Lateur, M., Madduri, M., Noordijk, Y., van de Weg, W. E. 2011. Genotyping of pedigreed apple breeding material with a genome-covering set of SSRs: trueness-to-type of cultivars and their parentages. In: Mol Breeding 28. p. 535–547.
26. Fischer C. 2002. Blüh- und Befruchtungsverhalten beim Apfel. Erwerbsobstbau. 44 (14) p. 33-39.
27. G Tóth M. 2005 a. Régi magyar almafajták, mint a rezisztencianemesítés génforrásai és a környezettudatos külterjes gyümölcsök elemei. In: Kertgazdaság különszám. A fajtaválaszték fejlesztése a kertészetben 23-31.
28. G Tóth M. 2005 c. A Kárpát-medence régi almafajtáinak felderítése és megmentése. In: Kertgazdaság 37. (2) p. 24-29.
29. Galbraith, D. W., Harkins, K. R., MAddox, J. M., Ayres, N. M., Shamra, D. P., Firoozabady, E. 1983. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell-Cycle in Intact Plant-Tissues. In: Science 220. p. 1049-1051.
30. Galli Zs., Halász G., Kiss E., Heszky L. and Dobránszki J. 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. In: HortScience 40 (7) p. 1974-1977
31. Gasi F., Simon S., Pojskic N., Kurtovic M. and Pejic I. 2010. Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. In: Sci. Hortic. 126. p. 164-171

32. Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. In: *Theor Appl Genet.* 96. p. 1069-1076.
33. Grausland J. 1996. Flowering dates of pome and stone fruit cultivars – 10 years results. In: *Acta Hort.* 423 p. 31-37. p.
34. Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., Lain, O., Cipriani, G., Testolin, R. 2006. Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple as revealed by SSR-based fingerprinting. In: *Hort. Sci. Biotechnology.* 81. p.39-44
35. Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J.M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., Forster, R. 1997. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 94. p. 249-254
36. Hajósné Novák, M. 1999. Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Budapest. Mezőgazda Kiadó.
37. Halász J., Hegedűs A., György Zs., Pállinger É., Tóth M. 2011. S-genotyping of old apple cultivars from the Carpathian basin: methodological, breeding and evolutionary aspects. In: *Tree Genetics and Genomes.* 7. p. 1135–1145.
38. Haraszty A. 1979. Növényszerevezettan és növényélettan. Budapest. Tankönyvkiadó
39. Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F., McFerson, J.R. (1998): Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity, and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. In: *Theoretical and Applied Genetics.* 97. p. 671–683.
40. Holler, Christian. 2007. Régi gyümölcsfajták és hagyományos gyümölcsök: A táj, a természet, és az ember kincsei. In: *Kertgazdaság* 39 (3). p. 76-80.
41. Howlet F. S. 1926 Some factors of importance in fruit setting studies with apple varieties. *Amer. Soc. Hort. Sci, Proc.* 59. p. 307-315
42. Hugard J. 1978. Origine du pollen et variétés pollinisatrices. In: *Fruit Belge.* 46 (381) p. 11-32.
43. Jacob, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Yi-Pei, Ganten, D., Dzau, V. J., Lander, E.S. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. In: *Cell.* 67.p. 213-224.
44. Janick, J.J., Cummins, J. N., Brown, S. K., Hemma, t M. 1996. Apples. 1-77. p. In: Janick J.J., Moore J. N. (Szerk.) *Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits.* Hoboken, New Jersey: Wiley. 632 p
45. Kenji Sakurai. Susan K. Brown. Norman Weeden. 2000. Self-incompatibility Allels of Apple Cultivars and advanced Selection. in *HortScience.* 35. 2000

46. Király I., Nagyistván O., Szabóné Erdélyi É., Tóth M. 2012. Identification of synonyms among old Hungarian apple cultivars using morphological and molecular markers. *Acta Horticulturae*
47. Király I., Pedryc A. P., Halász A., Deák T., Tóth M. 2009. Parent identification of hungarian apple cultivars using SSR markers. In: *Acta Hort.* 839. p. 471-477
48. Király I., Tóth M. (2009): Kárpát-medencei régi almafajták génbanki megőrzése és vizsgálata. *Fiatal Kutatók az élhető földért.* Budapest: Szaktudás. 31. p.
49. Király, Redeczki, Erdélyi, Tóth. 2012. *Not.Bot. Hort. cikk*
50. Kiss E. (2005): XI. Molekuláris növénynevelés. 194-210. p. In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (Szerk.): *Mezőgazdasági Biotechnológia.* Agroinform Kiadó, Budapest, p. 368
51. Kiss GY. B., Endre G. (1999): Molekularis markerek alkalmazása a növénygenetikában. 37-91. In: BALAZS, E.; DUDITS, D. (szerk.): *Molekularis növénybiológia. Szemelvények.* Akadémiai Kiadó. Budapest. p. 706.
52. Kitahara. K., Matsumoto. S., Yamamoto. T., Soejima. J., Kimura. T., Komatsu. H., Abe. K. 2005. Parent identification of eight apple cultivars by S-RNase analysis and simple sequence repeat markers. In: *HortScience*, 40. p. 314-317.
53. Kobel F. 1954. *Lehrbuch des obstbaus auf pshyologischer grundlage.* Springer. Berlin.
54. Krapf 1975 Triploide apfelsorten sind schlechte pollen-spender. *Schweiz. z. Obst. Winb.* 10 p. 243
55. L. Garkava-Gustavson., A. Kolodinska Brantestam. J. Sehic and H. Nybom. 2008. Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR-allele analysis. In: *Hereditas* 00: 1-14. 2008
56. Lalatta F. 1982. Fertilità e produttività nel melo. In: *Biologia della riproduzione.* 110. p. 487-493.
57. Larsen and Tung S. M. 1950. Growth-promoting and growth-retarding substances in pollen from diploid and triploid apple varieties. In: *Bot. Gaz.* 111. p. 436-477
58. Laurens, F., Durel, C.E., Lascostes, M. 2004. Molecular characterization of French local apple cultivars using SSRs. In: *Acta Horticulturae.* 663. p. 639-642.
59. Lewis D., Modlibowska, I. (1942): Genetical studies in pear IV. Pollen tube growth and incompatibility. *J. Genet.*, 43 p. 211-222.
60. Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C. D., Tarchini, R., Van De Weg, E. and Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: *Molecular Breeding* 10. p. 217-241.

61. Litt M., Luty J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. In: *Amer. J. Human. Genet.* 44. (3) p. 397–401.
62. Maas J. L. 1977. Pollen ultrastructure of strawberry and other small-fruit crops. In: *Hort science* 102. p. 560-571
63. Maliga Pál. 1956 A gyümölcsfák termékenyülési viszonyai. In: Okályi-Maliga, Gyümölcstermelés 2. Budapest. Mezőgazda kiadó p. 105-133.
64. Marks, G. E. 1954. An acetocarmine-glycerol jelly for use in pollen fertility counts. In: *Stain Technol.* 29. p. 277.
65. Martens, J. and Fretz. 1980. Identification of eight crab-apples by pollen surface sculpture. In: *Hort Science.* 105. p. 257-263.
66. Marucci, M. S., Sansavini, S., Ciampolini, F., Cresti, M. 1984. Distinguishing apple clones and cultivars by surface morphology and pollen physiology. In: *HortScience.* 109. p. 10-13.
67. Milutinovic, M., Surlan-Momirovic, G., Nikolic, D. 1996. Relationship between pollinizer distance and fruit set in apple. In: *Acta Hort.* 423. p. 91-94.
68. Moriya, S., Iwanami, H., Okada, K., Yamamoto, T. and Abe, K. 2011. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. In: *Euphytica.* 177. p. 135-150.
69. Muraközy T., Dr. Okályi I., Tímár Zs. 1963. Kertészeti kislexikon. Budapest. Mezőgazdasági kiadó.
70. Nagy-Tóth F. 1998. Régi erdélyi almák. Erdélyi Múzeum-Egyesület. Kolozsvár.
71. Nyéki J. 1970. Körtefajták termékenyülési viszonyainak elemzése. Egyetemi doktori értekezés. Kertészeti egyetem Budapest.
72. Nyéki J. 1980. Termékenyülés és gyümölcskötődés. In: Nyéki J. (Szerk.) Gyümölcsfajták virágzásbiológiája és termékenyülése. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. p. 47-74
73. Nyéki J. 2008. Chromosome number and sterility in the fruit species. In: Nyéki J., Soltész M., Szabó Z. (szerk.) Morphology, biology and fertility of flowers in temperate zone fruits. Budapest: Akadémiai Kiadó. p. 159-194
74. Nyéki J. és Soltész M. 1996. Floral biology of temperate zone fruit trees and small fruits. Akadémiai kiadó, Budapest
75. Orosz-Kovács Zs. 2001. Az alma virágbiológiája. Pécs. G&G Kft. nyomdája.
76. Papp J. 2003. Gyümölcstermesztési alapismeretek. Budapest. Mezőgazda kiadó.
77. Pedryc A., Ruthner Sz., Bisztray Gy. (2002): The use of SSR markers in family Rosaceae. In: *International Journal of Horticultural Science*, 8 (2) p. 29-32.

78. Porpácz Aladár. 1964. A korszerű gyümölcsstermelés elméleti alapjai, Budapest. Mezőgazdasági kiadó.
79. Potts, S. M., Han, Y., Khan, M. A., Kushad, M. M., Rayburn, A. L., Korban, S. S. 2011. Genetic Diversity and Characterization of a Core Collection of Malus Germplasm Using Simple Sequence Repeats (SSRs). In: Plant Mol Biol Rep. p. 1-11.
80. Reim, S., Flachowsky, H., Hanke, M.-V. and Peil, A. 2008. Verifying the parents of the Pillnitzer apple cultivars. In: Acta Hort. 814. p. 319-324.
81. Rüniger W. 1977. Virágképződés és virágfejlődés. Mezőgazdasági kiadó
82. Seilheimer és Stösser. 1982. Gartenbauwiss. 47. p. 49-55
83. Senior, M.L., Chin, E.C.L., Lee, M., Smith, J.S.C., Stuber, C.W. (1996): Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENBANK database: Map construction. In: Crop Science, 36. p. 1676-1683.
84. Silbereisen R. 1970. Proc. Angers fruit breeding symposium. Versailles. In: Station de Recherches fruitiers. Angers. p. 79-77
85. Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C.L., Van de Weg, W.E., Van Kaauwen, M.P.W., Walser, M., Kodde, L.P., Soligo, V., Gianfranceschi, L., Durel, C.E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C., Patocchi, A. 2006: Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. In: Tree Genetics & Genomes, 2 (4). p. 202-224.
86. Soltész M. 1982: Almaültetvények fajtatársítása. Kandidátusi értekezés. MTA, Budapest.
87. Stösser, R., Hartmann, W., Anvari, S. F. (1996): General aspects of pollination and fertilization of pome and stone fruit. In: Acta Hort. 423. p. 15-22.
88. Szani Zs. 2007. Alma tájfajták táji tagozódása Magyarországon. In: Kertgazdaság 2007. 39. (2). p. 21-26.
89. Szász G., Tőkei L. 1997 Meteorológia mezőgazdászoknak, kertészeknek, erdészeknek. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
90. Teskey, B. J. E. and Shoemaker, J. S. 1972. Free Fruit Production. The Avi Publishing Company. Westport. Connecticut.
91. Tóth M. 2005 b. Exploring and preserving old apple cultivars of the Carpathian basin. In: International Journal of Horticultural Science. 11. évf. 3. sz.: p. 9-13
92. W. Broothaerts and I. Van Nerum. 2003. Apple Self-incompatibility Genotypes: An Overview. In: Genetics and breeding of Tree Fruits and Nuts. XXVI.
93. Wertheim S. J. (1996): Methods for cross pollination and flowering assessment and their interpretation. In: Acta Hort. 423 p. 237-242.
94. Wichmann B., Galli Z., Molnár S., Galbács Z., Kiss E., Szabó T., Heszky L. 2007. Molecular identification of old hungarian apple varieties. In: Hort. Science 13. p. 37-43.

95. Wilcox W. F. 1962. Flower biology and seed formation. In: Kappert H. and Rudolf W. Handbuch der pflanzenzüchtung, 2nd Ed Parey, Berlin p. 637-645
96. Williams R. R. (1966): Pollination studies in fruit trees: III. The effective pollination period for some apple and pear varieties. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta. For 1965*. p. 112-115
97. Wim Broothaerts. 2004. Update on and Review of the incompatibility (S-) Genotypes of Apple Cultivars. In: Hortscience 39. 943-947. 2004

9. Mellékletek

I/a. számú melléklet: Molekuláris markerezés eredménye

Fajta	CH01f02			CH01h01			CH02c02a			CH02c09		
MR-12	180	208		112	118		165	179		231	241	
Jonathán M 41	208	208		114	130		173	177		251	259	
Czigány alma	170	180	188	112	116		129	157		231	239	
Dániel féle renet	170	180	188	112	116		129	157		231	239	
Entz Rozmaring	170	184		112	112		171	185	191	243	247	253
Kanadai renet	184	206		104	126	130	167	177	181	231	247	253
Nemes Sóvári	180	184	206	116	116		141	149	179	231	243	255
Nyári fontos	184	188		112	130		129	179		231	243	255
Vajki alma	170	180	206	114	130		141	157	183	231	249	
Liberty	180	206		114	120		173	173		229	237	
Cserepánya	180	184	206	116	118	120	141	149	179	231	243	255
Csíkos óriás halasi	170	180	206	114	130		141	157	183	231	249	
Marosszéki piros	180	182		112	122		179	179		243	251	

I/b. számú melléklet: Molekuláris markerezés eredménye

Fajta	CH05e03			CH04e03			CH05d11			CH03g07		
MR-12	166	178		185	197		169	171		126	166	
Jonathán M 41	162	184		187	197		173	175		116	120	
Czigány alma	162	172		197	205		175	187		120	126	170
Dániel féle renet	162	172		197	205		175	187		120	126	170
Entz Rozmaring	162	172	190	193	197	203	187	195	205	116	124	126
Kanadai renet	164	178	198	187	197	201	171	175		116	124	152
Nemes Sóvári	158	162	190	197	205		171	173	177	116	120	
Nyári fontos	160	172		197	223		171	181	187	116	126	
Vajki alma	162	172		199	203		171	175		122	126	170
Liberty	Nem értékelhető (valószínűleg null allél)			179	199		173	2011		120	126	
Cserepánya	158	162	190	197	205		171	173	177	116	120	
Csíkos óriás halasi	162	172		199	203		171	175		122	126	170
Marosszéki piros	162	190		193	205		175	195		122	166	

I/c számú melléklet: Molekuláris markerezés eredménye

Fajta	CH02c11			CH02d08			CH03a02			CH05c04		
MR-12	228	232		209	255		133	179		185	199	
Jonathán M 41	228	234		231	257		119	133		185	185	
Czigány alma	216	220		211	217	255	135	145		179	207	
Dániel féle renet	220	216		211	217	255	135	135		179	207	
Entz Rozmaring	222	232		211	217	247	135	145		185	207	
Kanadai renet	218	228	230	213	225	229	121	137		185	185	
Nemes Sóvári	206	218	234	211	213	247	135	145		185	199	207
Nyári fontos	218	220	234	211	225		135	145		179	257	
Vajki alma	206	218	226	225	255		119	133		185	203	
Liberty	224	236		211	255		119	133	149	185	207	
Cserepánya	206	218	236	211	211		137	145	157	185	199	207
Csíkos óriás halasi	206	218	226	225	255		119	133		185	203	
Marosszéki piros	216	216		255	255		181	181		199	209	

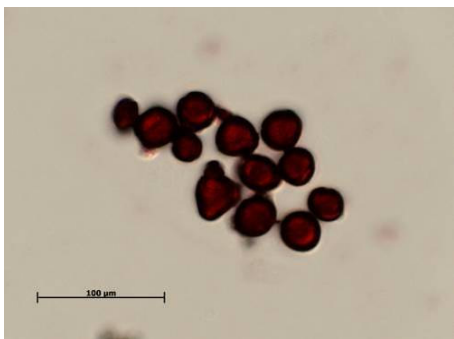
I/d számú melléklet: Molekuláris markerezés eredménye

Fajta	CH01f03b			CH01h10			CH04c07			CH04e05		
MR-12	137	159		97	97		107	107		174	210	
Jonathán M 41	171	171		89	97		109	111		174	202	
Czigány alma	137	171		89	97		109	119	133	174	182	210
Dániel féle renet	157	171		89	97		109	119	133	174	182	210
Entz Rozmaring	169	171		89	101		95	105	109	174	182	210
Kanadai renet	137	171	179	89	97		105	111		174	210	
Nemes Sóvári	137	159		89	97		107	119	133	202	210	222
Nyári fontos	137	159	171	89	109		105	109	133	174	174	
Vajki alma	137	171		89	103		105	109		174	202	210
Liberty	171	179		89	111		105	107		Nem értékelhető (valószínűleg null allél)		

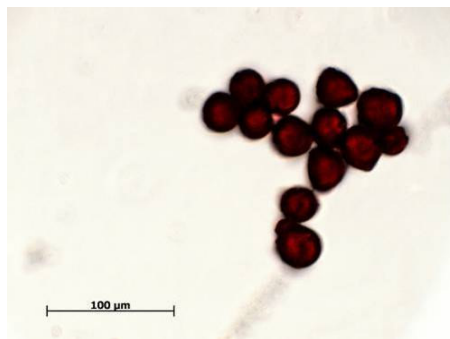
I/e számú melléklet: Molekuláris markerezés eredménye

Fajta	GD12			GD147			Hi02c07			CH04e05		
MR-12	149	183		132	152		106	114		174	210	
Jonathán M 41	149	149		132	150		106	112	148	174	202	
Czigány alma	149	151	183	132	152		106	110	148	174	182	210
Dániel féle renet	149	151	183	132	152		106	110	148	174	182	210
Entz Rozmaring	151	153		132	134	152	106	112		174	182	210
Kanadai renet	139	149	183	138	138		112	114		174	210	
Nemes Sóvári	149	151	155	138	140	152	110	114		202	210	222
Nyári fontos	139	151	183	140	152		106	110		174	174	
Vajki alma	149	151		138	148	150	106	112		174	202	210
Liberty	149	151		132	150		106	114	118	Nem értékelhető		

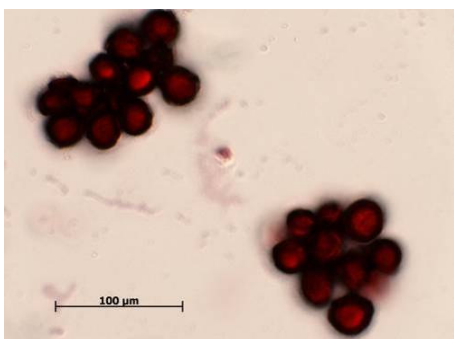
II/a. 'Dániel féle renet' pollen morfológia:



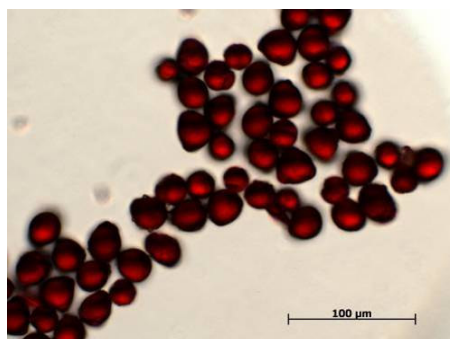
II/b. 'Entz rozmaring' pollenmorfológiája:



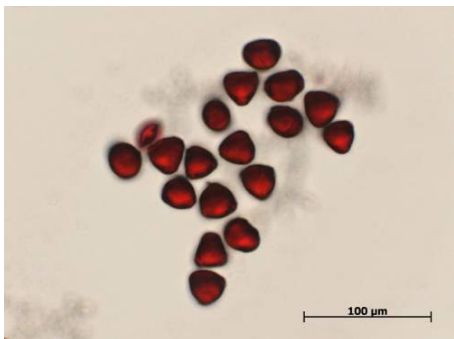
II/c. 'Kanadai' renet pollenmorfológiája:



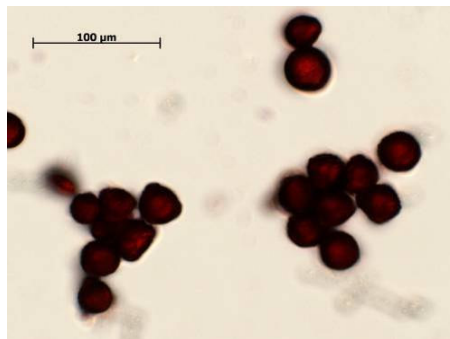
II/d. 'Liberty' pollenmorfológiája:



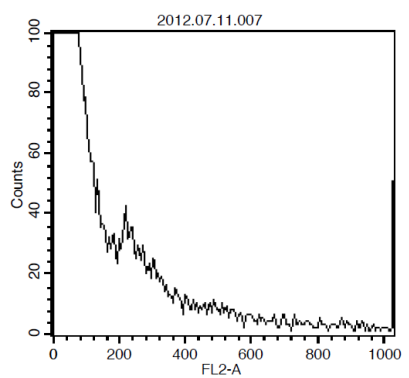
II/e. 'Nemes sóvári' pollenmorfológiája:



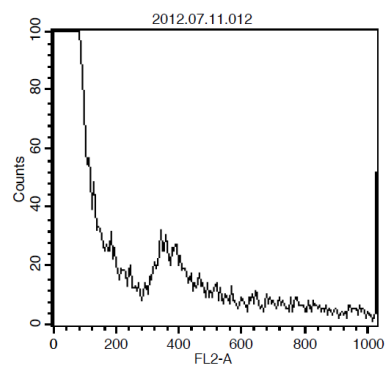
II/f. 'Vajki alma' pollenmorfológiája:



III/a 'Marosszéki piros' flow cytometria



III/b 'Cserepánya' flow cytometria



III/c 'Csíkos óriás' flow cytometria

