

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



OTDK dolgozat

A hexaploid szilva termékenyülési viszonyait meghatározó lókus variabilitása

Kurilla Anita

Mezőgazdasági biotechnológus MSc, II. évfolyam

Konzulensek: Dr. Hegedűs Attila, DSc, egyetemi tanár
Dr. Halász Júlia, PhD, egyetemi docens

Budapest, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	4
2.	CÉLKITŰZÉS.....	5
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
3.1.	Önmeddőség a növények világában	6
3.2.	Az önmeddőség genetikai háttere	6
3.2.1.	Az S-allél-rendszer bibekomponense: az S-RN-áz enzim	8
3.2.2.	Az S-allél-rendszer pollenkomponense: az F-box fehérje.....	9
3.2.3.	A gametofitikus inkompatibilitás poliploid fajoknál	10
3.2.3.1	<i>Prunus salicina</i> Lindl. - japánszilva.....	12
3.2.3.2.	<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh. - cseresznyeszilva	13
3.2.3.3.	<i>Prunus spinosa</i> L. - a kökény.....	13
3.2.3.4.	<i>Prunus domestica</i> L. – hexaploid szilva.....	13
3.3.	A szilvafélék jellemzése	14
3.3.1.	Az európai szilva (<i>Prunus domestica</i>) származása	14
3.3.2.	A szilva termesztése, jelentősége	16
3.4.	Az európai szilva (<i>Prunus domestica</i>) S-allél-rendszere.....	16
4.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	18
4.1.	Vizsgált növényanyag	18
4.2.	DNS-alapú vizsgálatok.....	19
4.2.1.	DNS-kivonás	19
4.2.2.	Az S-RN-áz gén PCR-analízise	20
4.3.	PCR-termékek klónozása	21
4.3.1.	Ligálás	21
4.3.2.	Transzformálás	21
4.3.3.	Szélesztés	21
4.4.4.	Kék-fehér szelekció, kolónia PCR	21
4.4.5.	Plazmid DNS izolálás, szekvenálás, szekvenciaelemzés	21
5.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	23
5.1.	Az S-RN-áz gén 1. intronrégiójának vizsgálata.....	23
5.2.	Az S-RN-áz gén 2. intronrégiójának analízise.....	27
5.3.	Az európai szilva S-RN-áz allélszekvenciáinak elemzése.....	31
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	40

7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	41
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	48

1. BEVEZETÉS

A csonthéjas gyümölcsfák termésbiztonsága genetikailag meghatározott mechanizmusoktól és a környezeti tényezőktől függ. Az egyik legfőbb befolyásoló faktor a termékenyülési képesség, illetve a csonthéjas gyümölcsfajok túlnyomó többségére jellemző önmeddőség. Az eddig ismert legtöbb információ a diploid fajokra korlátozódik (pl. őszibarack, mandula, cseresznye), míg hazánkban gazdasági szempontból a csonthéjas gyümölcsfajok közül a tetraploid meggy és a hexaploid európai szilva tekinthető kiemelkedő jelentőségűnek. Jól ismert, hogy mindkét poliploid fajnak számos önmeddő és öntermékenyülő fajtáját termesztik.

A meggy termékenyülését irányító molekuláris háttér megismerését célzó vizsgálatok 2001-ben indultak el japán és amerikai kutatók részvételével, és öt év elteltével sikerült tisztázni a jelenség genetikai alapjait és a legfontosabb termesztett fajták önmeddő/öntermékenyülő fenotípusát kialakító, úgynevezett *S*-genotípusát. Ezzel szemben azonban mind a mai napig csak alig néhány európai szilvafajta *S*-genotípusát sikerült meghatározni. Tekintve, hogy Magyarországon a szilvát széles körben szaporították hosszabb időn át ivaros úton, jelentős, genetikailag változatos növényanyag alakult ki, ami jó lehetőségeket kínál az önmeddő/öntermékenyülő fenotípust meghatározó lókuszt variabilitásának vizsgálata terén.

Az ilyen vizsgálatok a termékenyülési fenotípus megismerésén, vagyis e gazdaságilag fontos tulajdonság molekuláris hátterének tisztázásán kívül a fajok kultúrevolúciós kapcsolatairól is számos információval gazdagíthatja a gyümölcsfajokra vonatkozó biológiai ismereteinket, hiszen az eredmények akár a *Prunus domestica* régóta vitatott eredetének tisztázásában is segíthetnek.

2. CÉLKITŰZÉS

Vizsgálatunk az alábbi fő kérdések köré szerveződött:

- hány S-allél azonosítható a hexaploid szilvafajtákban?
- találhatók-e korábban nem azonosított, új S-ribonukleáz allélok?
- találunk-e átfedést a szilva és a feltételezett szülőfajok S-alléljai között?
- a szilva S-allélok adnak-e információt az önmeddőséget kialakító lókuszt evolúciójára vonatkozóan?
- kimutathatók-e olyan mutációk az *S-RN-áz* allélok vizsgált szakaszán, amely kapcsolatba hozható az öntermékenyüléssel?

Ha vizsgálataink sikerrel végződnek, értékes információt nyerhetünk egy rendkívül komplex genommal rendelkező kultúrnövényről, melynek ploidszintje a búzához hasonló (hexaploid), ugyanakkor a szilva kromoszómaszáma nagyobb ($2n = 6x = 48$), mint a búzáé ($2n = 6x = 42$), és a búzával ellentétben a poliploid genom komponensei, azok eredete sem ismert. Ez nyilvánvaló nehézséget jelent, ugyanakkor nagyban növeli az elérhető eredmények újdonságértékét.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Önmeddőség a növények világában

A növények különböző mechanizmusokkal képesek megakadályozni az öntermékenyülést, ezzel biztosítva a genetikai változatosság fenntartását (Halász, 2007). A gametofitikus inkompatibilitás az idegentermékenyülést támogató és az öntermékenyítést gátló mechanizmus (Weinbaum, 1985), melynek fő célja a genetikai variabilitás fenntartása (Felipe és R. Socias i Company, 1992). A növények számára ez egy igen hasznos szelekciós előnyt jelent, termesztési és gazdasági szempontból azonban az önmeddőség hátrányos tulajdonságnak tekinthető (Halász, 2007).

A gyümölcstermő növények egyik legfontosabb termesztés-technológiai tulajdonsága az öntermékenyülési képesség. Önmeddő fajták termesztése esetén elengedhetetlen, hogy az ültetvénybe a szükséges megporzást biztosító egyedeket telepítsünk, melyek nélkül a gazdaságilag megfelelő mértékű gyümölcskötődés nem érhető el. Öntermékenyülő gyümölcsfák használatával megtakarítható a pollent adó egyedek előállítása-fenntartása során jelentkező valamennyi költség, egyszerűsödik számos munkafolyamat az ültetvényben, így azonos méretű termőterületen nagyobb és egyöntetű termésmennyiség érhető el. A genetikai leromlás nem nyilvánul meg a további generációkban, hiszen a szilvafajtákat nem magvetéssel szaporítják.

3.2. Az önmeddőség genetikai háttere

A gametofitikus inkompatibilitás (GSI) több növény család fajaira jellemző mint a genetikai változékonyságot fenntartó molekuláris rendszer. Az önmeddőség (SI – self-incompatibility) mechanizmusa két csoportra osztható a növényvilágban: gametofitikus inkompatibilitás (GSI) és sporofitikus inkompatibilitás (SSI). Mindkettő a „saját” vagy inkompatibilis (genetikailag megegyező) pollen elutasításán alapuló mechanizmus (Sankaranarayanan és mts., 2013). Sporofitikus inkompatibilitási rendszer alakult ki a *Brassicaceae*, *Asteraceae* és *Convolvulaceae* családokban. A gyümölcsfajok közül a mogyoróra (*Corylus avellana*) jellemző, de ennek molekuláris háttere még nem ismert. A napjainkig legtűzetesebben a *Brassicaceae* családra jellemző SSI rendszert vizsgálták, amelyben egy, a bibében kifejeződő *S-receptor-kináz* (*SRK*) gén játszik központi szerepet a saját pollen felismerésében és elutasításában (Takayama és Isogai, 2005; Allen és mts., 2011).

A gametofitikus inkompatibilitás feltehetően a legszélesebb körben elterjedt mechanizmus az önmeddőséget (SI) kialakító rendszerek között, melyben két csoportot különítenek el: az egyik az *S*-ribonukleáz (*S*-RN-áz) alapú rendszer, mely többek között a *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae*, *Plantaginaceae* és *Campanulaceae* családokban van jelen (Liu és mts., 2014; Sassa és Hirano, 2006). A másik egy komplex, a *Papaveraceae* családban működő rendszer, mely egy jelátviteli kaszkád elindításával az inkompatibilis pollentömlők esetén azonnali növekedésgátlást és programozott sejthalált okoz (Franklin-Tong és Franklin, 2003; Minamikawa és mts., 2014). Az önmeddő fenotípust egyetlen lókuszt, az ún. *S*-lókuszt alakítja ki. A multiallélikus lókuszt egyrészt egy ribonukleáz enzimet (*S*-RN-áz) (McClure és mts., 1990), másrészt egy *S*-haplotípusra specifikus F-box fehérjét kódol (Lai és mts., 2002). Előbbi a bibe, utóbbi a pollen fenotípusának meghatározásáért felelős. A mechanizmus alapja e két fehérjetermék között lejátszódó folyamat. A két fehérjét kódoló gének közötti távolság kevesebb, mint 70 kb, ami a rekombináció valószínűségét minimálisra csökkenti (Ushijima és mts., 2001; Charlesworth, 2010). Diploid növények esetében a pollen fenotípusát haploid genotípusa határozza meg. Ha a pollenszem *S*-allélja megegyezik a bibe két *S*-alléljának bármelyikével, gátolt lesz a pollentömlő fejlődése, és a termékenyülés nem jön létre. Abban az esetben, ha a két gén bármelyikében bekövetkezik egy mutáció, melynek következtében a fehérje hibásan szintetizálódik vagy a fehérjeszintézis egyáltalán nem lehetséges (pl. egy korai stop kodon kialakulása miatt), a termékenyülés még azonos allélok jelenléte esetén is létrejöhet és a mutációt hordozó egyed öntermékenyülő lesz. Ez a genetikai előrehaladás szempontjából hátrányos tulajdonság, viszont termesztés-technológiailag igen előnyös. A pollenszemek mindkét esetben kicsíráznak a bibe felületén, de csak a kompatibilis pollentömlő jut el az embriószakig. Az inkompatibilis pollentömlő fejlődése már a bibeszálban leáll, ennek következtében nagy mennyiségű kallóz halmozódik fel, ami mikroszkóp segítségével jól tanulmányozható (Halász és mts., 2007; Milatović és Nikolić, 2007).

Az *S*-lókuszt által kódolt gének a fejlődés során valószínűleg együtt alakultak ki, a két gén koevolúciója azonban egyelőre nem bizonyított. A *Rosaceae*, *Plantaginaceae* és *Solanaceae* családokba tartozó fajok körében elvégzett vizsgálatok alapján feltehetően a pollentömlőben kifejeződő SFB fehérjéket kódoló allélok később alakultak ki, mint a bibe *S*-ribonukleáz alléljai (Newbiggin és mts., 2008). A japánszilva egyike volt azon csonthéjas fajoknak, melyeknél az *S*-RN-áz génszekvenciáját meghatározták. A szekvenciák filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy a *Rosaceae* családban található *S*-RN-ázok az alcsaládokra történő szétválást követően, de a fajok kialakulását megelőzően jöttek létre (Yamane és mts., 1999).

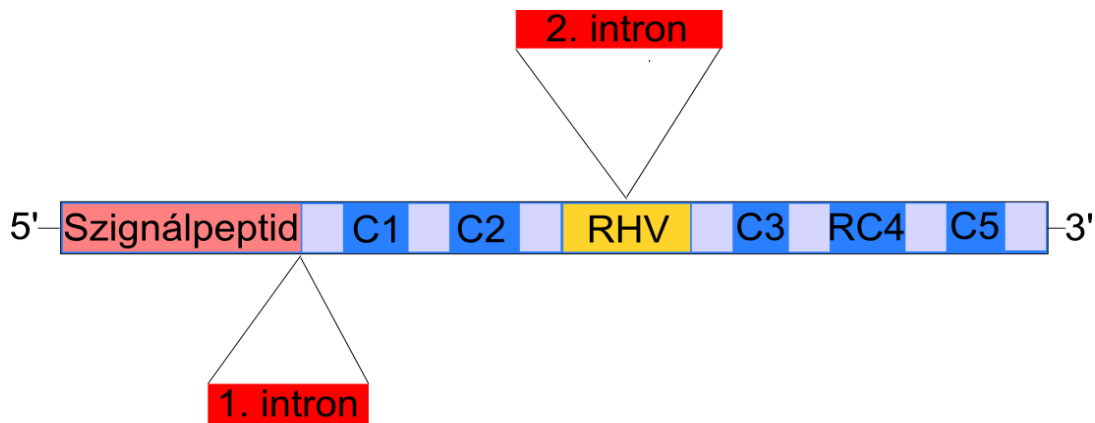
Az *S*-lókuszt kajszinál, mandulánál, őszibaracknál és cseresznyénél is a 6-os (Dirlewanger és mts., 2004), míg az *Asteraceae* családban a mezei katángnál a 2-es kapcsoltsági csoportba térképezték (Gonthier és mts., 2013). Az őszibarack genomszekvenciája igazolta, hogy a lókusz a 6-os kromoszóma szubtelomérikus régiójában található („Phytozome v9.1: Home” 2014). Almánál az *S*-lókusz a 17-es kromoszómán, azon belül szintén a szubtelomérikus régióban található (Minamikawa és mts., 2010).

3.2.1. Az *S*-allél-rendszer bibekomponense: az *S*-RN-áz enzim

Az *S*-RN-áz egy ribonukleáz aktivitású (RNS-t hasító) enzim és egyben glikoprotein, mely a bibesejtekben szintetizálódik, és ezt követően kiválasztódik a sejten kívüli térbe, pontosabban a bibeszál transzmissziós szövetébe (Cornish és mts., 1987). Ez a pollentömlő növekedésének helyszíne, a bibeszál sejtközi állománya, más néven stigmatoid szöve, ahol kialakul a gametofitikus inkompatibilitási kapcsolat (Anderson és mts., 1989). Az *S*-glikoproteinek igen nagy mennyiségben fordulnak elő az érett bibe transzmissziós szövetében, de mennyiségüket befolyásolhatja a bibe fejlődési állapota is. A *Nicotiana glauca* érett virágaiban az *S*-RN-ázok nagyobb expresszióját mérték, míg éretlen bibékben ezek expressziós szintje kisebb volt (Cornish és mts., 1987). A *Prunus salicina* *S*-RN-áz génjének transzkripció szintjét vizsgálva azt tapasztalták, hogy öntermékenyülő fajta esetében az *S*-RN-áz transzkripció szintje jóval csekélyebb volt, mint az önmeddő fajtánál. Ezzel szemben a pollen *SFB* génje mindkét esetben azonos transzkripció szintet mutatott (Watari és mts., 2007). Az *S*-ribonukleáz nélkülözhetetlen szerepet játszik a „saját” vagy inkompatibilis pollen felismerésében és elutasításában (Huang és mts., 1994). Glikoprotein természete ellenére nem a cukorrész vesz részt a felismerési folyamatban, hanem maga a fehérje (Karunanandaa és mts., 1994). Citotoxikus hatása van a pollenre, tehát a saját pollentömlőbe bejutva képes annak RNS molekuláit lebontani, míg az idegen pollentömlő növekedésére nincs hatással. Az rRNS molekulák degradálásával a fehérjeszintézist gátolja, ezt követően a pollentömlő növekedése leáll (McClure és mts., 1990; Liu és mts., 2009).

Az *S*-RN-áz gén egy szignálpeptidet, két intront és öt konzervatív régiót (C1, C2, C3, RC4 és C5) tartalmaz, melyek a *Rosaceae* családban azonosak. Az RC4 régió különbözik a *Solanaceae* C4 régiójától, a többi homológ a két családban. A szignálpeptid és a C1 régió között található az 1. intron, a C2 és C3 régió között található a 2. intron, mely a hipervariábilis régióba (HRV) ékelődik. A hipervariábilis régió hidrofíli aminosavakból áll, mely a globuláris fehérje felszínén elhelyezkedve szerepet játszik az allélspecifikus

felismerési reakcióban. A C1, RC4 és C5 régiók biztosítják a fehérje szerkezeti stabilitását, nagy arányban tartalmaznak hidrofób aminosavakat (Ushijima és mts., 1998). A két intron mérete allélspecifikusan változik, de a *Prunoideae* alcsaládban a 2. intron mérete általában meghaladja az 1. intron méretét (1. ábra).



1. ábra: A Rosaceae *S-RN-áz* génjének felépítése (Sonneveld és mts., 2003). C1-C5 és RC4: konzervált régiók, RHV: hipervariábilis régió.

3.2.2. Az *S*-allél-rendszer pollenkomponense: az *F*-box fehérje

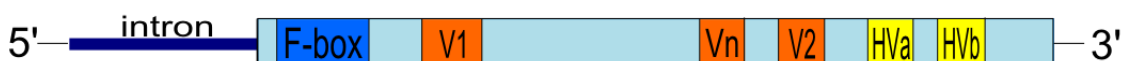
Elsőként japánkajszinál (*Prunus mume*) írták le az *F*-box gént (Entani és mts., 2003) mandulánál pedig elnevezték a gén által kódolt fehérjét SFB-nek (*S*-haplotípus-specifikus *F*-box fehérje) (Ushijima és mts., 2003).

Az *F*-box fehérje a portokban fejeződik ki, azon belül is a tapétum szövetében, a mikrospórákban, továbbá a pollenszemekben is megtalálható (Lai és mts., 2002). A *F*-boks fehérjék gyakran az E3 ubikvitin-ligáz enzimkomplex részei, így feltételezték, hogy a lókus által kódolt, a pollenben kifejeződő fehérje döntő szerepet játszik az *S*-RN-áz enzimek lebontásában. Az *F*-box fehérje a 26S proteaszóma rendszer részvételével a nem saját *S*-RN-áz molekulákat poliubikvitinálhatja, ami kiváltja ezek lebontását a proteaszóma rendszerben. Tehát az idegen fehérjék felismerésével támogatja az eltérő *S*-allélt hordozó pollentömlők fejlődését (Entani és mts., 2014; Ushijima és mts., 2004).

A magyar 'Alex' cseresznyefajta részletes vizsgálata azonban feltárta, hogy az idegen *S*-RN-áz enzimek lebontásában nem játszanak szerepet a pollen SFB fehérjei (Sonneveld és mts., 2005). Ezt a feladatot ugyanis a pollentömlőkben működő, az *S*-lókusszal semmilyen kapcsolatban nem álló, ún. általános fehérjelebontó rendszer végzi el. Inkompatibilis kapcsolatnál a pollen SFB fehérje és az azonos allél által kódolt *S*-RN-áz között stabil intermolekuláris kapcsolódás alakul ki, ami megvédi az *S*-RN-ázt az általános fehérjelebontó

rendszerből, így megtörténik a pollentömlő RNS-einek degradálódása, a megtermékenyítés elmarad. A lebontás sebességét értékelve azt tapasztalhatjuk, hogy a termékenyítést követő 18. órában az *S*-RN-ázok még megtalálhatóak a pollentömlőben mind kompatibilis, mind inkompatibilis megporzást követően. A 24. órában azonban már majdnem valamennyi *S*-RN-áz degradálódott a kompatibilis keresztezésnél (Boivin és mts., 2014).

Az *SFB* és az *S*-RN-áz gének gyakran fordított orientációban helyezkednek el, és az *SFB* gén egyetlen intront tartalmaz. Az eddig vizsgált kajszi haplotípusok *SFB* génjének orientációja megegyezik (Romero és mts., 2004), míg a vizsgált cseresznye, meggy, mandula és japánkajszi haplotípusok esetében ellentétes volt az *S*-RN-áz génnel (Yamane és mtsai. 2003; Koichiro Ushijima és mtsai. 2003; Entani és mtsai. 2003). A gén egy F-box motívumot, három variábilis régiót (V1, V2, Vn) és két hipervariábilis régiót (HVa, HVb) tartalmaz (2. ábra).



2. ábra: Az *S*-haplotípusra specifikus *F*-box gén szerkezeti elemei. V1, V2 és Vn: variábilis régiók, HVa és HVb: hipervariábilis régiók.

3.2.3. A gametofitikus inkompatibilitás poliploid fajoknál

A meggy (*Prunus cerasus* L.) allopoliploid növény, mely a csepleszmeggy és a cseresznye hibridjeként alakult ki (Stockinger és mts., 1996). A poliploid fajokra is az ismert inkompatibilitási rendszer működése érvényes, de a testi sejtek többszörös kromoszómaállománya miatt a pollenszemek sem lesznek haploidok. A pollenszemek több *S*-haplotípust tartalmaznak, melyek csak akkor lesznek képesek eljutni az embriózsákig, ha az allélok közül egyik sem egyezik meg a bibe egyetlen *S*-alléljával. Poliploid fajok közül eddig a meggy (*Prunus cerasus*) *S*-allél-rendszerét és működését vizsgálták részletesebben. Több *S*-allélt és *S*-haplotípust azonosítottak (Hauck és mts., 2002; Hauck és mts., 2006a; 2006b; Yamane, és mts., 2006; Tsukamoto és mts., 2006; Yamane és mts., 2003). A meggy tetraploid tulajdonságának köszönhetően eltér a diploid fajok *S*-allél-rendszerétől: a pollenszem diploid, míg a bibe négy *S*-alléllal rendelkezik. A sikeres öntermékenyüléshez legalább két funkcióképtelen *S*-haplotípusnak kell jelen lennie a pollenben (Hauck és mts., 2006b). Az eddig azonosított *S*-haplotípusok közül öt funkcióképes (*S*₁, *S*₄, *S*₆, *S*₉, *S*₂₆) volt, míg nyolc

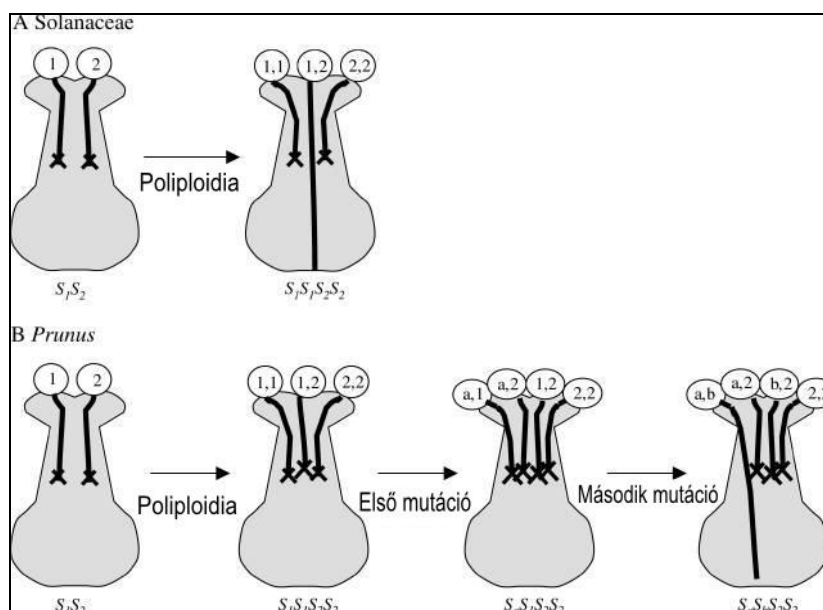
funkcióképtelennek (S_1' , S_{6m} , S_{6m2} , S_{13}' , S_{13m} , S_a , S_d illetve S_{null}) bizonyult (Hauck és mts., 2002; Hauck és mts., 2006a; 2006b; Tsukamoto és mts., 2006; Yamane és mts., 2003). A funkcióképtelen haplotípusok közül három a bibe oldaláról (S_{6m} , S_{6m2} és S_{13m}), kettő a pollen oldaláról (S_1' , S_{13}'), egy pedig mindkét oldalról (S_{null}) mutánsnak bizonyult. Ezeknél az alléloknál több deléció, inszerciót és szubsztitúciót azonosítottak.

Az S_{null} haplotípus funkcióképtelenségét feltételezhetően az S -lókusz egészét, vagy jelentős részét átfogó deléció okozza, mivel nem volt kimutatható sem a bibe, sem a pollen fenotípusát meghatározó gén jelenléte (Hauck és mts., 2006b). Az SFB gén funkcióvesztését az S_1' -allélnál egy 615 bp Ds elem okozza (Hauck és mts., 2006a), míg az S_{13}' -allél esetében 1 bázispár szubsztitúciója stop kodont eredményez (Tsukamoto és mts., 2006). Az S_{6m} -haplotípus egy 2,6 kb inszerciót tartalmaz az $S-RN-áz$ gén kódoló részében (Yamane és mts., 2003), míg az S_{6m2} - és S_{13m} -allélok esetében 1 illetve 23 bázispáros deléció okozott stop kodont (Tsukamoto és mts., 2006). A fentiek szerint az S -allélok funkcióvesztése leggyakrabban valamilyen inszerciós esemény következményeként alakult ki (Hauck és mts., 2006a; Halász és mts., 2014), ami arra utal, hogy a mozgó genetikai elemek jelentős evolúciós hajtóerőt képeznek, ami számos esetben vezetett az önmeddőség megszűnéséhez.

A meggy öntermékenyülése a funkcióképtelen S -haplotípusok genomon belüli felhalmozódása következtében alakult ki, ami alapvetően eltér a Solanaceae családba tartozó poliploid növényekre jellemző öntermékenyülés genetikai hátterétől (3. ábra). Ez utóbbi esetben minden olyan pollenszem, mely két különböző S -allélt hordoz, képes az öntermékenyítésre még akkor is, ha mindkét allél jelen van a bibeszövetekben is. A meggy esetében a heteroallélikus pollenszemek azonban nem képesek öntermékenyítésre, vagyis a pollentömlőben és a bibeszövetekben kifejeződő S -allélok működése változatlan. Az öntermékenyülés akkor alakulhat csak ki, ha a meggy négy S -haplotípusa közül legalább kettő elveszítette funkcióját valamilyen mutáció következtében. Amennyiben a pollentömlőben és a bibeszövetben kifejeződő két közös S -haplotípus egyike sem működőképes (akár a pollentömlőben, akár a bibében), nem alakul ki a specifikus felismerés az azonos alléltermékek között, így az öntermékenyülés lehetséges.

Érdekes jelenség, hogy a cseresznye hibridjeként kialakult meggy fajban található számos cseresznye S -allél, melyek funkcióvesztése cseresznye esetében mindezidáig nem volt kimutatható, meggy esetében azonban igazolódott. Ennek magyarázata a meggy tetraploid genomjában kereshető, a poliploid faj esetében ugyanis a bekövetkezett egyetlen mutáció nem változtatja meg a pollen fenotípusát (nem lesz képes öntermékenyítésre), hiszen a másik allél funkciója sértetlen. Ezért a sérült allélok szelekciós következmény nélkül felhalmozódhattak a

meggy populációkban, és az öntermékenyülés csak akkor alakult ki, ha olyan egyed jött létre, mely két működésképtelen S-alléllal rendelkezett (Hauck és mts., 2006; Tsukamoto és mts., 2006).



3. **ábra:** A gametofitikus inkompatibilitás működése a poliploid *Solanaceae* (A) és *Prunus* (B) fajoknál. A *Solanaceae* családban a heteroallélikus pollen következtében közvetlenül öntermékenyülővé válik az egyed. A *Prunus* fajoknál nem szűnik meg azonnal az önmeddőség, mert tetraploid fajoknál minimum két, funkcióképtelen S-haplotípusra van szükség az öntermékenyülés kialakulásához (Hauck és mts., 2006a). A működésképtelen allélokat betűvel (a, b) jelöltük.

3.2.3.1 *Prunus salicina* Lindl. - japánszilva

A japánszilva diploid faj, mely Kínából származik, de később Japánban termesztették jelentős mértékben. A XIX. század végén átkerült Észak-Amerikába, ahol nemesítési céllal keresztezték néhány amerikai szilvafajjal (Faust és Surányi, 1999). A termesztett japánszilva faj képviselői így tulajdonképpen interspecifikus hibridek, melyek pedigréjében a *Prunus salicina* kívül megtalálható a *P. americana*, *P. hortulana*, *P. munsoniana*, *P. simonii* és *P. cerasifera* is (Okie és Weinberger, 1996).

Elsőként a 'Sordum' fajta S-genotípusát határozták meg (S_aS_b) (Yamane és mts., 1999). Eddig összesen 19 S-RN-áz allél szekvenciáját jellemezték (S_a - S_s) (Beppu és mts., 2002; 2003; Guerra és mts., 2009). Több mint 100 fajta S-genotípusa ismert, melyeket 19 inkompatibilitási csoportba soroltak (Halász és mts., 2007; Guerra és mts., 2009). Öntermékenyülő fajták is ismertek, melyek többsége az S_e -allélt hordozza. Tudott, hogy a pollen *SFB* gén működése sérült, de az öntermékenyülés molekuláris háttere japánszilva esetében a mai napig nincs tisztázva.

3.2.3.2. *Prunus cerasifera* Ehrh. - cseresznyeszilva

A cseresznyeszilva többségében diploid, de tetraploid és hexaploid változatok is vannak. A cseresznyeszilva első öt *S-RN-áz* allélját Sutherland és mts. (2004b) írták le. Később, 25 cseresznyeszilva vizsgálatával az ismert allélok körét 15-re bővítették (Sutherland és mts., 2008; 2009). Meghatározták az *S-RN-áz* gén két intronjának, illetve az *SFB* gén intronjának méretét, az *S-RN-áz* allélok DNS szekvenciáját, és könnyebb azonosításuk érdekében allélspecifikus primereket terveztek (Sutherland és mts., 2009). Mikroszkópos pollentömlő-növekedési vizsgálat során 12 egyedből nyolc öntermékenyülők bizonyult, melyek között feltételezhetően homozigóta genotípusok is voltak (S_2S_2). Az S_2 -allél funkcióképtelen és funkcióképes változatát is megvizsgálták, de az öntermékenyülést okozó mutációt az *S-RN-áz* gén kódoló régiójában nem találták meg. A mutáció így feltehetően az *S-RN-áz* promoter régiójában, vagy az *SFB* génen belül illetve annak közelében következhetett be.

3.2.3.3. *Prunus spinosa* L. - a kökény

A kökény allotetraploid, $2n = 4x = 32$, önmeddő faj (Nunes és mts., 2006). Ploidszintjével kapcsolatban jelentős variációról számoltak be: $2n = 16, 24, 32, 40, 43, 44, 48, 53, 56, 59, 64$ (Baiaşvili, 1980). A Kaukázus-hegységben talált kökényegyedeknél szintén eltérő kromoszómaszámokat azonosítottak: $2n = 16, 32, 48, 64$ és 96 (Zohary, 1992). Nunes és mts. (2006) huszonegy *SFB*-allél DNS-szekvenciáját határozták meg, melyek közül hét esetben a teljes haplotípust (*SFB* + *S-RN-áz* gén) szekvenálását is elvégezték.

3.2.3.4. *Prunus domestica* L. – hexaploid szilva

A *P. domestica* hexaploid ($2n = 6x = 48$), hatszoros kromoszómaállománnyal rendelkező faj. Hozzávetőleg az ismert fajták fele önmeddő, másik fele öntermékenyülő. Eddig három *S*-allélját azonosították, melyeket S_5 -, S_6 -, S_9 -allélokként jelöltek (Sutherland és mts., 2008). Az S_5 -*RN-áz* génjének 2-3. exonja és *SFB* génje került azonosításra, a többi *S*-ribonukleáz allél 1-3. exonját és *SFB* génjét publikálták (Sutherland és mts., 2008).

3.3. A szilvafélék jellemzése

Az európai szilva (*Prunus domestica* L.) a *Rosaceae* család *Prunoideae* alcsaládjába tartozó, gazdasági szempontból jelentős faj. A családon belül több fajcsoport létezik, melyek közül egyik az *Euprunus*. Ide tartozik például a damaszkuszi szilva (damson), az eurázsiai szilva (bullace), a zöld-ringlő, a kökény, valamint az európai szilva (*Prunus domestica*) is, melyet elsősorban Közép-Európában termesztenek csonthéjas terméséért.

A szilva egyike lehetett az első gyümölcstermő növényeknek, melyek felkeltették az ember érdeklődését. A három, jelenleg legfontosabb faj a szilvafélék között a *Prunus domestica*, *Prunus salicina* (japánszilva) és a *Prunus simonii* (kínai szilva). Ezek vadon nem fordulnak elő, így valószínűsíthető, hogy igen korán termesztésbe vették őseiket, és emberi beavatkozásnak köszönhetően jöttek létre. A *P. domestica* termesztésbe vétele Kelet-Európában kezdődhetett meg, míg a *P. salicina* és *P. simonii* fajok Ázsia területén kezdtek hódítani.

A *Prunus* nemzetség botanikai jellemzésekor több elmélet is született. A XVIII. század elején John Ray, Joseph Pitton de Tournefort, Johann Jacob Dillenius, és Herman Boerhaave botanikusok a *Prunus* nemzetségbe egyedül a szilvaféléket helyezték. Linné ezt követően bővítette ki a *Prunus* nemzetséget ide sorolva még a cseresznyét, a kajszit és hét másik csonthéjas gyümölcsöt termő fajt (Faust és Surányi, 1999).

3.3.1. Az európai szilva (*Prunus domestica*) származása

A *Rosaceae* család elválása a *Rosales* rend többi tagjától 63-72 millió évvel ezelőtt történt meg a Kréta korban Észak-Amerika területén. A *Prunus* nemzetség Kelet-Ázsiában jelent meg mintegy 56-67 millió évvel ezelőtt a Bering-földhíd jelenlétének köszönhetően. Az európai szilvafélék (*Prunus spinosa*, *Prunus cerasifera*, *Prunus domestica*) az eurázsiai szilvaféléktől 31 millió évvel ezelőtt váltak szét (Chin és mts., 2014).

A *Prunus domestica* származásáról több elmélet is létezik, irodalmi adatok szerint ősei között szerepelhet a *Prunus cerasifera* (cseresznyeszilva) és a *Prunus spinosa* (kökény) (Crane és Lawrence, 1934). A két faj – ahogy sokan a *Prunoideae* alcsaládban – képesek egymással hibridizálni. A Kaukázus-hegységben mindkét faj megtalálható, keresztezésükből steril, triploid egyedek keletkeznek (Rybin, 1936). A két faj mesterséges keresztezéséből származó triploid utódok mellett megjelenő nagyobb és robusztusabb egyedeket az európai szilva újbóli előállításának könyvelte el. Rybin azt az elméletet is fenntartotta, mely szerint az

európai szilva a duplikálódott *P. cerasifera* és a tetraploid *P. spinosa* hibridje lenne (Rybin, 1936). Újabb keresztezési kísérlet során az első generáció még majdnem teljesen steril volt, míg a későbbi generációk 50%-a már hexaploid és fertilis lett (Endlich és Murawski, 1962).

A *Prunus cerasifera*, közismert nevén cseresznyeszilva, vagy mirobalán, az európai szilva legelterjedtebb alanya. Gyenge növekedésű, gyakran tövises bokorszerű fa. A balkáni területen, a Kaukázus-hegységben és Délnyugat-Ázsiában őshonos faj. A cseresznyeszilva diploid, de találhatók tetraploid és hexaploid változatok is. Képes kereszteződni szilvafélékkel és más *Prunus* fajokkal, így sok hibridjét tartják számon (Watkins, 1981).

A *Prunus spinosa*, vagyis a kökény tetraploid, szintén tövises, bokor habitusú faj. Kis, sötétkék termése savanykás-fanyar ízű. Mind a *P. cerasifera*, mind a *P. domestica* képes vele kereszteződni. A *P. spinosa* × *P. domestica* kereszteződéséből jellemzően pentaploid, steril hibrid keletkezik, mely *P. fruticans* (Weihe) néven ismert. Az európai szilva származása meglehetősen komplex, hiszen a *P. spinosa* is feltehetően allopoliploid faj, két különböző genomot tartalmaz (Salesses 1973). Egy másik elmélet az európai szilva allopoliploid származását cáfolja, mely szerint az egyedüli ős a *P. cerasifera* 2x, 4x, vagy 6x kromoszómaszámmal rendelkező változata lehet (Zohary, 1992).

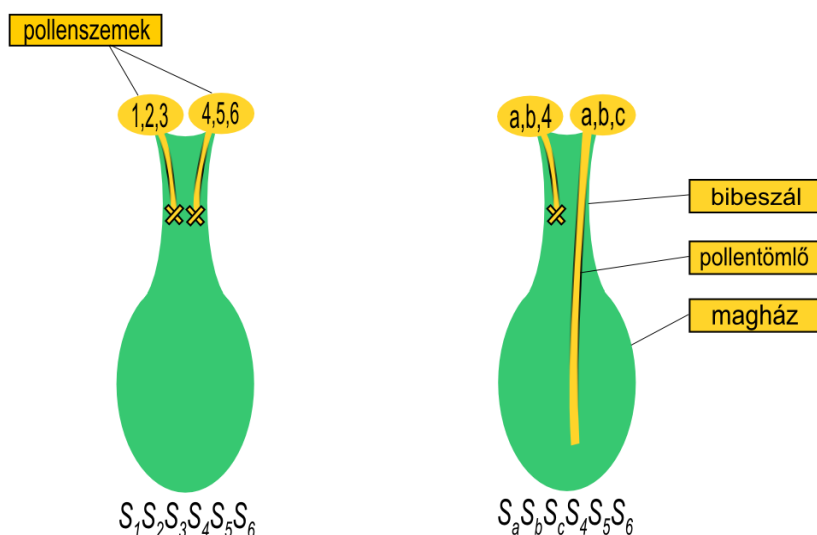
Horváth és mts. (2011) a három faj (*Prunus domestica*, *Prunus cerasifera* és *Prunus spinosa*) genetikai szerkezetét hasonlították össze kloroplasztisz DNS és SSR markerek segítségével. Összesen 80 szilva, 36 cseresznyeszilva és 14 kökénygenotípus szerepelt a vizsgálatban. Az eredményeket tekintve nagyobb allélgazdagságot találtak a *P. cerasifera* és *P. spinosa* egyedeknél, mint az európai szilvánál, ahol csak ötféle cpDNS-haplotípust azonosítottak, melyek közül az egyik 80%-ban fordult elő. A haplotípusokat csoportosítva a *Prunus spinosa* külön, míg a *Prunus domestica* és a *Prunus cerasifera* közös csoportba került. Egy *Prunus domestica* haplotípus volt csak közelebb a *Prunus spinosa* haplotípusához. Az SSR analízissel egyértelműen megkülönböztethető volt a három faj. Az eredmények nem zárták ki, hogy a *Prunus domestica* a *Prunus cerasifera* és a *Prunus spinosa* hibridizációja során jött létre, de a *Prunus cerasifera* minden bizonnyal az egyik ős, legalábbis anyai vonalon (Horvath és mts., 2011). Újabb eredmények szerint az európai szilvafélék (*Prunus spinosa*, *Prunus cerasifera*, *Prunus domestica*) közös őstől származnak, mely a Turgai-tenger eltűnését követően terjedt tovább Nyugat-, majd Közép-Ázsia területére az oligocénban (Chin és mts., 2014).

3.3.2. A szilva termesztése, jelentősége

Világviszonylatban a szilvafélék évi átlagos termésmennyisége 11 millió tonna körüli értéket ért el 2012-ben (Faostat, 2014). Ebbe beletartozik az európai szilva mellett az USA-ban, Dél-Európában és Ázsiában széles körben termesztett japánszilva és a kevésbé jelentős kökény termésmennyisége is. A szilvatermesztésben első helyen áll Kína, melyet Románia és Szerbia követ. Magyarországon a termőterület az elmúlt húsz évben drasztikusan lecsökkent: míg a 90-es években 20 ezer hektár feletti volt a termőterület, 2001-ben 10 ezer hektárra, 2012-ben pedig közel 6 ezer hektárra csökkent. A termésmennyiség hazánkban ezzel párhuzamosan csökkent, az évi átlagos termés 40 ezer tonna. A csonthéjas gyümölcsök között a szilva igen előkelő helyet foglal el, ehhez hasonló mennyiséget csak meggyből termesztünk (Faostat, 2014).

3.4. Az európai szilva (*Prunus domestica*) S-allél-rendszere

Ha az öntermékenyülés molekuláris háttere azonos a meggy esetében leírt mechanizmussal, ahol minimum két funkcióképtelen S-haplotípusra van szükség az öntermékenyülés kialakulásához, akkor a hexaploid *Prunus domestica* esetében csak három funkcióját vesztett haplotípus együttes jelenléte okozhat öntermékenyülő fenotípust (**4. ábra**).



4. ábra: A gametofitikus inkompatibilitás feltételezett működése a hexaploid *Prunus domestica* esetében: egy, vagy két mutáns allél (a,b) még nem okoz öntermékenyülést. Ha a pollen mindhárom allélja funkcióképtelen (a,b,c), létrejöhet az öntermékenyülés.

A poliploid fajok haplotípusaiban gyakrabban fordulhatnak elő mutációk, amivel megmagyarázható lehet az európai szilva fajtáinak többségére (Besztercei szilva, Haroma, Jojo) jellemző öntermékenyülés (Nyéki és mts., 2012). Feltételezhető, hogy az öntermékenyülés genetikai háttere a meggyhez hasonlóan a funkcióképtelen S-haplotípusok genomon belüli felhalmozódásának köszönhető, jóllehet erre a mai napig nincs közvetlen bizonyíték.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgált növényanyag

A kísérletek során 17, gazdasági szempontból jelentős európai szilvafajtát (*Prunus domestica* L.) vizsgáltunk (**1. táblázat**). A minták a Budapesti Corvinus Egyetem Soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság ültetvényéből származnak.

- 1. táblázat:** A vizsgált fajták pedigréje, termékenyülési viszonya és javasolt pollenadói (Nyéki és mts., 2012. ; Surányi, 2006)

Fajtanév	Pedigré	Termékenyülési viszonya	Javasolt pollenadói
1. Althann ringló	nem ismert	önmeddő	Ageni, Cacanska rodna, Debreceni muskotály, Sermina, Zöld ringló.
2. Bluefre	Stanley × President	részben öntermékenyülő	Besztercei szilva, President, Ruth Gerstetter, Stanley.
3. Cacanska leptica	Wangenheimer × Besztercei	részben öntermékenyülő (21%)	Cacanska rana, President, Montfort és Ruth Gerstetter.
4. Elena	Fellenberg × Stanley	öntermékenyülő	-
5. Empress	-	önmeddő	President
6. Haganta	Cacaks Beste × Valor	részben öntermékenyülő	Cacanska leptica, Hanita és a Katinka.
7. Hanita	President × Auerbacher (Ortenauer ×	öntermékenyülő	-
8. Haroma	Stanley 34) × Hanita	öntermékenyülő	-
9. Jojo	Ortenauer × Stanley	öntermékenyülő	-

Fajtanév	Pedigré	Termékenyülési viszonya	Javasolt pollenadói
	Ortenauer ×		
10. Katinka	Ruth	öntermékenyülő	-
	Gerstetter		
	Ortenauer ×		
11. Presenta	President	öntermékenyülő	-
			Althann ringló, Bluefre,
			Cacanska leptica,
12. President	nem ismert	önmeddő	Cacanska rodna,
			Debreceni muskotály,
			Sermina, Stanley.
			Ageni, Althann ringló,
13. Sermina (ringló)	régi olasz fajta	önmeddő	Cacanska rana,
			Debreceni muskotály.
			Besztercei szilva,
14. Stanley	Agen × Grand Duke	(részben) öntermékenyülő	Bluefre, President, Ruth Gerstetter.
15. Topend Plus	Cacaks Beste × Valor	öntermékenyülő	-
	Cacaks Beste ×	részben öntermékenyülő	Auerbacher, Cacanska leptica
16. Topfive	Auerbacher		
	Cacak's		
17. Tophit	Beste × President	részben öntermékenyülő	-

4.2. DNS-alapú vizsgálatok

4.2.1. DNS-kivonás

A növények genomi DNS-tartalmát DNeasy Plant Mini Kit segítségével vontuk ki a levelekből (Qiagen). Az extrakciót követően GeneQuant II RNA/DNA spektrofotométerrel mértük meg a DNS-koncentrációt (Pharmacia Biotech).

4.2.2. Az *S-RN-áz* gén második intronrégiójának PCR-analízise

A PaConsI-F, (fluoreszcens jelölés: FAM) és EM-PC1consRD az első intronrégió amplifikációjához (Sonneveld és mts., 2003; Ortega és mts., 2005), míg a második intronrégió amplifikációjához az EM-PC2consFD és az EM-PC3consRD konszenzus primerpárt használtuk (Sutherland és mts., 2004) (**2. táblázat**). A PCR elegy 25 µl végtérfogatban készült 40-60 ng DNS, PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 mM primerek és 0,625 U Taq-polimeráz (Fermentas) felhasználásával. A PCR-t PTC 200 (MJ Research) típusú készülékben végeztük a primerekhez közölt, eltérő protokollok alapján.

A PCR-t követően 1%-os TBE agaróz-gélelektroforézis segítségével választottuk el a fragmentumokat (45 perc, 85 V). Etidium-bromid és UV-fény segítségével tettük láthatóvá a DNS-t, mely után kiválasztottuk a különböző hosszúságú fragmentumokat.

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

2. táblázat: A PCR során használt primerek nukleotidsorrendje

Primer	Szekvencia 5'-3'	Forrás
PaConsI-F	MCT TGT TCT TGS TTT YGC TTT CTTC	Sonneveld és mts., 2003
EM-PC1consRD	GCC AYT GTT GMA CAA AYT GAA	Ortega és mts., 2005
EM-PC2consFD	TCA CMA TYC ATG GCC TAT GG	Sutherland és mts., 2004
EM-PC3consRD	AWS TRC CRT GYT TGT TCC ATT C	Sutherland és mts., 2004

Az *S-RN-áz* második intronrégióját tartalmazó PCR-fragmentumok esetében DNS-szekvenciájukat határoztuk meg.

4.3. PCR-termékek klónozása

4.3.1. Ligálás

Következő lépésként a második intronrégió alapján kiválasztott PCR-termékeket ligáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül a pTZ57R/T Easy Vector System (Fermentas) vektor, 20-50 ng PCR-termék, 5x ligáló puffer, 3 U T4 DNS-ligáz és MilliQ víz felhasználásával.

4.3.2. Transzformálás

A ligációs termékeket a JM109 kompetens sejtekkel transzformáltuk. A ligációs terméket tartalmazó csövek lecentrifugálását követően jégen tartva óvatosan hozzáadtunk 50 µl kompetens sejtet. Lágán megkopogtatva a csöveket összekevertük az elegyet majd 20 percre jégre tettük. Ezt követően 45-50 másodpercig tettük 42°C-os vízfürdőbe, majd rögtön jégre 2 percre. Hozzáadtunk 950 µl LB folyékony, ampicillinmentes táptalajt, majd 30 percre inkubáljuk 37°C-on 150 rpm fordulatszámmal rázatva.

4.3.3. Szélesztés

A transzformált sejt kultúrákból 50 és 100 µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk LB/ampicillin/IPTG/X-gal szilárd táptalajon: 10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztikivonat, 10 g/l NaCl, 7 g/l agar, 100 µg/ml ampicillin pH=7. A plate felszínén 100 µl 100mM IPTG-t és 50 µl 50 mg/ml X-galt oszlattunk szét. A plate-eket 37°C-on inkubáltuk fordított helyzetben egy éjszakán át.

4.4.4. Kék-fehér szelekció, kolónia PCR

A plate-eken megjelenő kék és fehér telepek közül a fehér színűek tartalmazzák a plazmidot, így ezeket egy fogpiszkáló segítségével egyenként eltávolítottuk és hozzáadtuk a PCR-elegyhez. Ezt megelőzően hozzáértettük egy LB/ampicillin/IPTG/X-gal szilárd táptalajú plate-hez, úgynevezett masterplate-hez. A masterplate-re mentett telepek biztonsági tartalékként szolgálnak a plazmid DNS-izolálása során.

A kolónia PCR elegye a primert (M13) leszámítva megegyezik a második intronrégió PCR elegyének összetételével. Az amplifikációt követően 1%-os TBE agaróz gélben választottuk szét a PCR-termékeket, a különböző méretű fragmentumokat jelöltük ki a DNS izolálására.

4.4.5. Plazmid DNS izolálás, szekvenálás, szekvenciaelemzés

A plazmid DNS-eket a Plasmid Mini Kittel (Qiagen) izoláltuk. A sikeres szekvenáláshoz szükséges 100 ng/µl koncentrációjú DNS-mennyiséget GeneQuant II RNA/DNA spektrofotométerrel ellenőriztük.

Az izolált DNS-ek szekvenálása az ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) automata DNS-szekvenátorral történt. A DNS-szekvenciák homológiavizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (Altschul és mts., 1990), a szekvenciák illesztéséhez a BioEdit 7.2.0. (Hall, 1999) és a filogenetikai analízishez a MEGA6 (Tamura és mts., 2013) programot használtuk. A szomszéd-összevonó (*neighbor-joining*) módszerrel készített kladogram statisztikai ellenőrzéséhez *bootstrap*-analízist használtunk 1000 ismétléssel.

Az evolválódás ütemét jelző molekuláris óra vizsgálatot Tajima 1D (Tajima, 1993) módszerével végeztük el a MEGA5 szoftverrel (Tamura és mts., 2011). Ha $P < 0,05$, elvethető az azonos ütemű evolválódás a vizsgált leszármazási útvonalakon. A vizsgálatban három szekvenciát hasonlítottunk össze, azok valamennyi pozícióját (összesen 425-437 db.) a hézagok kivételével.

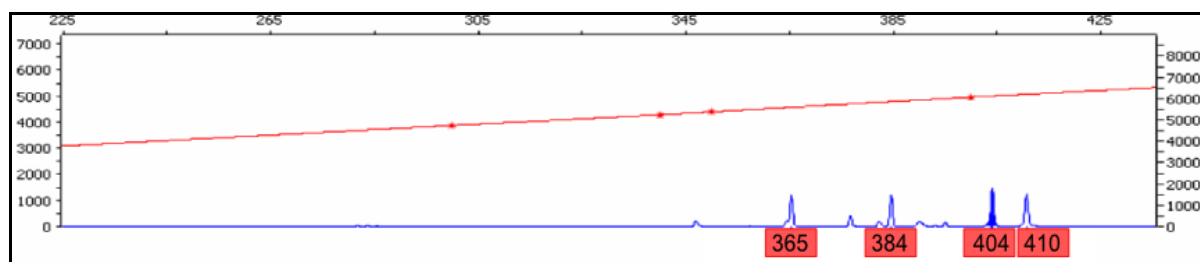
2. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Az európai szilva hexaploid gyümölcsfaj, melynek fajtái között egyaránt ismerünk öntermékenyülő és önmeddő fenotípusúakat. A termékenyülési fenotípust szabályozó *S*-lókuszt allélváltozatai közül eddig mindössze három *S-RN-áz* allél azonosításáról számoltak be, melyeket *S*₅, *S*₆ és *S*₉ néven írtak le (Sutherland és mts., 2008). További *S-RN-áz* allélok kimutatásához a gén két intronrégiójának PCR-amplifikálását alkalmaztuk.

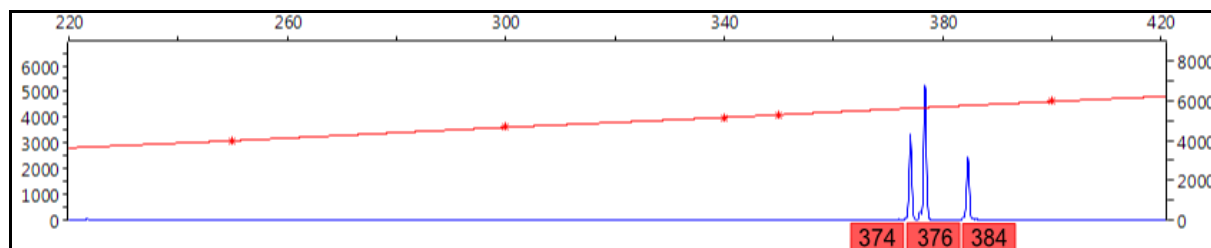
5.1. Az *S-RN-áz* gén 1. intronrégiójának vizsgálata

Az 1. intron amplifikálásához fluoreszcens jellel ellátott primerpárt használtunk, a PaConsI-F (Sonneveld és mts., 2003) és az EM-PC1consRD (Ortega és mts., 2005) primereket. A fragmentumok hosszát automata szekvenátor segítségével határoztuk meg a fluoreszcens jelek detektálásával (FAM). A szilva hexaploid tulajdonsága révén várt 6 fragmentum ellenére a meghatározott fragmentumok száma mintánként 3 és 5 között volt. Az amplifikáció a 'Cacanska leptica' fajta esetében nem volt sikeres. Összesen 18 db fragmentumot amplifikáltunk, melyek mérete 232 és 416 bp között változott. Fajtánként 3-5 fragmentumot detektáltunk. A fajtánként detektált fragmentumok száma és hossza az 5. ábrán látható.

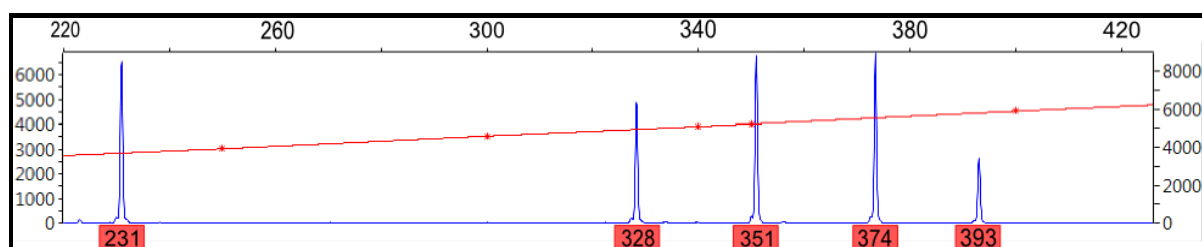
Althann ringló



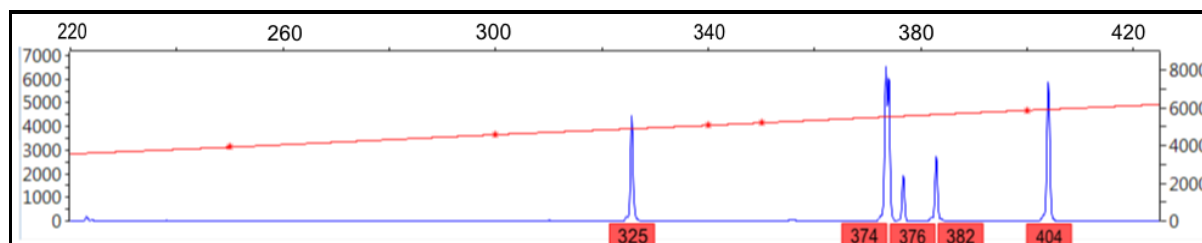
Bluefre



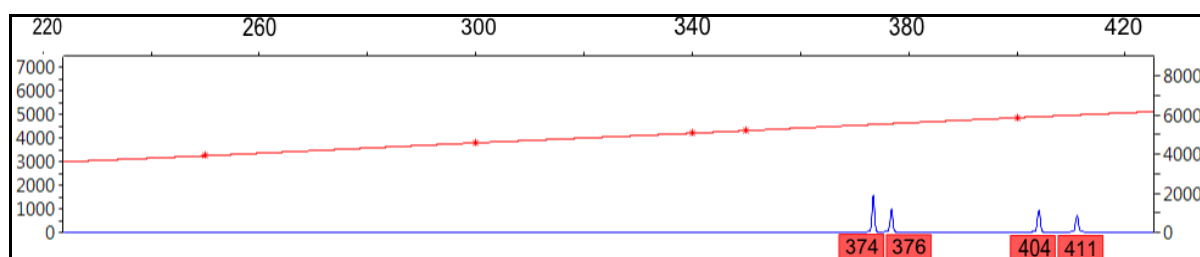
Empress



Haganta

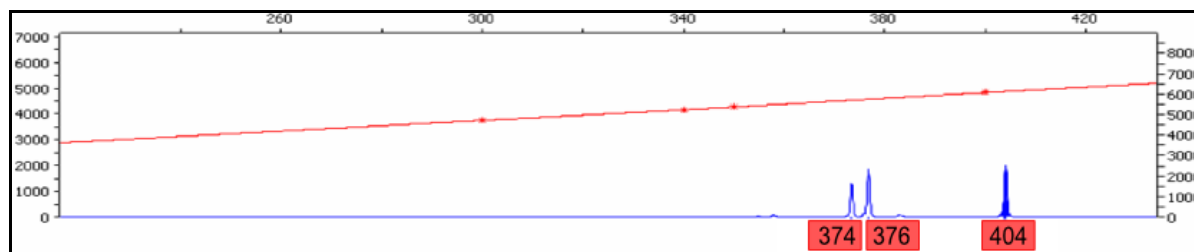


Hanita

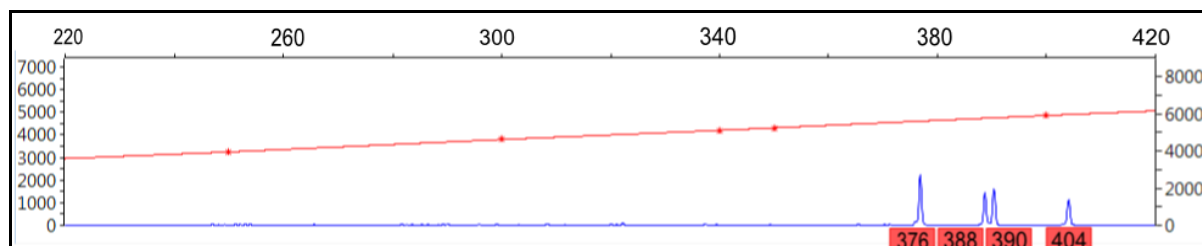


5. ábra (1. rész): A 16 szilvafajta automata szekvenátorral meghatározott 1. intronok méretei (bp): 1. 'Althann ringló', 2. 'Bluefre', 3. 'Cacanska leptica', 4. 'Elena', 5. 'Empress', 6. 'Haganta', 7. 'Hanita'.

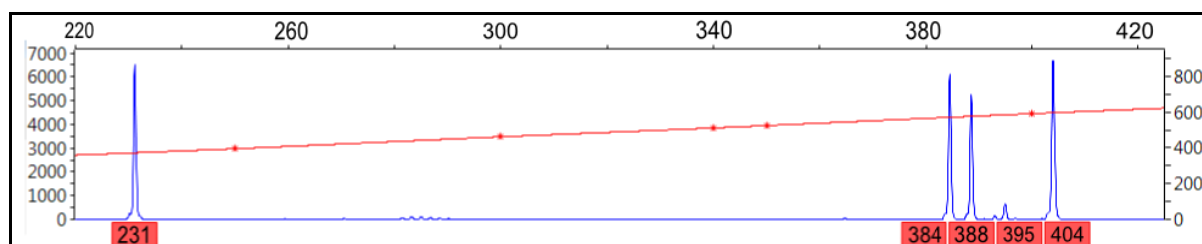
Haroma



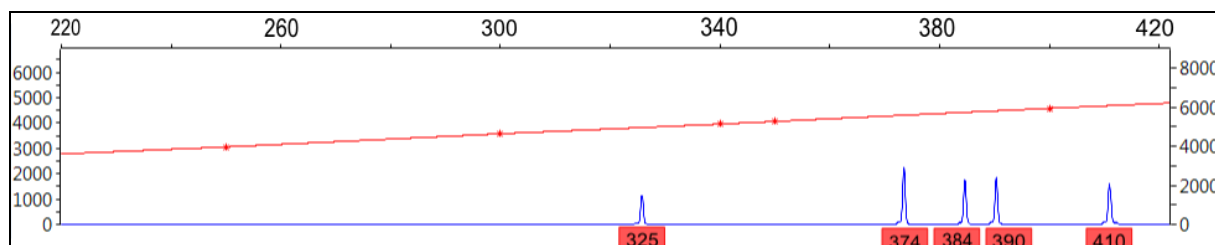
Jojo



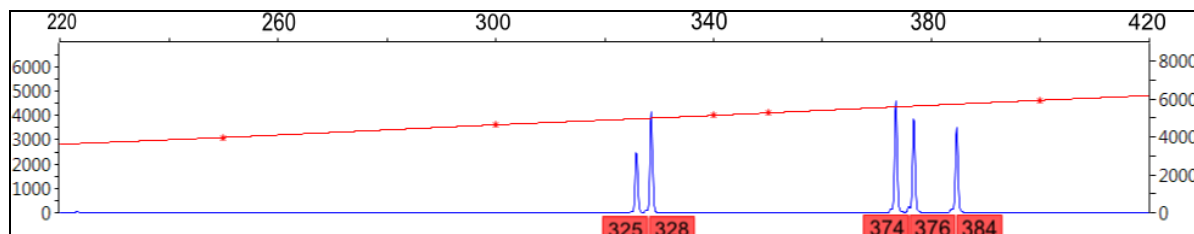
Katinka



Presenta

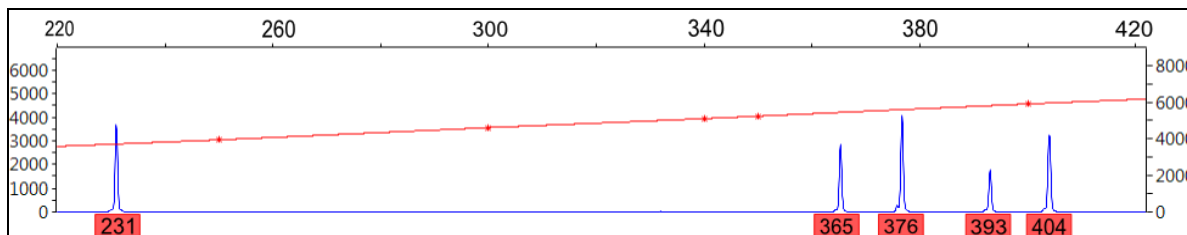


President

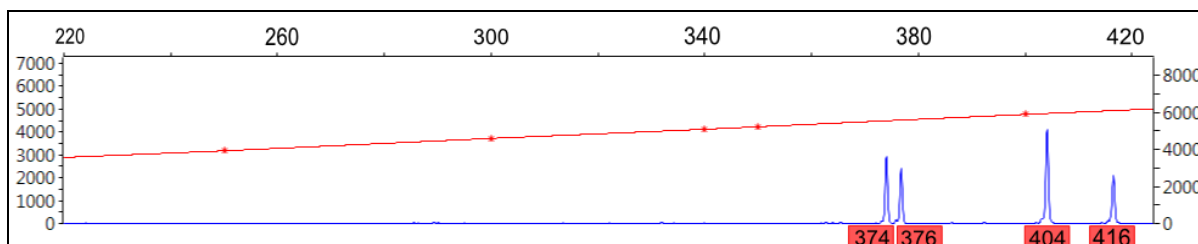


5. ábra (folytatás): A 16 szilvafajta automata szekvenátorral meghatározott 1. intronok méretei (bp):
8. 'Haroma', 9. 'Jojo', 10. 'Katinka', 11. 'Presenta', 12. 'President'.

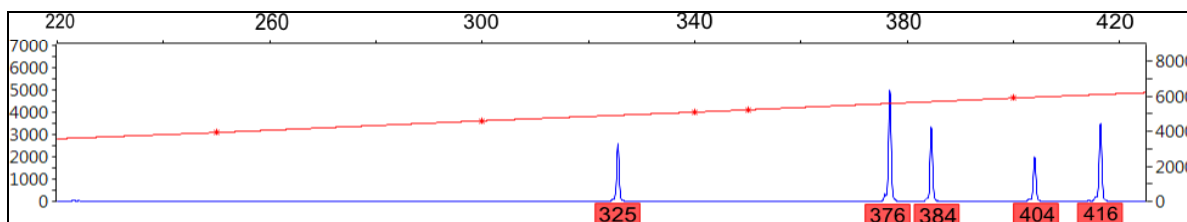
Sermina



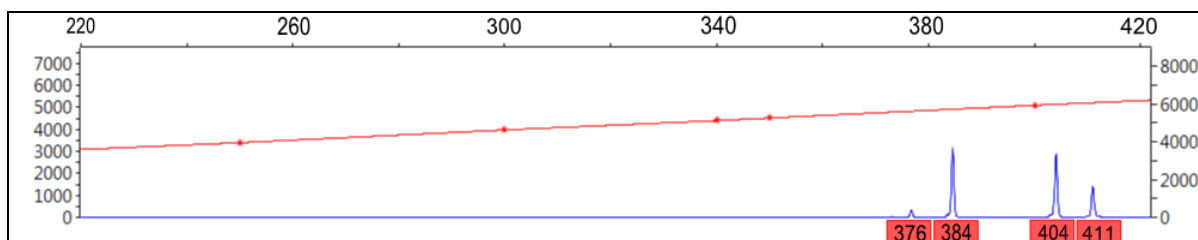
Stanley



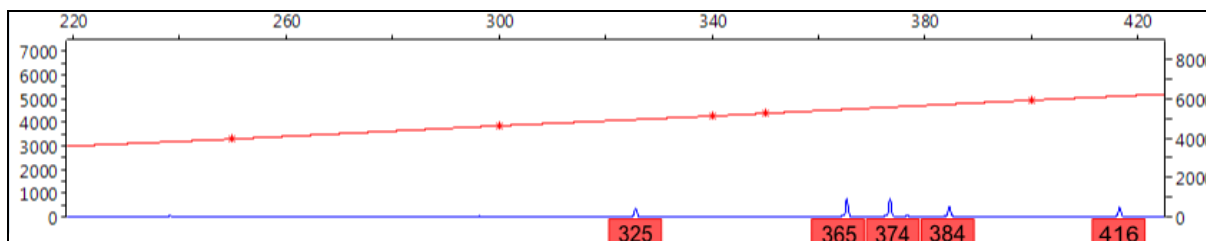
Topend Plus



Topfive



Tophit



5. ábra (folytatás): A 16 szilvafajta automata szekvenátorral meghatározott 1. intronok méretei (bp): 13. 'Sermina', 14. 'Stanley', 15. 'Topend Plus', 16. 'Topfive', 17. 'Tophit'.

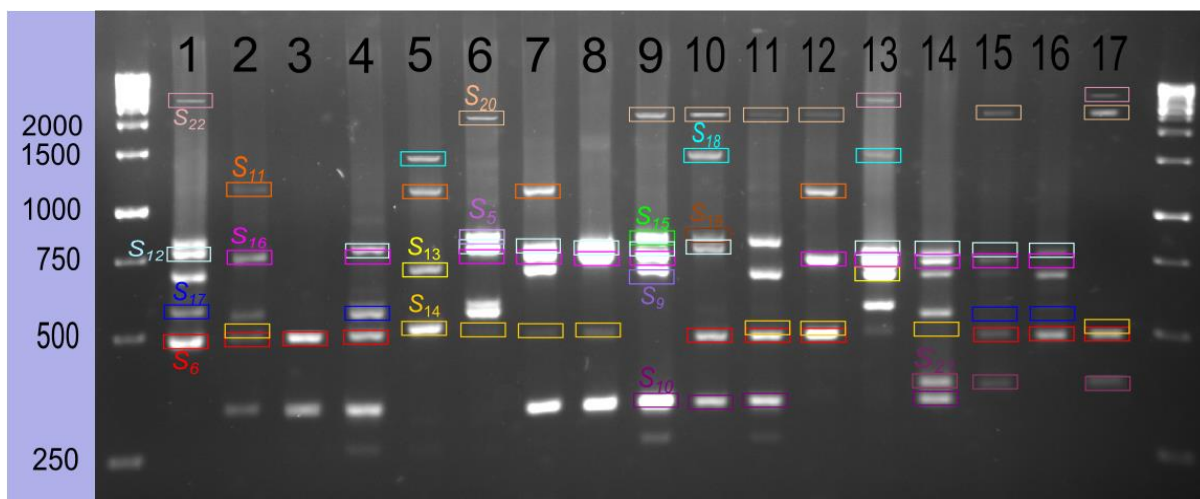
A leggyakoribb allélméretetek 376 bp és 404 bp hosszúságúak voltak, melyeket 11 fajtában találtunk, valamint a 374 bp és 384 bp, melyek 6 fajtában voltak azonosíthatók (**3. táblázat**). A 325 bp fragmentum 5 fajtában, a 232 bp, 365 bp és 416 bp DNS-szakasz 3

fajtában, a 328 bp, 388 bp, 390 bp, 393 bp, 410 bp, 411 bp fragmentumok 2 fajtában, míg a 296 bp, 350 bp, 372 bp és a 382 bp fragmentumok csak egy fajtában voltak jelen.

5.2. Az *S-RN-áz* gén 2. intronrégiójának analízise

A második intronrégió felszaporítása az EM-PC2consFD és az EM-PC3consRD primerekkel valósult meg (Sutherland és mts., 2004b), mely a C2 és C3 régiók közötti szakaszt érintette a hipervariábilis régióval és az ebbe ékelődő 2. intronnal. A fragmentumok mérete jóval nagyobb variabilitást mutatott 288 és 3000 bp közötti értékekkel, fajtánként 4 és 6 allél volt kimutatható (**6. ábra, 3. táblázat**). A 6-nál kevesebb allélt mutató fajtáknál ezen vizsgálatokkal nem lehet megállapítani, hogy van-e olyan allél, amely több példányban van jelen (homozigóta formában), vagy esetleg az alkalmazott primerekkel nem volt sikeres az amplifikáció.

A klónozás és a szekvenálás 14 fajtánál volt sikeres, így mintánként 1-4 fragmentum nukleotidsorrendjét tudtuk meghatározni. Számokkal jelöltük S_{10} -tól S_{19} -ig azon allélokat, amelyeknek meghatároztuk DNS-szekvenciáját (**6. ábra**), és valamennyi allélt keresőszekvenciaként használva BLASTN homológiavizsgálatot végeztünk az NCBI GenBank adatbázisán.



6. ábra: Szilvafajták *Prunus S-RN-áz* gén második intronrégióját amplifikáló, konszenzus primerekkel (EM-PC2consFD és az EM-PC3consRD) végzett PCR-vizsgálatának eredményei. **1.** ‘Althann ringló’, **2.** ‘Bluefre’, **3.** ‘Cacanska leptotica’, **4.** ‘Elena’, **5.** ‘Empress’, **6.** ‘Haganta’, **7.** ‘Hanita’, **8.** ‘Haroma’, **9.** ‘Jojo’, **10.** ‘Katinka’, **11.** ‘Presenta’, **12.** ‘President’, **13.** ‘Sermina’, **14.** ‘Stanley’, **15.** ‘Topend Plus’, **16.** ‘Topfive’, **17.** ‘Tophit’.

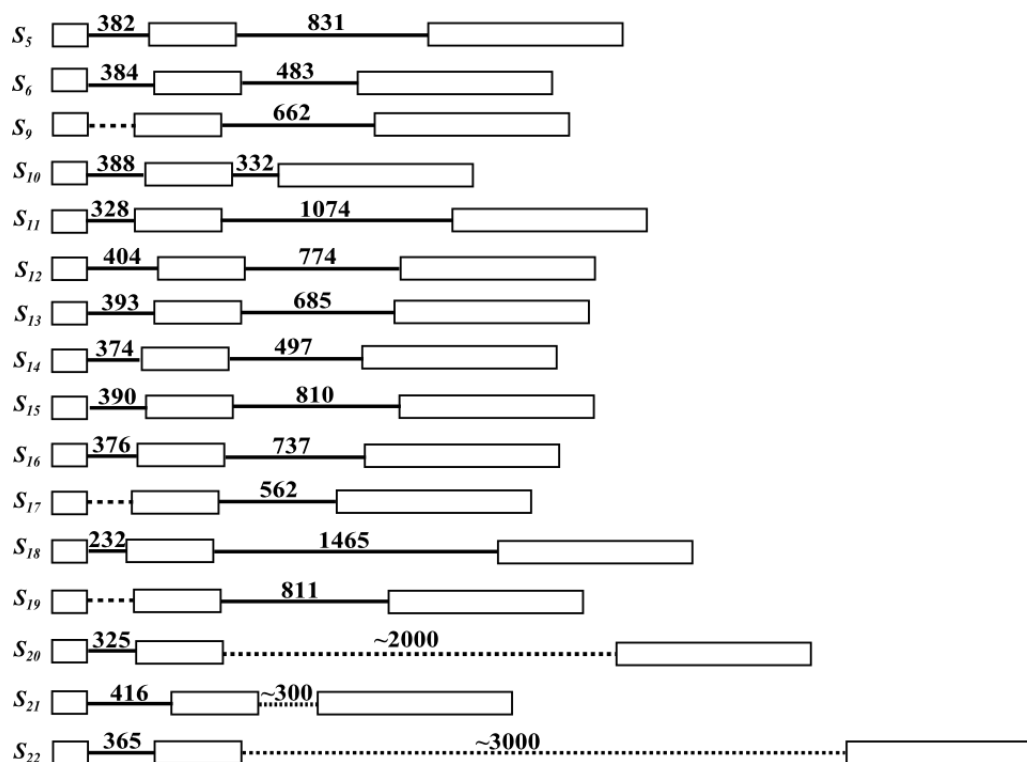
A 'Haganta' fajta esetében (6.) csak egy allél szekvenálása és azonosítása sikerült, míg 'Katinka' (10.) esetében 4 allél nukleotidsorrendjét határoztuk meg. A Sutherland és mts. (2008) által korábban azonosított három szilva S -allélt is kimutattuk az általunk vizsgált fajtákban, így az 1–4., 10–12., 15. és 16. fajták az S_6 -allélt hordozták, míg a 'Haganta' fajta az S_5 , a 'Jojo' fajta az S_9 -allélt.

3. táblázat: Az első és a második intronrégiók méretei alapján meghatározott S-genotípusok a 17 szilvafajtában.

Fajta	1. intronrégió méretei					2. intronrégió méretei						S-genotípus
1. Althann ringló	365	384	404	410		483	567	774	562	~3000		$S_6S_{12}S_{17}S_{22}$
2. Bluefre	374	376	384			483	1074	497	737			$S_6S_{11}S_{14}S_{16}$
3. Cacanska						483						S_6
4. Elena	296	372	376	384	404	483	774	737	562			$S_6S_{12}S_{16}S_{17}$
5. Empress	232	328	350	374	393	1074	685	497	1465			$S_{11}S_{13}S_{14}S_{18}$
6. Haganta	325	374	376	382	404	831	774	497	737	~2000		$S_5S_{12}S_{14}S_{16}S_{20}$
7. Hanita	374	376	404	411		1074	774	497	737			$S_{11}S_{12}S_{14}S_{16}$
8. Haroma	374	376	404			774	497	737				$S_{12}S_{14}S_{16}$
9. Jojo	376	388	390	404		662	332	774	810	737		$S_9S_{10}S_{12}S_{15}S_{16}$
10. Katinka	232	384	388	395	404	483	774	1465	811	332		$S_6S_{12}S_{18}S_{19}S_{10}$
11. Presenta	325	374	384	390	410	483	332	497	810	~2000		$S_6S_{10}S_{14}S_{15}S_{20}$
12. President	325	328	374	376	384	483	1074	497	737	~2000		$S_6S_{11}S_{14}S_{16}S_{20}$
13. Sermina	232	365	376	393	404	774	685	737	1465	~3000		$S_{12}S_{13}S_{16}S_{18}S_{22}$
14. Stanley	374	376	404	416		774	737	497	~300	332		$S_{10}S_{12}S_{14}S_{16}S_{21}$
15. Topend Plus	325	376	384	404	416	483	774	737	562	~300	~2000	$S_6S_{12}S_{16}S_{17}S_{20}S_{21}$
16. Topfive	376	384	404	411		483	774	737	562			$S_6S_{12}S_{16}S_{17}$
17. Tophit	325	365	374	384	416	483	497	~3000	~300	~2000		$S_6S_{14}S_{20}S_{21}S_{22}$

Az azonos színekkel jelölt fragmentumok ugyanazon allél két intronrégiójának méretét jelölik. A félkövér betűtípus azon fragmentumokat mutatja, melyek DNS-szekvenciáját meghatároztuk.

Az első intronrégiók méreteinek meghatározása és a második intronrégiók mérete, valamint nukleotidsorrendjeinek ismerete kellő információt nyújt a két régió egymáshoz rendeléséhez, tehát az esetek többségében lehetséges volt az adatok alapján az egyes *S-RN*-áz allélok egyedileg jellemző exon-intron szerkezetének meghatározása (7. ábra).



7. ábra: Az európai szilva korábban publikált (S_5 , S_6 ; S_9) és általunk azonosított (S_{10} - S_{22}) *S-ribonukleáz* alléljainak szerkezete. A négyzetek az exonokat, a vonalak az intronokat jelölik. A szaggatott vonallal jelölt intronok nukleotidsorrendje nem ismert, méretüket az agarózgél-elektroferogram alapján becsültük. A számok az intronrégiók méretét mutatják (bp).

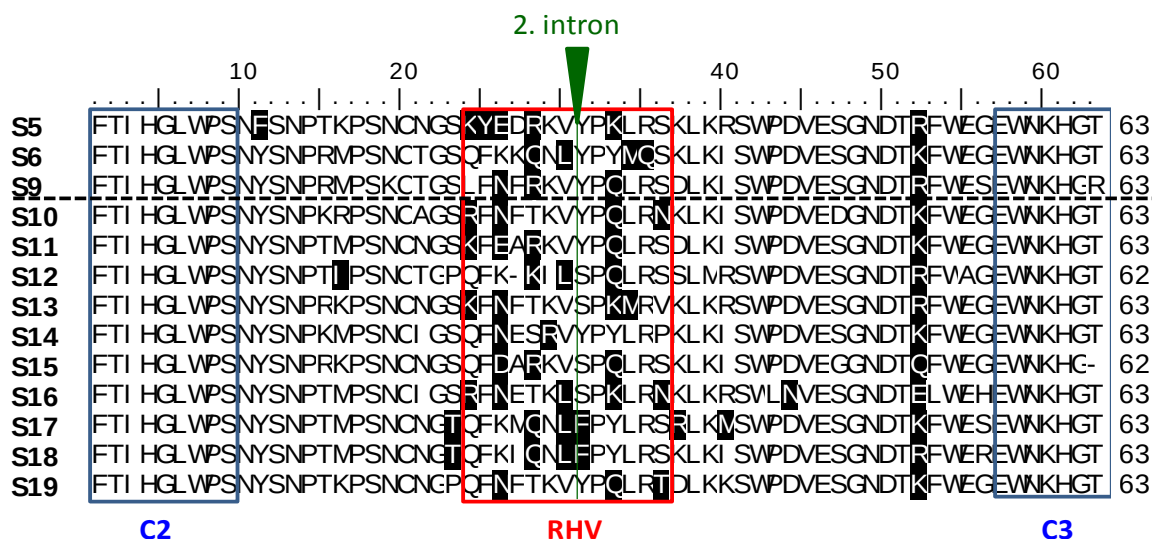
A már ismert 3 szilva *S*-allél 1. intronrégió méreteit eddig még nem közölték, eredményeink alapján az S_5 esetében 382 bp, az S_6 esetében 384 bp, míg az S_9 -allélnál 388 bp hosszú. Az S_5 -allélt korábban a ‘Bluerock’ fajtában, az S_9 -allélt a ‘Verity’ fajtában azonosították (Sutherland és mts, 2008). A szekvenciadatok alapján az eddig ismeretlen allélok elnevezését a korábbi számsort követve S_{10} -tól S_{19} -ig adtuk meg. Három allél az 1. és 2. intronrégió méretei alapján egyértelműen újak tekinthető, és bár szekvenciaadat nem áll rendelkezésünkre, a megkülönböztethetőség miatt S_{20} , S_{21} és S_{22} névvel jelöltük ezeket. Az első intronrégiók közül a leggyakoribb 376 bp hosszú fragmentum feltételezhetően a második intron alapján elnevezett S_{16} -allél. Az S_{20} -allél, mely az első intronok alapján a ‘Presenta’, ‘President’, ‘Topend Plus’, ‘Tophit’ fajtákban van jelen, a második intronrégiókról készített

agaróz gél fragmentumai alapján valószínűsíthető, hogy ez az allél ugyanúgy megtalálható a ‘Haganta’, ‘Jojo’, ‘Katinka’, valamint a ‘Tophit’ fajtákban is. A plazmid-alapú vektorokkal történő klónozás ennél az allélnál nem volt sikeres, mivel a második intronrégiójának hossza 2000 bázispár feletti, és ritkán sikeres az ilyen méretű PCR-fragmentumok transzformációja.

Az S_{21} -allél egyértelműen elkülöníthető mind az első, mind a második intronrégiók mérete alapján. A ‘Stanley’, ‘Topend Plus’ és ‘Tophit’ fajtákban van jelen, mely allél második intronjának hossza 300 bp körüli. Az S_{18} -allélt tekintve az első intron alapján az ‘Empress’, ‘Katinka’ és ‘Sermina’ fajtákban van jelen. Az allél második intronrégiójának klónozása csak a ‘Katinka’ esetében volt sikeres, viszont a gélen jól azonosítható, hogy ez a fragmentumméret megtalálható a másik két fajtában is (**6. ábra**). Az S_{22} -allél három fajtában van jelen. A kromatogramok alapján a ‘Sermina’ és a ‘Tophit’ tartalmazza a 365 bp méretű első intront, a második intron tekintetében ez a 3000 bp feletti fragmentum lehet, melynek klónozása és szekvenálása egyik fajtánál sem volt sikeres (**6. ábra**).

5.3. Az európai szilva *S-RN-áz* allélszekvenciáinak elemzése

A nukleotidsorrend ismerete nélkül, illetve a nyilvános adatbázisban szereplő allélszekvenciákon elvégzett homológiavizsgálat hiányában minden kétséget kizáró módon nem erősíthető meg az allélazonosság. Összesen 34, az *S-RN-áz* gén második intronrégiójáról amplifikált PCR fragmentumot klónoztunk, majd 2-3 ismétlésben meghatároztuk ezek DNS-szekvenciáját. A fragmentumok 13 *S-RN-áz* allélt reprezentáltak 14 fajtában. A szekvenciákat BLASTN homológiavizsgálattal ellenőriztük, ami igazolta, hogy az adatbázisban szereplő három *S-RN-áz* allélon (S_5 , S_6 és S_9) kívül 10 további, eddig nem ismert allélt találtunk. Ezek mindegyikét egyedi szekvencia jellemzi, különös tekintettel az allélspecifitás kialakításban döntő szerepet játszó (Matton és mts., 1997) hipervariábilis régióra (**8. ábra**).



8. ábra: Az ismert (S_5 , S_6 és S_9) illetve újonnan azonosított európai szilva *S-RN-áz* allélok részleges, következtetett aminosav-szekvenciájának illesztése. A gén C2 és C3 konzervatív régióit kék, a hipervariábilis (RHV) régiót piros keret jelzi Ushijima és mts. (1998) alapján. A fekete háttér a variábilis aminosavakat jelöli, a nyíl a 2. intron pozícióját. Az illesztésben szereplő szekvenciák NCBI adatbanki azonosítója: AM746946 (S_5), AM746947 (S_6) és AM746948 (S_9).

A részleges szilva *S-RN-áz* allélok közötti azonosság mértéke 0,714 és 0,920 között változott az aminosav-hasonlósági mátrix alapján (**4. táblázat**), ami tovább igazolja az általunk azonosított európai szilvaallélok egyediségét, illetve újdonságát.

4. táblázat: A részleges szilva *S-RN-áz* allélok következtetett aminosav-szekvenciájának azonossága (%).

	S_5	S_6	S_9	S_{10}	S_{11}	S_{12}	S_{13}	S_{14}	S_{15}	S_{16}	S_{17}	S_{18}	S_{19}
S_5	ID												
S_6	0,746	ID											
S_9	0,777	0,777	ID										
S_{10}	0,777	0,777	0,809	ID									
S_{11}	0,873	0,809	0,857	0,841	ID								
S_{12}	0,746	0,761	0,730	0,714	0,761	ID							
S_{13}	0,857	0,777	0,793	0,825	0,809	0,746	ID						
S_{14}	0,777	0,841	0,793	0,857	0,841	0,730	0,793	ID					
S_{15}	0,809	0,777	0,809	0,809	0,857	0,746	0,825	0,793	ID				
S_{16}	0,746	0,714	0,714	0,777	0,746	0,714	0,793	0,777	0,714	ID			
S_{17}	0,746	0,841	0,746	0,730	0,809	0,777	0,730	0,793	0,746	0,730	ID		
S_{18}	0,777	0,857	0,761	0,746	0,809	0,793	0,761	0,809	0,777	0,746	0,920	ID	
S_{19}	0,809	0,761	0,809	0,857	0,873	0,777	0,841	0,825	0,809	0,746	0,793	0,777	ID

A szilvában található *S*-allélok vizsgálata jó kiindulási pont lehet e gyümölcstermő növény eddig ismeretlen származásának felderítéséhez is. Jóllehet önmagában nem igazoló erejű, a közel rokon fajok bármelyikével egyező *S*-allélok valószínűsíthetők, hogy az adott faj hozzájárulhatott a hexaploid faj genomjának kialakulásához. Egyéb *Prunus* *S*-allélokkal való egyezés és az egyezés mértékének elemzése az *S-RN-áz* allélok evolúciójára vonatkozóan

adhat értékes információt. Összesen tíz *S-RN-áz* allélt izoláltunk európai szilvából. Ezek közül 100 %-os egyezést mutattak az S_{10} -, S_{11} - és S_{14} -allélok egy-egy *P. salicina* alléllal a C2-C3 régióban, vagyis az RHV motívumuk és intronszekvenciájuk is azonos volt (**5. táblázat**). Az S_{14} -allél egy kökényalléllal is teljes mértékű egyezést mutatott. Az S_{12} és S_{13} allélok következtetett aminosav-szekvenciája megegyezett két *P. salicina* alléllal, továbbá az S_{15} -allél egy kajsi *S-RN-áz* alléllal volt azonos.

Az európai szilva eredetéről szóló számos, mind a mai napig nem bizonyított hipotézisek egyike a *Prunus* fajok szélesebb körének részvételét feltételezte a faj kialakulásához vezető interspecifikus kereszteződések során, például a *P. cerasifera*, *P. spinosa*, *P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. persica* and *P. microcerasus* fajokét (Eryomine, 1991). Tekintve, hogy az *S-RN-áz* allélok intronrégiójában igen nagy a mutációs események (nukleotidszubsztitúciók, inszerció-deléció) gyakorisága – hiszen azok szelekciós szempontból semleges hatásúak (Patthy, 2008) –, az európai szilvának a *P. salicina*, *P. spinosa* és *P. armeniaca* allélokkal 100%-ban egyező intronszekvenciái viszonylag recens introgressziós események lenyomatának tekinthetők, ami alátámasztaná az európai szilva komplex eredetét.

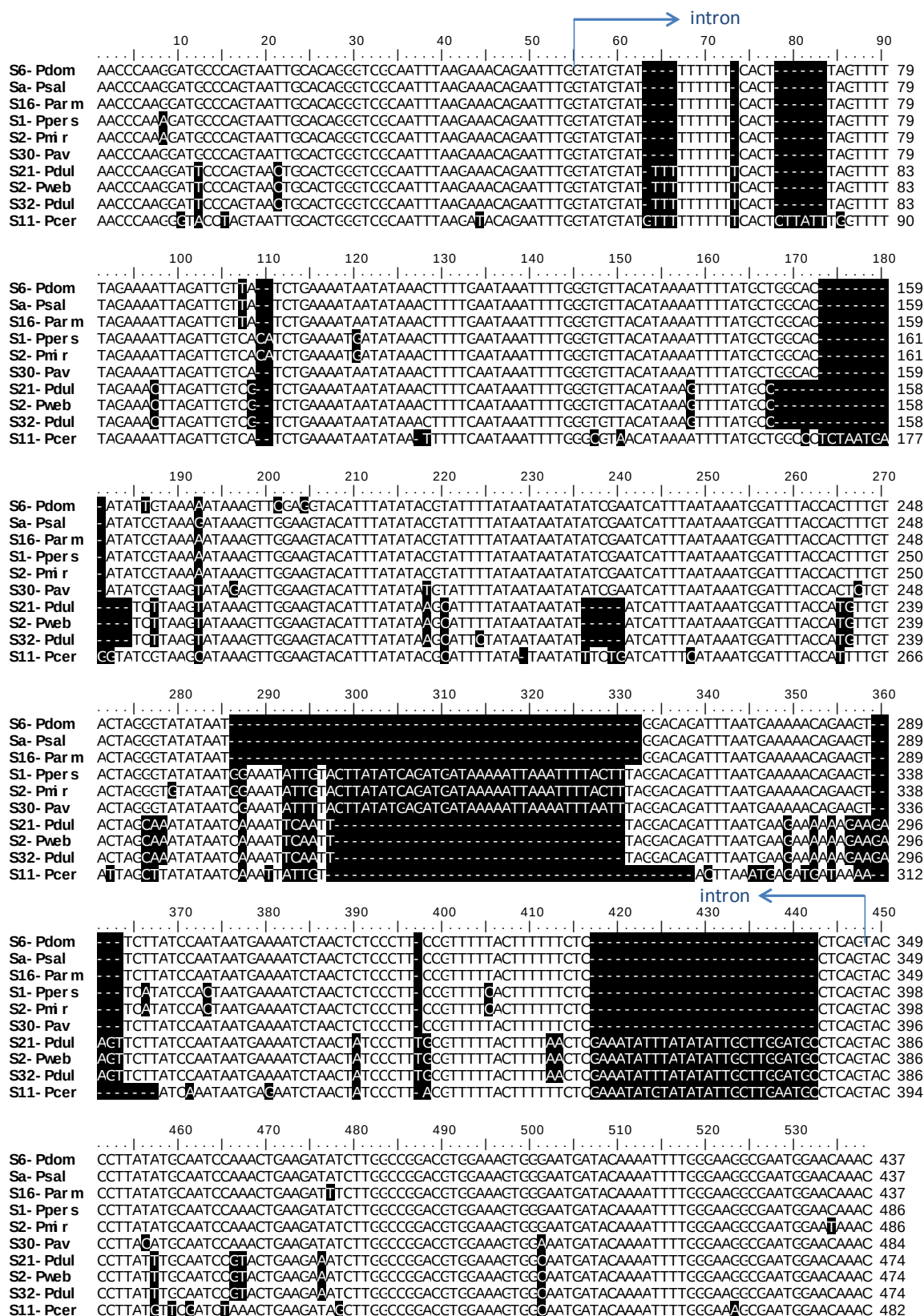
A többi négy szilva *S*-allél (S_{16} – S_{19}) jelentős mértékű egyezést mutatott más *Prunus S-RN-áz* allélokkal, de kisebb-nagyobb eltérések mutatkoztak mind a kódoló, mind a nem kódoló régiókban, ezért ezek allélspecifitása feltehetően különböző, és ennek alapján új *Prunus S-RN-áz* alléloknak tekinthetők.

5. táblázat: Az azonosított *P. domestica* *S-RN-áz* allélok összehasonlítása a legközelebbi homológ szekvenciákkal.

Szilva <i>S-RN-áz</i> allél	Legközelebbi homológ	Azonosság aminosavszinten (%)	Eltérések*
<i>S</i> ₁₀	<i>Prunus salicina</i> <i>S</i> ₁₇	100	–
<i>S</i> ₁₁	<i>P. salicina</i> <i>S</i> ₂₆	100	–
<i>S</i> ₁₂	<i>P. salicina</i> <i>S</i> ₂₃	100	2 nt-szubsztitúció
<i>S</i> ₁₃	<i>P. salicina</i> <i>S</i> ₂₄	100	3 indel és 1 nt-szubsztitúció
<i>S</i> ₁₄	<i>P. spinosa</i> <i>S</i> ₃₋₂	100	–
	<i>P. salicina</i> <i>S</i> ₂₅	100	–
<i>S</i> ₁₅	<i>P. armeniaca</i> <i>S</i> ₄₆	100	3 indel és 25 nt-szubsztitúció
<i>S</i> ₁₆	<i>P. pseudocerasus</i> <i>S</i> ₄	96	2 AS-csere, egyik az RHV régióban
<i>S</i> ₁₇	<i>P. cerasifera</i> <i>S</i> ₁₁	84	10 AS-csere
<i>S</i> ₁₈	<i>P. simonii</i> <i>S</i> ₄	86	9 AS-csere
<i>S</i> ₁₉	<i>P. cerasus</i> <i>S</i> ₂₆	88	21 %-os lefedettség

*AS: aminosav, nt: nukleotid, RHV: hipervariábilis régió

A szilva *S*₆ allélja több fajtában is jelen van (‘Althann ringló’, ‘Bluefre’, ‘Cacanska lepotica’, ‘Elena’, ‘Katinka’, ‘Presenta’, ‘President’, ‘Topend Plus’, ‘Topfive’), ennek az allélnak a következtetett aminosav-szekvenciája teljes mértékű egyezést mutatott a *P. salicina* *S*_a-*RN-ázzal* (Sutherland és mts., 2008). Az általunk elvégzett BLASTN-analízis alapján további jelentős, bár kisebb mértékű hasonlóságot mutattunk ki a *Prunus avium* *S*₃₀, *P. persica* *S*₂, *P. mira* *S*₂, *P. dulcis* *S*₂₁, *P. webbii* *S*₂, *P. dulcis* *S*₃₂ és *P. cerasifera* *S*₁₁ *RN-áz* allélszekvenciákkal. A szekvenciák illesztését követően láthatóvá vált, hogy az eltérések (kisebb-nagyobb méretű indelek, nukleotidcserék) jelentős része az *S*-ribonukleáz gén második intronrégiójában halmozódott fel (9. ábra).



9. ábra: Az európai szilva S_6 -RN-áz allél részleges DNS-szekvenciájának illesztése az adatbázisban fellelhető, legnagyobb mértékű egyezést mutató *Prunus* S-allélokkal. A fekete háttér a variábilis aminosavakat jelöli, a kék nyíl az intron határait.

A *P. domestica*, *P. salicina* és *P. armeniaca* allélok DNS-szekvenciája 99-100 %-os egyezést mutatott, ahogyan két további csoport, a *P. persica* és *P. mira*, illetve a *P. dulcis* S_{21} , S_{32} és *P. webbii* S_2 . A legkisebb egyezést a *P. cerasifera* S_{11} mutatta a *P. persica* S_1 és *P. mira* S_2 allélokkal (**6. táblázat**). A jelenség, hogy a különböző fajok S-alléljainak DNS-szekvenciája nagyobb mértékű egyezést mutathat (pl. S_6 -*Pdom* és S_a -*Psal*, **6. táblázat**), mint ugyanazon faj két különböző S-allélja (pl. az európai szilva bármelyik két allélja, **4. táblázat**) régóta ismert (Sassa et al., 1996). Az ilyen, úgynevezett transz-specifikus allélok jelenléte arra utal, hogy az allélok kialakulása megelőzte a fajok kialakulását. Sutherland és mts. (2008) korábbi vizsgálatában úgy találták, hogy a szilva transz-specifikus alléljai 90,3–99,1% azonosságot mutatnak más *Prunus* fajokban megtalálható testvéralléljaikkal, míg a nem transz-specifikus allélok azonossága 74,3 és 81,8 % között változott. Ennek alapján az S_6 -*Pdom* és S_a -*Psal*, az S_1 -*Ppers*, S_2 -*Pmir* és S_{30} -*Pav*, valamint az S_2 -*Pweb*, S_{21} -*Pdul* és S_{32} -*Pdul* allélok tűnnek transz-specifikus allélpároknak. Felmerül azonban a kérdés, hogy a közel 90%-os határérték megbízhatóan használható-e a transz-specifikus allélpárok azonosításához, és bizonyosan kizárható-e a transz-specifikus kapcsolat az S_6 -*Pdom* és S_a -*Psal* és S_1 -*Ppers*, S_2 -*Pmir* és S_{30} -*Pav* csoportok között, ahol az egyezés mértéke ugyan nem éri el a 90%-ot, de jelentősen megközelíti azt. A kérdés megválaszolása érdekében részletesebb bioinformatikai analízist végeztünk.

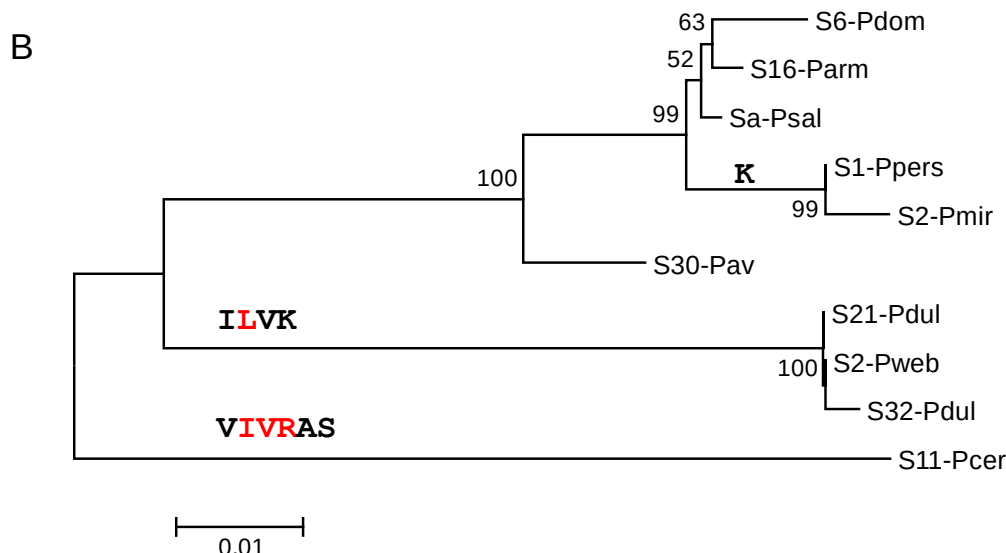
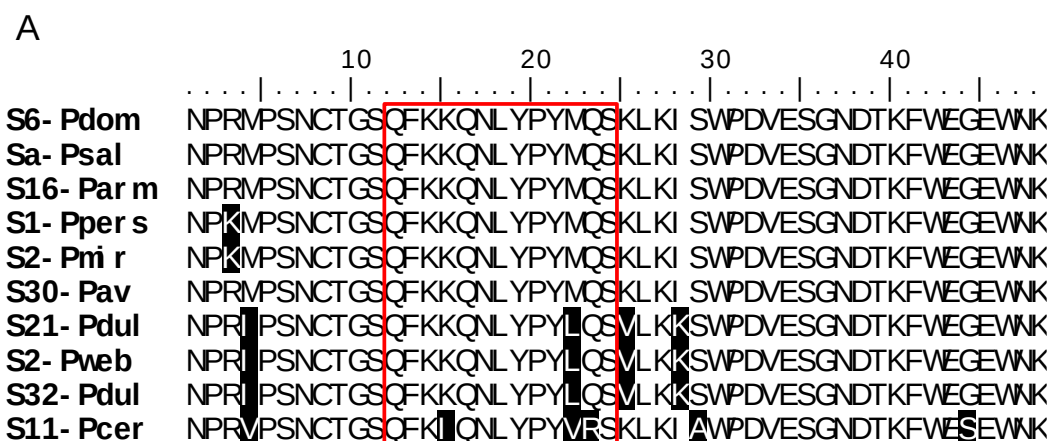
6. táblázat: A részleges szilva S_6 - és vele jelentős mértékű azonosságot mutató *Prunus* S-RN-áz allélok következtetett aminosav-szekvenciájának azonossága (%)

	S_6 - <i>Pdom</i>	S_a - <i>Psal</i>	S_{16} - <i>Parm</i>	S_1 - <i>Ppers</i>	S_2 - <i>Pmir</i>	S_{30} - <i>Pav</i>	S_{21} - <i>Pdul</i>	S_2 - <i>Pweb</i>	S_{32} - <i>Pdul</i>
S_6 - <i>Pdom</i>	ID								
S_a - <i>Psal</i>	0,990	ID							
S_{16} - <i>Parm</i>	0,990	0,995	ID						
S_1 - <i>Ppers</i>	0,880	0,884	0,884	ID					
S_2 - <i>Pmir</i>	0,876	0,880	0,880	0,995	ID				
S_{30} - <i>Pav</i>	0,876	0,882	0,880	0,956	0,952	ID			
S_{21} - <i>Pdul</i>	0,794	0,800	0,798	0,752	0,749	0,769	ID		
S_2 - <i>Pweb</i>	0,794	0,800	0,798	0,752	0,749	0,769	1,000	ID	
S_{32} - <i>Pdul</i>	0,792	0,798	0,796	0,750	0,747	0,767	0,997	0,997	ID
S_{11} - <i>Pcer</i>	0,763	0,769	0,767	0,723	0,719	0,732	0,801	0,801	0,799

ID: azonos szekvenciák, az allélt hordozó fajok rövidítései: *Pdom* = *Prunus domestica*, *Psal* = *P. salicina*, *Parm* = *P. armeniaca*, *Ppers* = *P. persica*, *Pmir* = *P. mira*, *Pav* = *P. avium*, *Pdul* = *P. dulcis*, *Pweb* = *P. webbii*, *Pcer* = *P. cerasifera*. Zöld szín jelzi a legnagyobb és narancssárga a legkisebb mértékű szekvenenciaegyezéseket.

Megvizsgáltuk, hogy a kódoló régióban, a gén 2. és 3. exonjának C2 és C3 közötti szakaszán mennyi nemszinonim mutáció halmozódott fel (**10A. ábra**). Érdekes megfigyelni,

hogy az allélspecifikus felismerésben döntő szerepet játszó RHV régióban (Matton és mts., 1997) csak a mandulafajok és a cseresznyeszilva szekvenciák mutattak eltérést. Feltűnő, hogy a *Prunoideae* alcsalád filogenetikai viszonyaitól (Bortiri és mts., 2001) jelentősen eltérő topológiát mutat az *S-RN-áz* allélszekvenciák elemzésével kapott kladogram (**10B. ábra**). A *Prunus* alnemzetség tagjai, a szilvafajok és a kajszi alléljai közös kládot alkotnak, de az *Amygdalus* alnemzetségbe tartozó őszibarack- és mandulafajok alléljai két különböző, jelentős *bootstrap*-támogatottságú kládban kaptak helyet. Meglepő továbbá, hogy az európai szilva feltételezett őseként is számontartott *P. cerasifera* S_{11} -allélja került a legtávolabbra a többi szilvaszekvenciától. Az eltérő topológia azt mutatja, hogy az evolválódás üteme nem azonos az élek mentén, ami ugyanakkor funkcióbeli módosulásra utalhat. Ennek első szembetűnő jele az RHV régióban rögzült nemszinonim mutációk jelenléte.



10. ábra: Az európai szilva S_6 -RN-áz allél filogenetikai vizsgálata. **(A)** Az allélok részleges DNS-szekvenciájának illesztése az adatbázisban fellelhető, legnagyobb mértékű egyezést mutató *Prunus* S-allélokkal. A fekete háttér a variábilis aminosavakat jelöli, a piros keret a hipervariábilis (RHV) régiót. **(B)** A vizsgált allélok szomszéd-összevonó (*neighbour-joining*) módszerrel készített filogenetikai vizsgálata az 50%-nál nagyobb bootstrap-értékekkel, és az élek mentén megjelenő, divergens karakterállapotokkal (nemszinonim mutációk, pirossal színnel az RHV régió belüli változások).

A szekvenciák változásának ütemét páronkénti összehasonlítást követően a Tajima D1 index meghatározásával jellemeztük. Konstans evolúciós ráta esetén a páronkénti eltérések összefüggést mutatnak a divergencia időtartamával. A *Pdom*, *Psal* és *Ppers* csoportban azonosnak mutatkozott az evolválódás üteme a ($\chi^2 = 1,00$, $P = 0,32$), míg a S_6 -*Pdom* és S_{11} -*Pcer* szekvenciák (S_a -*Psal* külsőcsoporttal történő) analízise igazolta, hogy a szekvenciák evolválódásának üteme szignifikánsan eltér ($\chi^2 = 35,77$, $P = 0,00$). Mindez alátámasztja, hogy

az allélspecifitást meghatározó helyeken begyűjtött mutációk hatására az allél evolúciójára másfajta szelekciós tényezők hatnak. Ilyen körülmények között az evolúció sebessége a két kládon bizonyosan nem lesz konstans, és bár az európai szilva S_6 -allélja és az S_2 -*Pweb*, S_{21} -*Pdul* és S_{32} -*Pdul* illetve a cseresznyeszilva S_{11} -alléljának közös eredete továbbra is vélelmezhető, mégsem tekinthetők transz-specifikus alléloknak, hiszen funkciójuk (allélspecifitásuk) már nagy valószínűséggel nem azonos.

Ezek a jelenségek értékes eredményeket adhatnak az *S*-allélok evolúciójára, az új allélspecifitások kialakulására vonatkozóan. Az *S-RN-áz* kevésbé változékonny és plasztikus, mint az *SFB* (Surbanovski és mts., 2007), ugyanakkor a szilvafajták többsége (és az őszibarack valamennyi fajtája) öntermékenyülő, ami megnövelheti a mutációk gyakoriságát tekintve, hogy a működésképtelen lókuszt miatt a bekövetkező mutációknak nincs közvetlen szelekciós hatása. A szilva *S-RN-áz* alléloknak nem találtunk olyan mutációt, mely működésképtelenséget (öntermékenyülést) okozna, ennek érdekében szükséges a gén többi régiójának, illetve transzkripciójának vizsgálata is. A *Prunus* fajokban leggyakrabban az *SFB* mutációja okozza az öntermékenyülést (Hegedűs és mts., 2012), ennek vizsgálata szintén fontos lesz. A szilvafajták nagy többsége azonban öntermékenyülő, így feltételezhető az előbbi forgatókönyv: az *S-RN-áz* gén által gyűjtött mutációk hatására új funkcionális kapcsolat alakulhat ki a megváltozott, működésképtelen *SFB* allélokkal, ami új allélspecifitás kialakulásához vezethet. Erre utaló szekvenciaváltozásokat leírtak korábban öntermékenyülő kajszinál is (Halász és mts., 2007).

3. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Prunus* nemzetségen belüli önmeddőség kialakulásában az *S*-lókusz két génje játszik szerepet, az *S*-ribonukleáz (*S*-*RN*-áz) és az *S*-haplotípusra specifikus *F*-box (*SFB*). A gének szekvenciáiban jelenlévő variabilitás ad lehetőséget az allélspecifikus felismerési rendszer, így a gametofitikus inkompatibilitás mechanizmusának kialakulásához. Az eddig főleg diploid fajokban jellemzett rendszert e dolgozatban a poliploid növények esetében vizsgáltuk, ezen belül a hexaploid szilva *S*-allél-rendszerének megismerése volt a célunk.

Összesen 17, gazdasági szempontból jelentős szilvafajta *S*-genotípusának részleges meghatározását végeztük el. A korábban azonosított három európai szilva *S*-allél mellett (*S*₅; *S*₆; *S*₉) 13 új *S*-*RN*-áz allélt mutattunk ki, melyek közül 10 *S*-allél részleges nukleotidsorrendjét sikerült meghatároznunk (*S*₁₀-*S*₁₉). Az *S*₁₀-*S*₂₂ allélokat az első, illetve második intronrégiók nagymértékű variabilitása valamint a C2 és C3 régió közötti szakaszok, tehát a hipervariábilis régió (RHV) egyedi DNS-szekvenciája alapján azonosítottuk.

Az azonosított allélok közül az *S*₁₀, *S*₁₁, *S*₁₄ 100%-os egyezést mutatott a *P. salicina* egy-egy alléljával, melyek közül az *S*₁₄-allél a *P. spinosa* egy másik alléljával is 100%-ban megegyezik a vizsgált szakaszon. Az *S*₁₂ és *S*₁₃-allél szintén a *P. salicina* egyik alléljával volt homológ, de 100%-os hasonlóságot csak az aminosav-szekvenciában mutatott. Az *S*₁₅-ként elnevezett allél egy kajsziálléllal egyezett meg. Ezek viszonylag recens introgressziós események lenyomatának tekinthetők és alátámaszthatják az európai szilva komplex eredetét.

Az európai szilva és a feltételezett szülőfajok *S*-allél-készletének átfedése tekintetében a kökény és a cseresznyeszilva *S*-alléljai csak egy-egy szilvaalléllal mutattak jelentős mértékű egyezést. Ezzel szemben nagymértékű azonosságot mutattunk ki a szilva *S*₆-allélja és a *P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. persica*, *P. mira*, *P. avium*, *P. dulcis*, *P. webbi* és *P. cerasifera* fajok egy-egy allélja között. A feltételezett transz-specifikus allélok C2 és C3 régiók közötti aminosavszekvenciáinak illesztése és filogenetikai vizsgálata igazolta, hogy ha a közös eredetű allél specifikitása valamelyik leszármazási ágon megváltozik, a szekvenciák evolválódásának üteme is eltérő lesz, ami diagnosztikus jelként értékelhető a megváltozott allélspecifikitás alátámasztása érdekében.

Az európai szilvafajták *S*-genotípusainak azonosítása az *S*-*RN*-áz allélok variabilitása alapján mind gyakorlati, mind kultúrevolúciós szempontból értékes eredményeknek tekinthetők és fontos alapját képezik további vizsgálatoknak.

4. IRODALOMJEGYZÉK

- 1) Allen, A. M., Thorogood, C. J., Hegarty, M. J., Lexer, C., és Hiscock, S. J. (2011): Pollen-pistil interactions and self-incompatibility in the *Asteraceae*: new insights from studies of *Senecio qualidus* (Oxford Ragwort)". *AoB Plants*. 108 (4): 687–698.
- 2) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403–410.
- 3) Anderson, M. A., McFadden, G. I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernley, R., és Clarke, A. E. (1989): Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. *Plant Cell* 1 (5): 483–491.
- 4) Baiashvili, E. I. (1980): Karyological study of *Prunus spinosa* L. *Bull. Ga. Acad. Sci.* 100 (3): 645–647.
- 5) Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., és Tao, R. (2003): Determination of S-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78 (3): 315–318.
- 6) Beppu, K., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., és Tao, R. (2002): Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 77 (6): 658–664.
- 7) Boivin, N., Morse, D., és Cappadocia, M. (2014): Degradation of S-RNase in compatible pollen tubes of *Solanum chacoense* inferred by immunogold labeling. *J. Cell Sci.* 127: 4123–4127.
- 8) Bortiri, E., Oh, S., Jiang, J., Baggett, S., Granger, A., Weeks, C., Buckingham, M., Potter, D., Parfitt, D. E. (2001): Phylogeny and systematics of *Prunus* (*Rosaceae*) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Systematic Botany* 26(4):797–807.
- 9) Charlesworth, D. (2010): Self-incompatibility. *F1000 Biol. Rep.*, 2: 68.
- 10) Chin, S., Shaw, J., Haberle R., Wen J., és Potter, D. (2014): Diversification of almonds, peaches, plums and cherries – molecular systematics and biogeographic history of *Prunus* (*Rosaceae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 76 (július): 34–48.
- 11) Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I. és Clarke, A. E. (1987): Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* 326 (6108): 99–102.

- 12) Crane, M. B., és Lawrence, W.J.C. (1934): The genetics of garden plants. In *The genetics of garden plants*. London, Macmillan. pp. XVI. 236. (1934).
- 13) Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W. és Arús, P. (2004): Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (26): 9891–9896.
- 14) Endlich, J. von, és Murawski, H. (1962): Contribution to breeding research on plum. III. Investigation on interspecific hybrids of *P. spinosa* L. *Zuchter* 32: 121–133.
- 15) Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, F., Isogai, A., Takayama, S. (2003): Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells*. 8 (3): 203–213.
- 16) Entani, T., Kubo, K., Isogai, S., Fukao, Y., Shirakawa, M., Isogai, A., Takayama, S. (2014): Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of S-RNase in a solanaceous cross-compatibility reaction. *Plant J.* 78 (6): 1014–1021.
- 17) Eryomine, G.V. (1991): New data on origin of *Prunus domestica* L. *Acta Hort.* 283: 27–29.
- 18) FAOSTAT. (2014): <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- 19) Faust, M., Surányi, D. (1999): Origin and dissemination of plums. In *Origin and Dissemination of Prunus Crops*, *Hort. Rev.* 179–231. (1999).
- 20) Franklin-Tong, V. E., Franklin, F. C. H. (2003): The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358 (1434): 1025–1032.
- 21) Gonthier, L., Blassiau, C., Mörchen, M., Cadalen, T., Poiret, M., Hendriks, T., Quillet, M. (2013): High-density genetic maps for loci involved in nuclear male sterility (NMS1) and sporophytic self-incompatibility (S-locus) in chicory (*Cichorium intybus* L., *Asteraceae*). *Theor. Appl. Genet.* 126 (8): 2103–2121.
- 22) Guerra, M. E., Rodrigo, J., López-Corrales, M., Wünsch, A. (2009): S-RNase genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breed.* 128 (3): 304–311.
- 23) Halász, J., Hegedűs, A., Szabó, Z., Nyéki, J., Pedryc, A. (2007): DNA-based S-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. *HortScience*. 42 (1): 46–50.

- 24) Halász, J., Kodad, O., Hegedűs, A. (2014): Identification of a recently active *Prunus*-specific non-autonomous Mutator element with considerable genome shaping force. *Plant J.* 79 (2): 220–231.
- 25) Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- 26) Hauck, N. R., Ikeda, K., Tao, R., Iezzoni, A. F. (2006): The mutated S1-Haplotype in sour cherry has an altered S-Haplotype-specific F-box protein gene. *J. Hered.* 97 (5): 514–520.
- 27) Hauck, N. R., Yamane, H., Tao, R., Iezzoni, A. F. (2006): Accumulation of nonfunctional S-Haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics* 172 (2): 1191–1198.
- 28) Hauck, N. R., Yamane, H., Tao, R., Iezzoni, A. F. (2002): Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Sex. Plant Reprod.* 15 (1): 39–46.
- 29) Hegedűs, A., Lénárt, J., Halász, J. (2012): Sexual incompatibility in *Rosaceae* fruit tree species: molecular interactions and evolutionary dynamics. *Biol. Plant.* 56 (2): 201-209.
- 30) Horvath, A., Balsemin, E., Barbot, J., Christmann, H., Manzano, G., Reynet, P., Laigret, F., Mariette, S. (2011): Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.). *Sci. Hortic.* 129 (2): 283–293.
- 31) Huang, S., Lee, H. S., Karunanandaa, B., Kao, T. H. (1994): Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* 6 (7): 1021–1028.
- 32) Karunanandaa, B., Huang, S., Kao, T. (1994): Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell* 6 (12): 1933–1940.
- 33) Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y. (2002): An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50 (1): 29–42.
- 34) Liu, W., Fan, J., Li, J., Song, Y., Li, Q., Zhang, Y., Xue, Y. (2014): SCF(SLF)-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *FGENE.* 5: 228.

- 35) Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., Cappadocia, M. (1997): Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *The Plant Cell* 9 (10) 1757-1766.
- 36) McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., Clarke, A. E. (1990): Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347 (6295): 757–760.
- 37) Milatović, D., Nikolić, D. (2007): Analysis of self-(in) compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 82: 170–74.
- 38) Minamikawa, M. F., Koyano, R., Kikuchi, S., Koba, T., Sassa, H. (2014): Identification of SFBF-containing canonical and noncanonical SCF complexes in pollen of apple (*Malus × domestica*). *PLoS ONE* 9 (5): e97642.
- 39) Nunes, M. D. S., Santos, R. A. M., Ferreira, S. M., Vieira, J., Vieira, C. P. (2006): Variability patterns and positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pollen SFB gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) population”. *New Phytol.* 172 (3): 577–587.
- 40) Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. (2012): *Minőségi szilvatermesztés*. Debreceni Egyetem, AGTC, Kertészettudományi Intézet (2012).
- 41) Okie, W. R., Weinberger, J. H. (1996): Plums. Fruit breeding. New York, Wiley, Volume I. Tree and tropical fruits (1996).
- 42) Ortega E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Boskovic, R. és Tobutt, K. R. (2005): Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S alleles and correction of reported S genotypes. *Plant Breed.* 124 (2): 188–196.
- 43) Patthy, L. (2009): Protein evolution. Blackwell Publishing, Oxford. (2009).
- 44) Phytozome v9.1: Home. 2014: <http://www.phytozome.net/>.
- 45) Romero, C., Vilanova, S., Burgos, L., Martínez-Calvo, J., Vicente, M., Llácer, G., Badenes, M. L. (2004): Analysis of the S-locus structure in *Prunus armeniaca* L. identification of S-Haplotype specific S-RNase and F-box genes. *Plant Mol. Biol.* 56 (1): 145–157.
- 46) Rybin, W. A. (1936): Spontane und experimentell erzeugte Bastarde zwischen Schwarzdorn und Kirschkirsche und das Abstammungsproblem der Kulturpflaume. *Planta* 25 (1): 22–58.

- 47) Saleuses, G. (1973): Etudes cytologiques chez les *Prunus*. II. Hybrides interspécifiques impliquant *P. cerasifera*, *P. spinosa*, *P. domestica* et *P. instititia*. In *Annales de l'amélioration des plantes*. p. 145-161.
- 48) Sassa, H., Nishio, T., Kowiyama, Y., Hirano, H., Koba, T., Ikehashi, H. (1996): Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547-557.
- 49) Sassa, H., Hirano, H. (2006): Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol. Gen. Genomics: MGG* 275 (1): 97–104.
- 50) Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Vaughan, S. P., Robbins, T. P. (2005): Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S Haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell* 17 (1): 37–51.
- 51) Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2003): Allele-specific PCR detection of Sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 107 (6): 1059–1070.
- 52) Stockinger, E. J., Mulnix, C. A., Long, C. M., Bretin, T. S., Iezzoni, A. F. (1996): A linkage map of Sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *J. Hered.* 87 (3): 214–218.
- 53) Surbanovski, N., Tobutt, K. R., Konstantinovic, M., Maksimovic, V., Sargent, D. J., Stevanovic, V., Ortega, E., Boskovic, R. I. (2007): Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different SFB alleles coupled with an identical S-RNase allele. *Plant J.* 50 (4) 723–734.
- 54) Sutherland, B. G., Cerovič, R., Robbins, T. P., Tobutt, K. R. (2009): The myrobalan (*Prunus cerasifera* L.): a useful diploid model for studying the molecular genetics of self-incompatibility in plums. *Euphytica* 166 (3): 385–398.
- 55) Sutherland, B. G., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2004a): Molecular genetics of self-incompatibility in plums. *Acta Hort.* 663: 557–562.
- 56) Sutherland, B. G., Robbins, T. P., Tobutt, K. R. és Weber, W. E. (2004b): Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. *Plant Breed.* 123 (6): 582–584.
- 57) Sutherland, B. G., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2008): Trans-specific S-RNase and SFB alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Mol. Gen. Genomics.* 279 (1): 95–106.
- 58) Tajima F. (1993): Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics* 135: 599-607.

- 59) Takayama, S., Isogai, A. (2005): Self-incompatibility in plums. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 (1): 467–489.
- 60) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731–2739.
- 61) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- 62) Tsukamoto, T., Hauck, N. R., Tao, R., Jiang, N., Iezzoni A. F. (2006): Molecular characterization of three non-functional S-Haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Mol. Biol.* 62 (3): 371–383.
- 63) Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R., Hirano, H. (2003): Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* 15 (3): 771–781.
- 64) Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., Tao, R. (2004): The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* 39 (4): 573–586.
- 65) Ushijima, K., Sassa, H., Tamura, M., Kusaba, M., Tao, R., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M., Hirano, H. (2001): Characterization of the S-Locus region of almond (*Prunus dulcis*): analysis of a somaclonal mutant and a cosmid contig for an S haplotype. *Genetics* 158 (1): 379–386.
- 66) Watari, A., Hanada, T., Yamane, H., Esumi, T., Tao, R., Yaegaki, H., Kataoka, I. (2007): A low transcriptional level of Se-RNase in the Se-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132 (3): 396–406.
- 67) Watkins, R. (1981): Plums, apricots, almonds, peaches, cherries (genus *Prunus*). *The Oxford encyclopaedia of trees of the world. Oxford: OUP.* 169–201.
- 68) Yamane, H., Ikeda, K., Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R. 2003: A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant. Cell Physiol.* 44 (7): 764–769.
- 69) Yamane, H., Tao, R., Sugiura, A. 1999: Identification and cDNA cloning for S-RNases in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. Cv. Sordum). *Plant Biotechnol.* 16 (5): 389–396.

- 70) Zohary, D. 1992. Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* EHRH. x *P. spinosa* L. allo-polyploid?. *Euphytica* 60. (1): 75–77.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Halász Júliának a rengeteg segítséget, a munkám feltételeinek biztosítását. Köszönöm határtalan türelmét és értékes szakmai tanácsait.

Nagyon köszönöm Dr. Hegedűs Attilának nélkülözhetetlen szakmai tudását, valamint az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönöm továbbá Dr. Pedryc Andrzejnek a támogatását.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a Genetika és Növénynevelés Tanszék dolgozóinak, munkatársainak és hallgatóinak a segítségét, akik hozzájárultak az eredményes és hatékony munkámhoz.

Köszönöm a mintagyűjtésben nyújtott szakszerű segítségét Rácz-Szabó Róbertnek.

A kutatást az OTKA K112554 pályázat támogatta.