



SZENT ISTVÁN EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
GENETIKA ÉS NÖVÉNYNEMESÍTÉS TANSZÉK

A csonthéjas gyümölcsök egyes gazdasági értékeit meghatározó transzkripciós faktorok vizsgálata

Doktori (Ph.D) értekezés

BALOGH ESZTER

Budapest

2019

A doktori iskola

megnevezése:

Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága:

Kertészeti biológia

vezetője:

Zámboriné Dr. Németh Éva

egyetemi tanár, DSc

SZIE, Kertészettudományi Kar,

Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető:

Dr. Hegedűs Attila

egyetemi tanár, DSc

SZIE, Kertészettudományi Kar,

Genetika és Növénynevelés Tanszék

.....
Zámboriné Dr. Németh Éva

Iskolavezető

.....
Dr. Hegedűs Attila

Témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
2. CÉLKITŰZÉS.....	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1. A csonthéjas gyümölcsfajok genetikai vizsgálatának eddigi eredményi.....	8
3.2. A csonthéjas gyümölcsfajok gazdasági értékét meghatározó tényezők	12
3.2.1. Nyugalmi állapot és fagyűrűs.....	12
3.2.2. Az érési idő.....	17
3.3. A transzkripciós faktorok szerkezete és funkciója	17
3.3.1. A C-repeat Binding Factor (CBF) transzkripciós faktorok bemutatása.....	21
3.3.2. A Dormancy Associated MADS-box (DAM) transzkripciós faktorok bemutatása	23
3.3.3. A hideghatás által indukált génkifejeződés szabályozása növényekben.....	26
3.3.4. A NAC transzkripciós faktorok bemutatása.....	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
4.1. Felhasznált növényanyag.....	33
4.2. DNS-kivonás	35
4.3. RNS-izolálás és reverz transzkripció.....	35
4.4. PCR reakció és szekvencia-azonosítás	35
4.5. A <i>CBF</i> , <i>DAM5</i> és <i>DAM6</i> gének expressziós vizsgálata kajsziban	38
4.6. Bioinformatikai elemzések	39
4.7. Statisztikai vizsgálatok	39
4.7.1. A real-time PCR eredmények statisztikai értékelése	39
4.7.2. A vizsgált őszibarack fajták NAC-genotípusa és érési ideje közötti összefüggés meghatározása.....	39
4.8. A hidegigény és a virágzási idő meghatározása	40
4.9. A mikrosporogenezis vizsgálata	41
5. EREDMÉNYEK	42
5.1. A kajszi <i>CBF</i> - és <i>DAM5-6</i> szekvenciák izolálása	42
5.1.1. A ParCBF1 szekvencia azonosítása és jellemzése.....	42
5.1.2. A ParDAM5 és ParDAM6 gének azonosítása és jellemzése	46
5.2. A hidegigény és a mikrospora fejlődésének jellemzése a két vizsgált nyugalmi időszakban	51

5.2.1.	A vizsgált kajszifajták hidegigénye.....	51
5.2.2.	A mikrosporogenezis vizsgálat eredményei.....	55
5.3.	A <i>ParCBF1</i> és <i>ParDAM5-6</i> génexpressziós vizsgálata a kajszii virágrügyekben.....	57
5.4.	Az érési időt befolyásoló NAC transzkripciós faktort kódoló génhomológok vizsgálata 60	
5.4.1.	Az érési idő és az őszibarack NAC-genotípusok között megfigyelt összefüggés... 60	
5.4.2.	NAC szekvencia-variációk a <i>Prunus</i> fajok között.....	62
5.5.	Új tudományos eredmények	68
6.	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	70
6.1.	A <i>P. armeniaca</i> <i>CBF</i> - és <i>DAM5-6</i> homológ gének azonosítása szerkezetük alapján....	70
6.2.	A <i>ParCBF1</i> szerepe a hideg indukálta jelátviteli hálózatban.....	72
6.3.	A vizsgált kajszifajták mikrosporafejlődés-menete és hidegigénye közötti összefüggés 73	
6.4.	A kajszifajták hidegigénye és <i>ParDAM5-6</i> expresszió közötti kapcsolat.....	74
6.5.	A <i>P. persica</i> <i>NAC1</i> allél mutációinak jellemzése.....	76
6.6.	A <i>PpNAC1</i> funkcionális markerként való alkalmazhatósága.....	79
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	80
8.	SUMMARY	84
9.	ÁBRAJEGYZÉK	87
10.	TÁBLÁZATJEGYZÉK	89
11.	MELLÉKLET	90
M.1	IRODALOMJEGYZÉK	90
M.2	MELLÉKLETEK	108
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	115

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP2/ERF	Apetala2/Ethylene Responsive Factor
bp	bázispár
CBF	C-repeat Binding Factor
DAM	Dormancy-Associated MADS-box
DREB1	Dehydration-Responsive Element Binding 1
GMQE	Global Model Quality Estimates
JTT	Jones–Taylor–Thornton Model
MADS	Minichromosome maintenance 1, Agamous, Deficiens and Serum response factor
NAC	NAM, ATAF1,2, CUC2
QMEAN	Qualitative Model Energy Analysis
QTL	Quantitative Trait Locus

1. BEVEZETÉS

Magyarországon a csonthéjas gyümölcsfajok termesztése nagy hagyományokkal rendelkezik, amit az ország kiváló természeti adottságai és klimatikus viszonyai tettek lehetővé. Az elmúlt pár évtizedben azonban egyre gyakrabban tapasztalható szélsőséges hőmérsékletingadozás a téli-koratavaszi időszakban, mely igen kedvezőtlen hatással van a gyümölcstermő növények fejlődésére és egyes évjáratokban komoly termés kiesést okozhat. A hazai nemesítőknek emellett a fogyasztói igények folyamatos változásához is igazodniuk kell, melyben egyre nagyobb hangsúlyt kap a megfelelő gyümölcsminőség mellett az érési időszak széthúzása.

Napjainkban a hagyományos nemesítés elképzelhetetlen a molekuláris biológia eszközei nélkül. A gyümölcstermő növények agronómiai szempontból fontos tulajdonságai jórészt mennyiségi jellegek és poligénes öröklődést mutatnak, ami különösen megnehezíti a szelekciót és az adott szempontból értékesebb új fajták előállítását. Az egyes tulajdonságokért felelős gének azonosítása és pontos funkcióik feltérképezése által a nemesítők fontos információhoz juthatnak a különböző gyümölcsfajok- és fajták nemesítési programokban való alkalmazhatóságára vonatkozóan. A gyümölcsfák nemesítésének egyik legfőbb problémája a hosszú vegetatív időszak, mely csonthéjasoknál fajtól függően 3-5 év is lehet. A keresztezésekből származó utódpopulációk vizsgálata és értékelése emellett meglehetősen hely- és költségigényes folyamat, ami molekuláris markerezési eljárásokkal hatékonyan csökkenthető, mivel már csíranövény korban szelektálhatjuk a kívánt genotípusokat.

Az utóbbi évtized sok új információt szolgáltatott a csonthéjas gyümölcstermő növények nyugalmi állapotának és fagyűrésének genetikai hátterére vonatkozóan. A legtöbb eredményt az őszibarack vizsgálatával kapták a kutatók, hiszen ez az a faj, amelynek a legkisebb a genommérete, öntermékenyülő fenotípusa miatt nagyfokú homozigótaság jellemzi. Ennek következtében genomszekvenciáját is első ízben ennek a fajnak határozták meg a *Prunus* nemzetségen belül, melyben sikerült olyan transzkripciós faktorokat azonosítani, melyek szerepet játszanak gazdasági szempontból fontos tulajdonságok (pl. virágzási és érési idő) kialakításában.

A fenti eredmények alapján lehetővé vált a különböző fenotípust képviselő fajták összehasonlító vizsgálata, és az eltérő tulajdonságban szerepet játszó allélváltozatok azonosítása. Mindez az alapját képezi a nemesítési programokban is hatékonyan használható molekuláris markerek fejlesztésének.

2. CÉLKITÚZÉS

Munkánk során a következő **célokat** tűztük ki:

1. A kajszzi (*Prunus armeniaca* L.) nyugalmi idejének hosszát, illetve virágzásidejét meghatározó C-repeat binding factor (CBF) transzkripciós faktort kódoló gén azonosítása és szerkezeti jellemzése, mivel ennél a gyümölcsfajnál még nem állt rendelkezésre ilyen szekvencia adat.
2. A kajszzi (*Prunus armeniaca* L.) nyugalmi idejének hosszát, illetve virágzásidejét meghatározó dormancy associated MADS-box (DAM) transzkripciós faktort kódoló gén azonosítása és szerkezeti jellemzése, mivel ennél a gyümölcsfajnál még nem állt rendelkezésre ilyen szekvencia adat.
3. Az újonnan azonosított *CBF*- és *DAM* gének expressziós vizsgálata két korai és két kései virágzású kajszifajta virágrügyeiben, két évjáratot összehasonlítva.
4. A kísérlethez kiválasztott kajszifajták nyugalmi állapotának nyomon követése a fajták hidegigényének meghatározásával és a pollenfejlődés (mikrosporogenezis) folyamatának megfigyelésével, valamint e vizsgálatok eredményeinek összevetése a génexpressziós vizsgálatokkal.
5. Az őszibarackban (*Prunus persica* L.) azonosított NAM, ATAF1,2, CUC21 (NAC1) transzkripciós faktort kódoló gén allélvariánsainak detektálása különböző érési idejű őszibarackfajtákban, valamint az allélváltozatok markerként való alkalmazhatóságának tesztelése statisztikai vizsgálattal az érési idő és a genotípus közötti korreláció alapján.
6. A *PpNAC1* génnel nagyfokú hasonlóságot mutató szekvenciák azonosítása rokon *Prunus* fajokban, valamint az őszibarack *PpNAC1*-hez hasonló allélvariációk, szekvenciabeli eltérések keresése.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

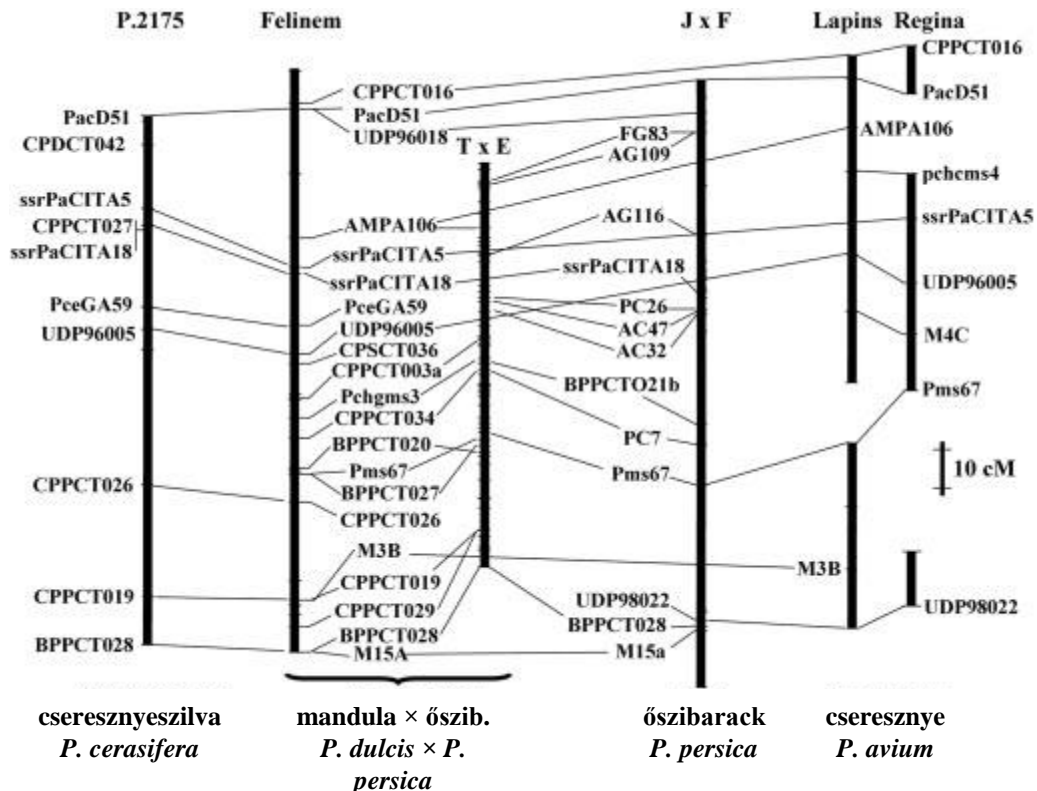
3.1. A csonthéjas gyümölcsfajok genetikai vizsgálatának eddigi eredményi

A csonthéjas gyümölcsfajok a Rosaceae család Amygdaloideae alcsaládjának *Prunus* nemzetségébe tartoznak, mely körülbelül 250 fajt foglal magába. A diploid fajok genommérete viszonylag kicsit (250 – 300 Mbp) és nagyfokú szinténia jellemzi (Dirlewanger és mts., 2004; Dondini és mts., 2006; Olmstead és mts., 2008). A *Prunus* nemzetség további alnemzetségekre tagolható: az *Amygdalus*, ahová az őszibarack és a mandula tartozik, a *Prunus*, mely a kajszi- és szilvafajokat foglalja magába, illetve a *Cerasus*, ahová a cseresznye és a meggy tartoznak (Badanes és Parfitt, 1995; Lee és Wen, 2001; Wen és mts., 2008). A legtöbb természetési szempontból jelentős *Prunus* faj a hexaploid házi szilva (*Prunus domestica* L.) és a tetraploid meggy (*Prunus cerasus* L.) kivételével diploid, a nemzetségre jellemző alapkromoszómaszám nyolc (Dondini és mts., 2007; Wen és mts., 2008).

A molekuláris biológiai módszerek fejlődésének köszönhetően mára egyre több ismeret áll rendelkezésre az egyes gazdasági tulajdonságok genetikai hátteréről. Ezen tulajdonságok többsége öröklődését tekintve mennyiségi jellegű, több gén által meghatározott, melyek ún. QTL-eket (*quantitative trait loci*) alkotnak. A egyes QTL-ek adott tulajdonságra való hatása nem egyforma, a legmeghatározóbb, fő (*major*) QTL mellett általában azonosítható több, kisebb hatású (*minor*) lókuszt is, melyek gyakran más kromoszómákon helyezkednek el. Emellett egy QTL pleiotróp hatással is bírhat, azaz akár több tulajdonság szabályozásában is részt vesz (Eduardo és mts., 2011; Aranzana és mts., 2019).

Kapcsoltsági térképek készítésével azonosíthatók az egyes QTL-ek pozíciói, továbbá az ezekhez kapcsolt molekuláris markerek, melyek segítségével nyomon követhető az adott lókuszt öröklődése. Ilyen genetikai térképek a *Prunus* fajok esetében is rendelkezésre állnak, melyek fajon belüli (intarspecifikus) illetve különböző fajok közötti (interspecifikus) keresztezésekből származó utódpopulációk elemzésével készültek (Dirlewanger és mts., 1999; Bliss és mts., 2002; Quilot és mts., 2004, Olmstead és mts., 2008; Hernandez és mts., 2017). Ezen térképek segítségével számos fontos agronómiai tulajdonság kialakításában szerepet játszó lókuszt azonosítani tudtak, úgymint az érésidő (Dirlewanger és mts. 2012; Eduardo és mts., 2013; Pirona és mts., 2013), egyes pomológiai tulajdonságok (pl. hússzín, húsállomány, magvaválóság) (Peace és mts. 2005; Eduardo és mts., 2013; Salazar és mts., 2017), vagy a téli mélynyugalmi állapot (Bielenberg és mts. 2008).

A genetikai térképezések és lókuszonosítások eddigi eredményei egyúttal azt is mutatják, hogy a diploid csonthéjas fajok genomja között nagyfokú hasonlóság áll fenn és számos átfedő, kollineáris régiót tartalmaznak (Dirlewanger és mts., 2004; Dondini és mts., 2007; Olmstead és mts., 2008). Az összehasonlító térképezések alapján Dirlewanger és mts. (2004) az őszibarack \times mandula interspecifikus keresztezéséből származó referencia térképen (Joobeur és mts., 1998) található számos marker pozícióját a rokon fajok esetében is azonosítani tudták (1. ábra).



1. ábra: A *Prunus* 1-es kapcsoltsági csoport SSR markerek alapján történő összehasonlítása különböző fajok esetében, Dirlewanger és mts. (2004) alapján. Az ábrán egy mandula \times őszibarack keresztezéséből ($T \times E =$ 'Texas' \times 'Earlygold') származó referenciatérkép (Joobeur és mts., 1998) került összehasonlításra egy *P. cerasifera* (P.2175), egy mandula-őszibarack ('Felinem'), egy őszibarack ($J \times F =$ 'Ferjalou Jalusia' \times 'Fantasia') és két cseresznyéből származó ('Lapins' és 'Regina') SSR-térképpel. A markerek pozícióját az összekötő vonalak jelölik.

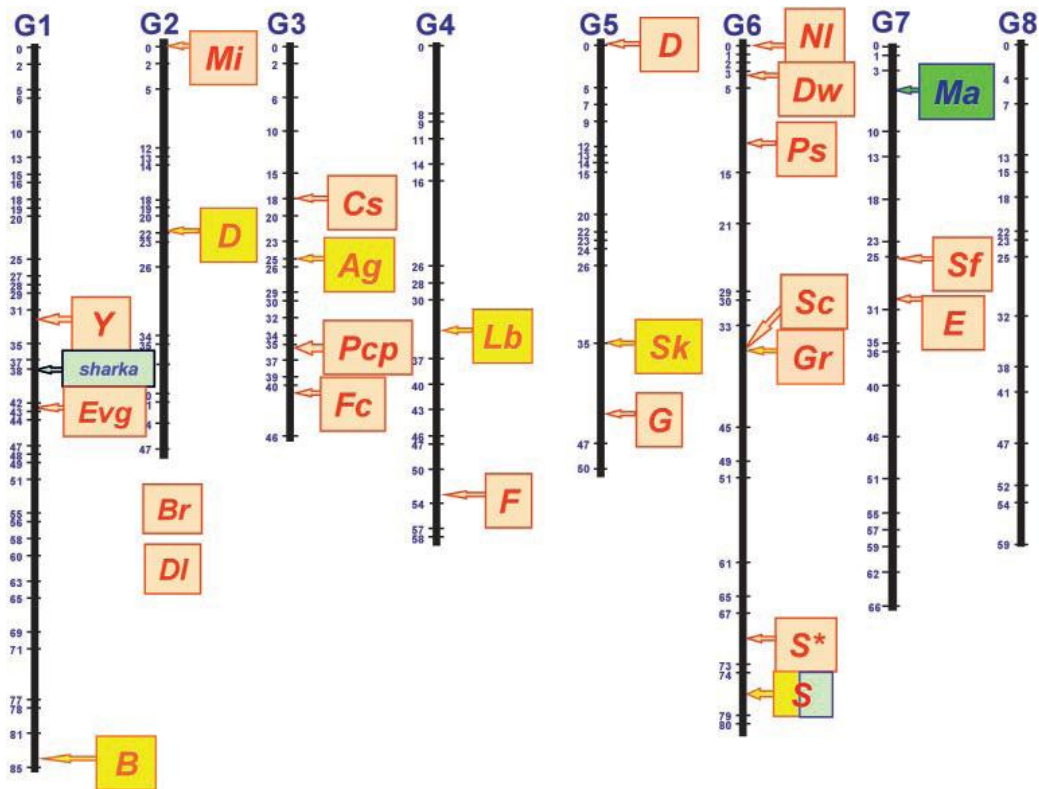
A *Prunus* fajok genomja közötti nagyfokú hasonlóságot alátámasztja, hogy több természetesi és áruérték szempontjából fontos tulajdonság kialakításáért felelős lókuszt térképeztek különböző fajok esetében azonos kromoszómán, hasonló pozícióban. A mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigény és a virágzási idő szabályozásában szerepet játszó QTL-eket térképeztek őszibaracknál a G6-os, kajszis és cseresznye esetében a G4-es kapcsoltsági csoportokra, még az érési időt meghatározó fő QTL-t mindhárom fajnál, továbbá a

japán szilva (*Prunus salicina* Lindl.) esetében is a G4-es csoporton azonosították (Dirlewanger és mts., 2012; Castède és mts., 2014, Salazar és mts., 2017). Hernandez és mts. (2017) további, virágzási időt szabályozó QTL-eket az őszibarack G4-es és G6-os, valamint az érésidőt meghatározó QTL-eket a G2, G4 és G6-os kapcsoltsági csoportjain.

A gyümölcs méretét meghatározó fő QTL-t őszibarack és japánszilva esetében is a G7-es, míg cseresznyénél a G2-es és G5-ös kromoszómán azonosították, mely utóbbi a hússzilárdságot is befolyásolta (Dirlewanger és mts., 1999; Campoy és mts., 2015; Salazar és mts., 2017). Az őszibarack gyümölcshús színét meghatározó lókuszt, mely a többi pomológiai tulajdonságtól eltérően mendeli öröklődést mutat (*Y* – fehér/*y* – sárga), a G1-es kromoszómára térképezték (Bliss és mts., 2002). A hússzínben azonban további változatosságot jelent a fokozott antocián-felhalmozódás, mely az ún. „vérbarack” és „vérszilva” fenotípusokra jellemző. Ennek kialakulása a MYB10 transzkripció faktor kódoló génhez köthető, melyet a G3-as kromoszómán azonosítottak. Ez a lókuszt felelős többek között a vörös hús- és héjszín kialakításáért őszibarack, cseresznye és japánszilva esetében is (Quilot és mts., 2004; Shen és mts., 2013; Sooriyapathirana és mts., 2010; Salazar és mts. 2017).

A beltartalmi értékek esetében az egyes íz- és aroma-komponensek bioszintézisének feltérképezése lenne a cél, mely igencsak összetett feladat. Mind a nyolc kapcsoltsági csoporton azonosítottak olyan lókusztokat, melyek a vízben oldható szárazanyag-tartalom, valamint a cukor- és a savtartalom szabályozásához köthetők (Aranzana és mts., 2019). Őszibarack esetében a G5-ös kapcsoltsági csoporton azonosították az alacsony savtartalomért felelős fő lókuszt, míg a vízben oldható szárazanyag-tartalom szabályozása hat kisebb hatású QTL-hez köthető, melyek négy kromoszómán helyezkednek el (G2, G4, G5 és G6). Japán szilva esetében ugyancsak a G6-os, illetve a G1-es kromoszómákon azonosítottak ilyen QTL-eket (Salazar és mts., 2017).

Ezen eredmények alapján a különböző térképező populációkban, eltérő fajokban azonosított QTL-ek a *Prunus* referenciatérkép alapján egy térképpé is összeilleszthetők (2. ábra) (Dirlewanger és mts., 2004). A csonthéjas fajok genomja közötti szinténia további bizonyítéka, hogy az egyes alnemzetségeken belül a fajok könnyen kereszteződnek egymással, illetve az *Amygdalus* és *Prunus* alnemzetségekhez tartozó fajok közötti is lehetséges hibridizáció, ezen keresztezések pedig gyakran fertilis utódokat eredményeznek (Dirlewanger és mts., 2004; Aranzana és mts., 2019). Ennélfogva a genetikai vizsgálatok szempontjából a *Prunus* fajok genomja akár egy egységes genetikai anyagként is kezelhető (Dirlewanger és mts., 2004).



2. ábra: Négy *Prunus* faj összehasonlító térképezésének eredménye Dirlewanger és mts. (2004) alapján. Az ábra 28 gazdasági értéket meghatározó gén pozícióját jelöli a nyolc kapcsoltsági csoporton (G1 – G8) a *Prunus* referencia térképen kajszi (világoszöld háttér), őszibarack (narancssárga háttér), mandula, illetve mandula × őszibarack hibrid (sárga háttér), valamint cseresznyeszilva (*P. cerasifera*) (sötétzöld háttér) esetében. A rövidítések a következő lókuszokat jelölik: *Y* – őszibarack hússzín; *Evg* – a nyugalmi állapotot szabályozó *evergrowing* lókusz; *B* – szíromlevél színe; *sharka* – *Plum Pox Virus* rezisztencia; *B* – virágszín; *Mi* – nematódarezisztencia; *D* – mandulahéj keménysége; *Br* – bokros növekedés; *Dl* – dupla virág; *Cs* – a gyümölcshús színe a mag körül; *Ag* – porzók színe; *Pcp* – termőlevelek száma; *Fc* – virágszín; *Lb* – virágzási idő; *F* – magvaválóság; *D* – alacsony savtartalom (őszibarack), *Sk* – keserű mag; *G* – molyhosság; *Nl* – levélalak; *Dw* – törpe növekedés; *Ps* – hímsterilitás; *Sc* – gyümölcshéj színe; *Gr* – levélszín; *S** – gyümölcsalak; *S* – önmeddőség; *Ma* – nematódarezisztencia (*P. cerasifera*); *E* – levélmirigy alakja; *Sf* – lisztharmat-rezisztencia. A *Dl* és *Br* lókuszok a G2 kapcsoltsági csoporton helyezkednek el, de pontos pozíciójuk nem ismert.

A *Prunus* fajok közül elsőként a kis genomméretű (265 Mb), nagy mértékben homozigóta faj, az őszibarack teljes genomszekvenciája vált elérhetővé (Verde és mts., 2013). Ezt követően a japán kajszi (*Prunus mume* L.) genom (Zhang és mts., 2012), a cseresznye (*Prunus avium* L.) genom (Shirasawa és mts., 2017) és egy japán dízcseresznye hibrid, a *Prunus* × *yedoensis* genom szekvenciája (Baek és mts., 2018) is publikálásra került. Ez lehetőséget ad a rokon fajok homológ genomrégióinak összehasonlítására és az egyes QTL-ek pozíciójának pontosítására, szűkítésére. Eznnek alapján több mint húsz gazdasági értéket meghatározó tulajdonság (fenológiai, pomológiai és egyes kártevő- és kórokozó-rezisztencia) kialakításáért felelős régió

helyzete vált ismerté. Ezenfelül egyre több vad *Prunus* szekvenciaadata is elérhető, ami értékes információt hordoz olyan tulajdonságokról is, melyek a nemesítés során elvesztek a jelenleg természetben lévő fajok genomjából (Aranzana és mts., 2019).

Azon fajok esetében, ahol még nem áll rendelkezésre teljes genomszekvencia, a genotipizálás továbbra is SSR és SNP markerek segítségével lehetséges. A rokon fajokból származó szekvencia-adatok azonban nagyban megkönnyítik az új gének azonosítását. (Aranzana és mts., 2019). A Rosaceae fajok esetében már rendelkezésre áll egy olyan adatbázis (Genome Database for Rosaceae), mely tartalmazza a már meglévő genetikai térképeket, markereket és ahol a legfrissebb szekvencia-adatok is elérhetők (Jung és mts., 2008). Ezen információk felhasználásával lehetőség nyílik az ún. „markerekre alapozott nemesítés” (*marker assisted breeding – MAB*) alkalmazására a csonthéjas növényfajok esetében is. A kívánt genotípusok markerekkel való korai szelekciója jelentős idő- és költségmegtakarítást jelent a nemesítők számára (Aranzana és mts., 2019).

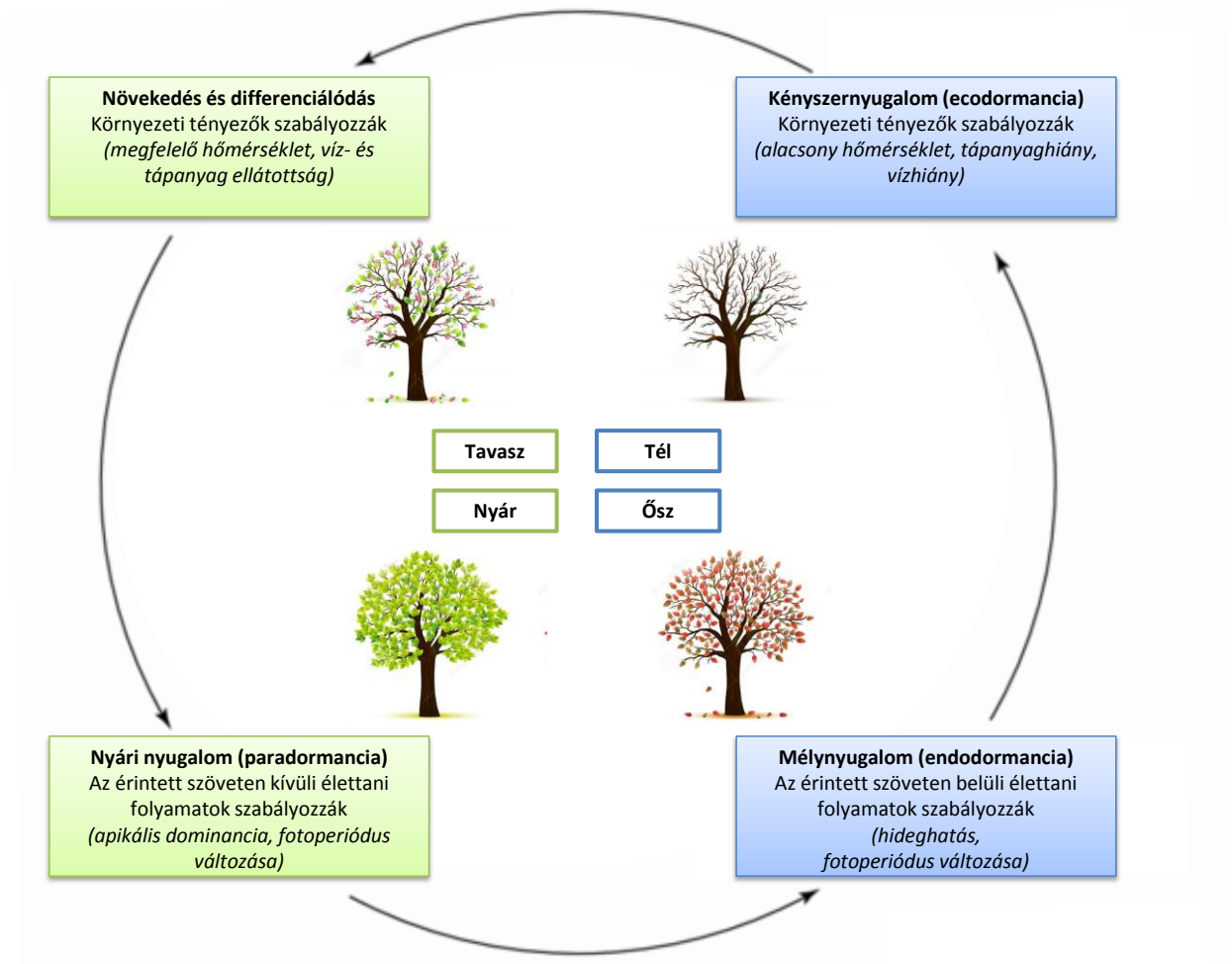
3.2. A csonthéjas gyümölcsfajok gazdasági értékét meghatározó tényezők

3.2.1. Nyugalmi állapot és fagyűrés

A mérsékelt égövi fás növények éves fejlődési ciklusában növekedési- és nyugalmi periódusok váltják egymást (Perry, 1971; Hanninen és Tanino, 2011; Lloret és mts. 2018). A nyugalmi állapot alatt az áttelelő szervek anyagcseréje lecsökken, a vegetációs kúpok növekedése pedig leáll. Ez egy olyan túlélési stratégia a növény számára, mely lehetővé teszi, hogy átvészelve a kedvezőtlen időjárási körülményeket, legfőképpen a hideget és a szárazságot (Faust és mts., 1997; Rohde és Bhalerao, 2007). Lang (1987) a nyugalmi állapot három típusát különíti el. Az ún. paradormancia vagy „nyári nyugalom” abból adódik, hogy a növény saját maga gátolja az oldalrügyek növekedését, ezzel biztosítva a hajtáscsúcs dominanciáját (apikális dominancia) (Cline és Deppong, 1999). Az endogén nyugalom vagy mélynyugalom (endodormancia) időszakában a növekedés gátlása genetikailag szabályozott, a rügpattanás kedvező körülmények között sem indul meg. Ez az állapot biztosítja, hogy a virágrügyek károsodás nélkül átvészeljék a téli időszakot. A mélynyugalom akkor ér véget, ha a növény megkapta az ehhez szükséges hideghatást (Wareing, 1956; Perry, 1971; Rohde és Bhalerao, 2007). Vannak olyan genotípusok, amelyek hazánkban ezt a hidegmennyiséget már december - januárban megkapják (Szalay és mts. 1999; Szalay és mts. 2010; Szalay és mts., 2019). Az ezt követő kényszernyugalmi állapotban (ecodormancia) a rügyek már érzékenyen reagálnak a

környezeti tényezők, elsősorban a hőmérséklet változására (Lang és mts., 1987; Faust és mts., 1997; Szalay és mts., 1999; Heide és Prestrud, 2005; Rohde és Bhalerao, 2007; Heide, 2008).

A mélynyugalmi időszak hossza egyrészt genetikailag meghatározott tulajdonság, ami egy fajon belül is eltér az egyes genotípusok között (Saure, 1985; Erez és Fishman, 1997; Egea és mts., 2003; Szalay és mts., 2006; Ruiz és mts., 2007; Prudencio és mts., 2018). Nem hagyhatjuk azonban figyelmen kívül a téli- kora-tavaszi időjárási viszonyokat sem, melyek az évjárat függvényében változnak. Magyarországon az elmúlt száz évben az átlaghőmérséklet 0,76 °C-kal emelkedett, jelenleg 10–11 °C között van. A felmelegedés mértéke nem egyenletes, az utóbbi 40 évben jelentősen felgyorsult, emellett egyre gyakoribbá válnak az extrém hőmérsékletingadozások (Bartholy et al, 2007; Lakatos és mts., 2011). Ez igen kedvezőtlen hatással van termesztett növényink életfolyamataira is, az ingadozó téli hőmérséklet jelentősen csökkenti a rügyek fagyűrő képességét (Hajnal és mts., 2013; Szalay és mts. 2016). Egy erőteljes januári felmelegedés például megindíthatja a már kényszernyugalmi állapotban lévő rügyek intenzív fejlődését, így egy később bekövetkező lehülés hatására a növekedésben lévő virágok könnyen elpusztulnak (Pedryc és mts., 1999). Szalay és mts. (2010) őszibarackon (*Prunus persica* L. Batsch) végzett kísérletei arra is rávilágítottak, hogy a virágrügyek fagyűrő képességének kialakulása több fázisra osztható, és a tél folyamán a külső környezeti hatásokra változik. Az első fázis addig tart, amíg a hőmérséklet tartósan fagypont alá nem süllyed, mely elengedhetetlen az áttelelő szervek fagyállóságának kialakulásához. Ha ez megtörténik, a legellenállóbb fajták akár -20 °C alatti hőmérsékleten sem szenvednek komoly károsodást. Amennyiben a külső hőmérséklet drasztikusan megemelkedik, a rügyek elveszíthetik fagyűrő képességüket, melyet újabb lehülés esetén lassabban ugyan, de képesek visszanyerni.



3. ábra: A mérsékeltövi fás növények éves növekedési ciklusa (Hanninen és Tanino, 2011 alapján, módosítva)

Az egyes fenológiai fázisokba való átmenetet külső környezeti tényezők, elsősorban a fény (nappalhossz és intenzitás) és a hőmérséklet befolyásolják (3. ábra). Tavasszal a mélynyugalom megszűnése után a hosszabbodó nappalok és a növekvő hőmérséklet hatására a rügyek fejlődésnek indulnak. Ősszel a lombhullás ideje alatt ugyanígy a rövidülő nappalok és a csökkenő hőmérséklet hatására leáll a növekedés, a rügy fokozatosan mélynyugalmi állapotba kerül. Az egyes környezeti tényezők változására adott válasz azonban fajonként vagy akár fajon belül, ökotípusonként is eltérő lehet (Hanninen és Tanino, 2011). Egyes fajoknál, mint pl. a nyár (*Populus* sp.) alapvetően a rövidnappalos körülmények hatására alakul ki a nyugalmi állapot, amit azonban a hőmérséklet hatása módosíthat (Kalcsits és mts. 2009). A som fajoknál (pl. *Cornus sericea* L.) szintén a rövid fotoperiódus indukálja a nyugalmi állapot kialakulását. Az északi öko-típusoknál azonban az alacsony hőmérséklet felülírja a fény hatását és

hosszúnappalos körülménynek között is kiváltja a nyugalmat – ez teszi lehetővé a növények számára a hideg égövhöz való alkalmazkodást (Svendsen és mts. 2007; Tanino és mts. 2014).

A Rosaceae családon belül az almafélék (Maloideae) alcsalád tagjainál egyértelműen az alacsony hőmérséklet váltja ki a téli nyugalmi állapotot, a nappalhossz rövidülése nincs hatással erre a folyamatra (Heide és Prestrud, 2005). A csonthéjas gyümölcsfajok esetében bizonyos hőmérséklet alatt a rövidnappalos körülmények is indukálják a rügyek nyugalmi állapotát. Azonban a fenológiai fázisok váltakozását a *Prunus* fajoknál is elsősorban a külső hőmérséklet befolyásolja (Welling és Palva, 2006; Heide, 2008).

A *Prunus* fajok esetében a mélynyugalom megtöréséhez és a virágzás indukációjához megfelelő mennyiségű hideghatás szükséges (Perry, 1971; Bailey és mts., 1981; Egea és mts., 2003; Ruiz et al, 2007; Alberquerque és mts., 2008). Ez azt jelenti, hogy a rügyek akár kedvező időjárási körülmények mellett is nyugalomban maradnak, még ezt a hatást meg nem kapják. Így elkerülhető, hogy az átmeneti felmelegedés hatására fejlődésnek indult virágszervek egy újabb lehűlés következtében károsodjanak (Sherman és Beckman, 2002). Ez a tulajdonság genotípusonként is igen eltérő egy fajon belül és nagyban meghatározza az adott fajta termesztési értékét (Fennell, 1999). A kevesebb hideghatást igénylő fajták hamarabb kezdenek virágozni, így sokkal érzékenyebbek a tavaszi fagyokra (Scorza és Okie, 1990; Szabó és mts., 2002). A tartósabb hideget igénylő fajtáknál viszont az enyhébb éghajlatú termőterületeken merülhet fel probléma, ha nem kapják meg a virágzáshoz szükséges hidegmennyiséget, melynek következtében a rügpattanás eltolódik, a virágzás vontatott, a generatív szervek nem fejlődnek megfelelően, ami ugyanúgy termés kiesést okozhat (Ruiz és mts., 2007; Alberquerque és mts., 2008; Okie és Blackburn, 2008). Egy igen enyhe évjáratban ezeknél a fajtáknál a mediterrán termőterületeken a virágzás akár teljesen el is maradhat (Viti és mts., 2010).

A hideghatás mértéke területenként és évjáratonként is jelentős változást mutat. Általánosságban elmondható, hogy enyhébb teleken lassabb a hideghatás-felhalmozódás, így a mélynyugalom megtörése is később következik be (Ruiz és mts., 2007; Viti és mts., 2010; Julian és mts. 2014). Viti és mts. (2010) egy toszkán (Olaszország) és egy jóval délebbre fekvő spanyol (Murcia) termőterületen tanulmányozták néhány, eltérő hidegigénnyel rendelkező kajszifajta nyugalmi állapotát két különböző évjáratot összehasonlítva. Az enyhébb évben az olasz termőhelyen a legnagyobb hidegigényű 'Stark Early Orange' kivételével az összes fajta esetében kisebb mértékű hideghatás is elég volt a mélynyugalom megtöréséhez. A hidegebb évjáratban a spanyol termőhelyen volt szükség nagyobb hideghatásra. Julian és mts. (2014) megfigyelései szerint egy hidegebb évjáratban a kajszifajták az enyhébb évjáratához képest 10-15 nappal korábban megkapták a mélynyugalmi állapot megtöréséhez szükséges hideghatást. Campoy és mts. (2011) enyhe klimatikus viszonyok között, mediterrán és dél-afrikai termőhelyeken

tanulmányozták a nyugalmi állapot alakulását kajszi esetében. A kérdéses területeken a nyugalmi állapotot követő rügyfejlődés hamarabb elkezdődött, mint ahogy a vizsgált fajták számára szükséges hideghatás bekövetkezetett volna. Viti és mts. (2010) megfigyelései alapján a nyugalmi állapotot megelőző időszak időjárási viszonyai is befolyásolják ezt a folyamatot: egy melegebb őszt követően a hideghatás felhalmozódása kisebb mértékben és késleltetve következett be.

A mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigény ismerete elengedhetetlen egy adott fajta gazdaságos termesztéséhez (Fennell, 1999). A hidegigény számszerű meghatározására több számítási mód ismert, melyek közül az Utah modell (Richardson és mts., 1974) az egyik legelterjedtebb. A modell ez egyes hőmérsékleti tartományokhoz megadott hidegegység értéket rendel, ami által mérhetővé válik a hideg-felhalmozódás hatékonysága. Ez a módszer a mérsékelt égövi termőterületeken alkalmazható, az enyhébb klimatikus viszonyok között kevésbé megbízható (Erez, 2000). A később kifejlesztett dinamikus modell (Fishman és mts., 1987) alapján, mely figyelembe veszi az ingadozó hőmérséklet hatását is, az enyhébb periódusok csökkentik a hideghatás-felhalmozódás hatékonyságát (Erez és Fishman, 1997; Erez, 2000). A melegebb, változékony klímájú területeken ez a módszer pontosabbnak bizonyult (Erez, 2000; Ruiz és mts., 2007; Viti és mts., 2010; Campoy és mts., 2011; Gao és mts., 2012; Prudencio és mts., 2018).

A nyugalmi időszakban jellegzetes szövettani és fiziológiai változások következnek be a virágrüggekben (Faust és mts., 1997). Ezen folyamatok nyomon követése fontos információkkal szolgál az adott genotípus hidegigényének megállapításához. A mélynyugalom megtörésének azonban nincs külső, látható jele, csupán az azt követő rügynövekedés figyelhető meg (Brown és Kotob, 1957, Julian és mts., 2011). A nyugalmi állapot nyomon követésére alkalmazott egyik módszer a pollenképződés (mikrosporogenezis) egyes fázisainak (archesporium, füzér, pollenanyasejt, tetrád és pollen) megfigyelése. Számos kísérleti eredmény arról számol be, hogy a pollenanyasejtek meiotikus osztódása mélynyugalom megtörése során, vagy kicsivel utána következik be (Bailey és mts., 1982; Luomajoki, 1982; Sedgley és Griffin, 1989; Weinbaum és mts., 1989; Szalay és mts., 1999; Szabó és mts., 2002; Jedrzejuk és Szlachetka, 2005; Bartolini és mts., 2006; Julian és mts., 2011; Julian és mts., 2014; Szalay és mts., 2019). Julian és mts. (2011) megfigyelési alapján a kajszi virágrüggeiben a portok és a benne található osztódószövet az ősz beálltával teljesen kifejlődik. Ezt követően nagyjából három hónapra ez a fejlődési folyamat megszakad, a mikrospórák kialakulása a téli nyugalom végét követően zajlik le. Ez alapján a nyugalmi állapot egyfajta határt képez a vegetatív fejlődési folyamatok és a pollen kialakulása között. További vizsgálataik során arra az eredményre jutottak, hogy a meiózis

időpontját elsősorban a fajták hidegigénye határozza meg, de függ az adott évjárat időjárási körülményeitől is (Julian és mts., 2014).

3.2.2. Az érési idő

Az érési idő fontos gazdasági értékmérő tulajdonság, melyet a gyümölcsfejlődés és -érés során lejátszódó, genetikailag meghatározott folyamatok befolyásolnak. Ezen folyamatok alapját különböző anyagcsereutak együttes, szabályozott működése adja, melyek hatással vannak a húsállomány, íz, aromaanyagok és pigmentek kialakulására – vagyis mindazon tulajdonságokra, melyek egy fajta fogyasztási értékét meghatározzák (Giovannoni, 2004). A tárolás és a szállítás megkönnyítése érdekében a gyümölcsöket általában fiziológiai érettségi állapot előtt leszüretelik, ami sok esetben vezet fogyasztói elégedetlenséghez. Éppen ezért az optimális szüreti időpont megválasztása elengedhetetlen ahhoz, hogy a fogyasztásra leginkább alkalmas állapotban kerüljön értékesítésre a gyümölcs. Ezen kívül az érési periódus széthúzója lehetővé teszi a piac növekedését (Eduardo és mts., 2011; Pirona és mts., 2013).

Az érési időt meghatározó lókuszokat az őszibarackban (*Prunus persica* L.) több különböző kromoszómán azonosítottak, melyek közül a legmeghatározóbb QTL a 4-es kapcsoltsági csoporton (G4) helyezkedik el (Dirlewanger és mts., 1999; Quilot és mts., 2004; Dirlewanger és mts., 2012). Eduardo és mts. (2011) eredményei azt mutatták, hogy az G4 kapcsoltsági csoporton található QTL mendeli öröklődésmentet mutat, és pleiotróp hatású, vagyis más tulajdonságokat is befolyásol, úgymint a gyümölcs tömege, a titrálható savtartalom és a vízben-oldható szárazanyag-tartalom. Romeau és mts. (2014) az őszibarack négy genomi régiójában azonosítottak érési időt meghatározó QTL-eket az G1, G4, G6 és G7 kapcsoltsági csoportokon, a leginkább meghatározónak itt is az G4 bizonyult. Nuñez-Lillo és mts. (2015) három fő QTL-t azonosítottak az G4-es kapcsoltsági csoport 31.0 és 42.0 cM közötti szakaszán. Dirlewanger és mts. (2012) az ennek megfelelő régióban azonosították be az érési időt meghatározó fő QTL-t cseresznye (*Prunus avium* L.) és kajszi (*Prunus armeniaca* L.) esetében.

3.3. A transzkripció faktorok szerkezete és funkciója

A transzkripció faktorok olyan speciális fehérjék, melyek szerepe az RNS-polimeráz enzim és a promóter régió közötti kapcsolat megteremtése, végső soron a transzkripció iniciációs-komplex kialakítása. Működésük szempontjából két csoportra oszthatók. Az általános transzkripció faktorok képesek az RNS-polimerázokat saját, megfelelő promótereikhez juttatni, ezzel az átírást elindítani és kis sebességgel, alapszinten működtetni. Eukarióták esetében ilyenek pl. a TFIIA- B, D, E, F és H faktorok, melyek az RNS polimeráz II-höz kapcsolódva létrehozzák

a pre-iniciációs komplexet, mely előfeltétele az átírás megindításának. A finomabb szabályozást a génspecifikus transzkripciós faktorok teszik lehetővé: általában a promóter-régió kívüli szabályozó elemekhez kötődve erősíthetik (enhancer régió), illetve gátolhatják (silencer régió) a transzkripció folyamatát, módosítva ezzel a célgén expresszióját (Latchman, 1997; Weaver és Hedrick, 1997).

A transzkripciós faktorok egyik speciális szerkezeti eleme a DNS-kötő domén, mely lehetővé teszi, hogy az általuk szabályozott gén promóteréhez vagy más, meghatározott DNS-szakaszokhoz kapcsolódjanak. A DNS-kötő domén többféle, jellegzetes fehérje-motívumot tartalmazhat (pl. hélix-kanyar-hélix, cink ujj, leucin cipzár). A transzkripciós faktorokat legtöbbször a DNS-kötő domén szerkezete alapján csoportosítjuk (Latchman, 1997). Növényekben eddig több mint háromezrezer transzkripciós faktort kódoló szekvenciát azonosítottak 156 fajból, melyeket 58 családba soroltak be ([1. táblázat](#)) (Jin és mts., 2014).

A transzkripciós faktorok többsége a transzkripciót aktiváló, illetve gátló doméneket is tartalmaz. A transzaktivációs domének vagy közvetlenül az iniciációs komplexhez kapcsolódva, vagy ko-aktivátor molekulákon keresztül fejtik ki hatásukat. Tehát vagy a komplex kialakulását gyorsítják, vagy a transzkripciós aktivitást stimulálják. A transzkripciót gátló faktorok is többféle módon fejtik ki hatásukat. Megakadályozhatják a DNS-kötő domén működését oly módon, hogy ők maguk kötődnek a kérdéses DNS-szakaszhoz, vagy magát a transzaktivációs domént is blokkolhatják (Latchman, 1997).

1. táblázat: Növényi transzkripciós faktor-családok és legfontosabb funkcióik (Forrás: PlantTFDB 0.3 adatbázis: <http://planttfdb.v3.cbi.pku.edu.cn/index.php>, Jin és mts., 2014, Bianchi és mts., 2015)

Név	Fő funkció	Név	Fő funkció
AP2/ERF	fejlődési folyamatok, környezeti tényezőkre adott válaszreakció	M-type MADS	generatív osztódószövet, virágszerv fejlődése
ARF	auxin- válaszreakciók szabályozása	MIKC-type MADS	virágszerv-identitás kialakulása
ARR-B	citokinin- válaszreakciók szabályozása	MYB	sejtosztódás és differenciálódás
B3	embrionális fejlődés	MYB-related	DNSmegkötése
BBR/BPC	női gametofiton kialakulása	NAC	biotikus stressz-válasz
BES1	brassinoszteroid szignáltranszdukció	NF-X1	stressz - adaptáció
C2H2	fejlődési folyamatok	NF-YA	virágzási idő, szárazság stressz
C3H	embrionális fejlődés	NF-YB	H2B hiszton motívum, szárazság stressz
CAMTA	Ca megkötése	NF-YC	H2A hiszton motívum, szárazság stressz
CO-like	cirkadián-ritmus, osztódószövet kialakulása	NZZ/SPL	virágszerv (porzó) fejlődés
CPP	reproduktív fejlődés, sejtosztódás szabályozása	Nin-like	gyökérnövekedés
DBB	a hipokotil fényválasz	RAV	etilén- és brasszinoszteroid válasz
Dof	szénhidrát-anyagcsere, csírázás, gibberellin- és auxin válasz	S1Fa-like	gyökér- és etilóált hajtás- fejlődés
EF2/DP	sejtciklus szabályozása	SAP	virágszerv fejlődés (termő)
EIL	etilén-válaszreakciók	SBP	virágszerv fejlődés
FAR1	fotoszintézis szabályozása	SRS	gibberellin- válasz (negatív szabályozás)
G2-like	kloroplasztisz- fejlődés	STAT	morfogenezis és sejtszabályozás

Név	Fő funkció	Név	Fő funkció
GATA	fény-válaszreakciók	TALE	reproduktív osztódó szövet kialakulása
GRAS	növekedési folyamatok	TCP	apikális dominancia, növényi test szerveződése
GRF	hajtás- és rügynövekedés	Trihelix/GT	mag- és gyümölcsfejlődés
GeBP	ismeretlen funkció	VOZ	pollenfejlődés
HB-PHD	PHD fehérjék szabályozása	WOX	fejlődési folyamatok
HB-other	homeodomén funkció	WRKY	stresszválasz
HD-ZIP	DNS felismerő dimer	Whirly	védekező reakciók
HRT-like	fejlődési folyamatok, hormonválasz	YABBY	oldalhajtás növekedése
HSF	hőstressz-válasz	ZF-HD	C4 növények <i>PEP</i> -karboxiláz génjének szabályozása
LBD	poszt-transzlációs szabályozás	bHLH	basic helix-loop-helix domén
LFY	vegetatív-generatív átmenet	bZIP	patogének elleni védelem,
LSD	programozott sejthalál szabályozása		fény-stresszválasz, mag- és gyümölcsérés

A transzkripciós faktorok olyan összetett jelátviteli (szignáltranszdukciós) utak szabályozásában játszanak szerepet, melyek meghatározzák a növények fejlődési folyamatait és a különféle biotikus, és abiotikus stressztényezőkre adott válaszreakciókat (Yang et al, 2005; Thomashow, 2010; Bianchi és mts., 2015) Az egyes transzkripciós faktorok szerepének és működésének vizsgálatával tehát értékes információkhoz juthatunk a termesztett növényfajok gazdaságilag fontos tulajdonságait kialakító számtalan folyamat molekuláris biológiai hátteréről. Nem meglepő tehát, hogy az utóbbi néhány évtizedben ugrásszerűen megnövekedett a növényi transzkripciós faktorok azonosítására és funkcióik feltérképezésére irányuló kutatások száma. A 2013-ban publikálásra került teljes őszibarack genom (Verde és mts., 2013) referencia genomként használható más *Prunus* fajokkal végzett vizsgálatokhoz és az egyes gének funkciójának azonosításához. Őszibarackban eddig több mint 1500 transzkripciós faktort kódoló gént azonosítottak, ami a fehérjekódoló gének 5,5%-át teszi ki (Bianchi és mts., 2015). Csonthéjas gyümölcsfajok esetében a kórokozókkal és kártevőkkel szembeni rezisztencia mellett a termesztési szempontból kiemelt fontosságú tulajdonságok közé tartozik az érési- és virágzási

idő, valamint a hideg- és fagyűrés is. Az elmúlt években számos olyan transzkripciós faktort azonosítottak, melyeknek szerepük van ezen folyamatok szabályozásában (Bianchi és mts., 2015).

3.3.1. A C-repeat Binding Factor (CBF) transzkripciós faktorok bemutatása

3.3.1.1. A CBF transzkripciós faktorok molekuláris jellemzése

A CBF transzkripciós faktorok az AP2/ERF (Apetala2-ethylene responsive factor) család DREB1 (Dehydration-Responsive Element Binding 1) alcsaládjába tartozó fehérjék (Reichmann és Meyerowitz, 1998). Közös szerkezeti elemük az AP2/ERF DNS-kötő domén, mely 60-70 aminosavból áll, térszerkezete pedig három, antiparalell lefutású β -lemezből és egy α -hélixből épül fel (Allen és mts., 1998; Nanako és mts., 2006). Az AP2/ERF fehérjéken belül további három alcsalád különíthető el a DNS-kötő domének száma alapján. Az 1. alcsaládba tartozó fehérjék (pl. az APETALA2) két, a 2. alcsaládba tartozók (pl. a DREB-típusú proteinek) egy AP2/ERF domént tartalmaznak. A 3. alcsaládba tartozó fehérjék esetében pedig két különböző DNS-kötő domén (ERF/AP2 és B3) azonosítható (Jofuku és mts., 1994; Kagaya és mts., 1999; Sakuma és mts., 2002, Nanako és mts., 2006).

Liu és mts. (1998) a 2. alcsalád tagjait két további csoportra osztotta az AP2 doménben található aminosav-szekvenciabeli eltérések alapján: az A-csoportba tartozó DREB/CBF-típusú proteinek a 14. pozícióban valint, a 19-ikben glutaminsavat tartalmaznak, míg a B-csoport (ERF-típusú fehérjék) esetében ezekben a pozíciókban alanin, illetve aszparaginsav található. Ennek köszönhetően a DREB/CBF és az ERF transzkripciós faktorok más-más DNS-kötő helyet ismernek fel, és eltérő jelátviteli folyamatokban vesznek részt. A CBF-fehérjékre ezenkívül jellemző még két konzervált aminosav-szekvencia motívum, a PKKR/PAGR és DSAWR, melyek az AP2 domént határolják, és jól elkülönítik azokat az AP2-család többi tagjától (Jaglo és mts., 2001). A DREB/CBF-típusú transzkripciós faktorokat Sakuma és mts. (2002) a felismerő hely alapján további hat alcsoportra osztja (A1-6). A CBF fehérjék az A1 alcsoportba tartoznak, nevüket az általuk felismert *CRT/DRE* promóter-elem (*C-repeat/dehydration responsive element*) után kapták, amely egy konzervatív CCGAC szekvenciát tartalmaz.

3.3.1.2. A CBF transzkripciós faktorok szerepe a fagyűrés szabályozásában

Az alacsony hőmérséklet a növények számára az egyik legjelentősebb stressztényező. A hideg- és fagystresszre adott válaszreakciók molekuláris hátterét éppen ezért széles körben tanulmányozzák. A CBF (C-repeat Binding Factor) transzkripciós faktorokat elsőként lúdfüben

(*Arabidopsis thaliana* L.) azonosították (Stockinger és mts., 1997; Gilmour és mts., 1998; Liu et al, 1998; Medina és mts., 1999) és működésüket transzgénikus növényeken tesztelték, melynek során azt tapasztalták, hogy a *CBF* gének alacsony hőmérsékleten nagyjából 15 perc alatt indukálódnak. Ezt követően két órán belül aktiválódnak azok a *COR* (*cold-regulated*) gének, melyek szintén tartalmazzák a *CRT/DRE* szabályozó elemet, és működésük nagymértékben hozzájárul az alacsony hőmérsékleti stressztűrés, illetve a fagyűrés kialakításához. A *CBF* gének túltermeltetése fokozta a *COR* gének expresszióját, és növelte a növények ellenállóságát (Yang és mts., 2005; Medina és mts., 2011).

A *CBF* géneket felfedezésük óta további 54 növénynemzetségben, 23 egyszikű, és 31 kétszikű fajban azonosították. Kultúrnövények közül elsőként a gabonafélékben bizonyították a *CBF* fehérjék fagyűrés kialakításában játszott szerepét. Hazánkban Martonvásáron, az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében végeznek kutatásokat kiemelkedő eredménnyel. Búza (*Triticum aestivum* L.) 5A- és 5B kromoszómáján lokalizáltak fagyűrésért felelős *FR* (*Frost Resistance*) lókuszokat (*FR-A1* és *FR-B*), majd az alakorban (*Triticum monococcum* L.) is térképeztek egy fagyállósági gént (*FR-A2*). Ugyanebben a pozícióban azonosítottak egy *CBF*-fehérjét kódoló gént (*CBF3*) és a hideg-indukálható *COR14b* gén expressziójáért felelős QTL-t, ezzel elsőként bizonyítva az összefüggést a *CBF*-gének és a fagyállóság között. További kísérleteik bizonyították a *CBF14* és a *CBF15* gének szerepét fagytolerancia kialakításában. Eredményeik rámutattak a *CBF* gén expressziós szintje és a fagyállóság mértéke közötti összefüggésre is (Galiba és mts., 2009). A *CBF14-15* géneket árpa (*Hordeum vulgare* L.) kifejezve megfigyelték, hogy a transzformált vonalak fagyűrése jelentősen megnőtt a vad típushoz képest. Az expressziós vizsgálatok kimutatták, hogy akárcsak az *Arabidopsis* esetében, a két *CBF* fehérje az árpa is fokozta *COR* gének expresszióját (Soltész és mts., 2013).

Fás növények közül a nyárfában (*Populus* ssp.) (Benedict és mts., 2006), nyírfában (*Betula pendula* Roth.) (Welling és Palva, 2008), eukaliptuszban (*Eucalyptus globulus* Labill.) (Gamboa és mts., 2007), két szőlő fajban (*Vitis vinifera* L. és *V. riparia* Michx) (Xiao és mts., 2006), és több *Rosaceae* családba tartozó növényfajban azonosítottak *CBF* transzkripciós faktorokat kódoló géneket (Kithasiba és mts., 2002; Owens és mts., 2002; Wisniewski et al, 2011; Zhang és mts., 2013). A *Prunus* nemzetségben először cseresznyében (*Prunus avium* L.) izoláltak három *DREB/CBF*-típusú gént, melyek körülbelül 50%-ban megegyeztek az *Arabidopsis CBF1* génjével (Kitashiba és mts., 2002). Az egyik cseresznyegént (*CIG-B*) lúdfű vonalban expresszáltatva fokozott fagy- és sótoleranciát tapasztaltak a transzformánsok esetében. Megfigyelték továbbá, hogy az *Arabidopsis DREB1/CBF1* egyik célgénjének (*COR15a*) indukciója akkor is bekövetkezett, ha a növények nem kaptak stresszkezelést (Kitashiba és mts.,

2004). Owens és mts. (2002) meggyből (*P. cerasus* L.) és szamócából (*Fragaria × ananassa* Duchense) izoláltak a lúdfű *AtCBF1* génnel homológ szekvenciákat (*PcCBF1* és *FaCBF1*). Wisniewski és mts. (2011) az őszibarackból egy *CBF* gén (*PpCBF1*) teljes cDNS-ét izolálták, működését pedig transzgenikus almában (*Malus × domestica*) vizsgálták. A *PpCBF1* gén túltermeltetése alacsony hőmérséklet és a rövidnappalos kezelés mellett nyugalmi állapotot idézett elő a transzformált növényeknél. A kutatócsoport ezután a már rendelkezésre álló almagenomban (Velasco és mts., 2010) azonosított öt *CBF*-típusú gént, melyek nagyfokú szekvencia-hasonlóságot mutattak a *PpCBF1* génnel, különösen az AP2 domén környezetében (Wisniewski és mts., 2011). Verde és mts. (2013) közzétették az őszibarack teljes genomszekvenciáját is, amelyben Artlip és mts. (2013) további négy *CBF* gént találtak. Zhang és mts. (2013) japán kajsziban (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc) azonosítottak két *CBF*-típusú szekvenciát (*PmCBFa* és *PmCBFb*), melyek nagy hasonlóságot mutattak a cseresznye *CBF* génjeivel. Később ugyanez a kínai kutatócsoport mind a hat *PmCBF* gént izolálta, melyek az *Arabidopsis* (Gilmour és mts., 1998) és az őszibarack *CBF*-ortológokhoz hasonlóan (Wisniewski és mts., 2011; Artlip és mts., 2013) tandem elrendeződésben helyezkednek el (Zhao és mts., 2018). Szövet-specifikus génexpressziós vizsgálatok alapján a *PmCBF5-6* elsősorban a virágrügyekben, a vegetatív rügyekben, a szárban és a levélben fejeződött ki jelentős mértékben (Wisniewski és mts., 2011; Zhao és mts., 2018).

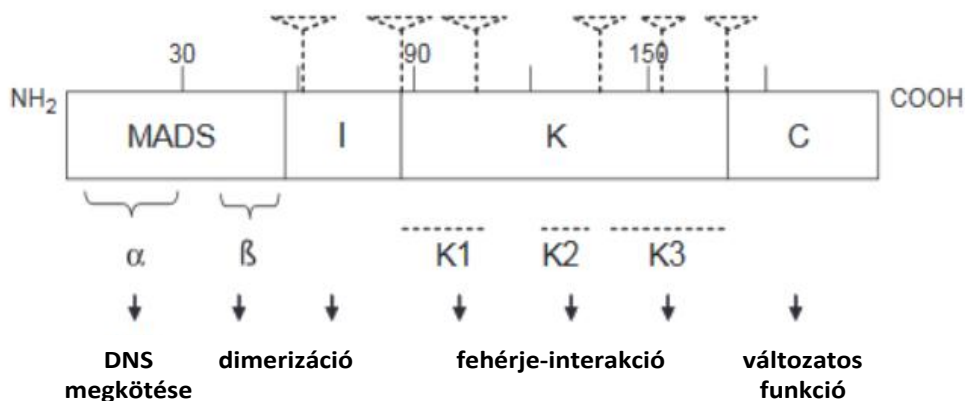
3.3.2. A Dormancy Associated MADS-box (DAM) transzkripció faktorok bemutatása

A mérsékelt égövi növényfajok növekedési ciklusának élettani háttere már viszonylag jól ismert, annak genetikai szabályozásáról azonban még kevés információ áll rendelkezésre (Rohde és Bhalerao, 2007; Hanninen és Tanino, 2011). Épp csak elkezdődött azon gének és szabályozó elemeiknek azonosítása, melyek szerepet játszanak a mélynyugalom kialakításában és feloldásában. Mivel a virágzás indukálását és a nyugalom megtörését a környezeti tényezők hasonló módon befolyásolják, valószínűsíthető, hogy e két folyamat részben közös szabályozás alatt áll. A virágzást szabályozó gének az ún. *FLOWERING LOCUS T-n* (*FT*) helyezkednek el, és a kifejlett levelekben expresszálódnak, ahonnan floém-transzport segítségével jutnak a hajtáscsúcshoz, ahol a virágzást indukálják. Szabályozásukban az ún. *MADS-box* (*Minichromosome maintenance 1, Agamous, Deficiens and Serum response factor*) géncsaládhoz tartozó transzkripció faktoroknak van szerepük negatív regulátorként (Horvath, 2009). Azonosításukra és pontos funkcióik feltérképezésére kiterjedt kutatásokat végeztek lúdfűn (*Arabidopsis thaliana* L.), tátikán (*Antirrhinum majus* L.) és petúnia hibrideken. Különböző *MADS-box* géneket azonosítottak, melyek külön-külön vagy együttesen szabályozzák az egyes virágszervek fejlődését. Összehangolt működésük biztosítja, hogy a virágzás megfelelő időben,

az ivaros szaporodáshoz optimális körülmények között következzen be (Theissen és mts., 2000; Horvath, 2009). Mérsékeltövi fás növények esetében a téli rügy nyugalmi állapot szabályozását e transzkripciós faktor-család speciális csoportja, az ún. *DAM* (*Dormancy Associated MADS-box*) gének végzik.

3.3.2.1. A *DAM* transzkripciós faktorok molekuláris jellemzése

A *MADS-box* gének jelenléte általános az eukarióta élőlényekben. A növények alapvető fejlődési folyamatait szabályozzák (Theissen és Saedler, 1995; Reichman és Meyerowitz, 1997). A *DAM* transzkripciós faktorok a II. típusú *MADS-box* géncsaládba tartoznak. Közös szerkezeti elemük az ún. MIKC-típusú domén-struktúra, melynek három szerkezeti eleme az M (*MADS*)-, a K („keratin-like”)- és C (C-terminális) domének (4. ábra). Az erősen konzervált *MADS*-domén és a DNS-kötő specifitásért és a dimerizációért felelős. A *MADS*-box 58 aminosavból áll, felismerő helye az ún. CArG [CC(A/T)6GG] konszenzus szekvencia. A K-domén a fehérje-fehérje kapcsolatokat alakítja ki és ún. „coiled-coil” struktúrával rendelkezik, mely szintén megkönnyíti a *MADS*-box fehérjék dimerizációját. A kettőt összekapcsoló I-domén kevésbé konzervált és szintén a dimerizációban van szerepe. Legváltozékonyabb a C-terminális régió, mely a transzkripció aktivációjában és a transzkripciós faktor – komplexek kialakításában játszik szerepet (Reichman és Meyerowitz, 1997; Becker és Theissen, 2003; Pařenicová és mts., 2003; Kaufman és mts., 2005).



4. ábra: A MIKC-típusú *MADS*-box fehérjék szerkezeti felépítése. A *MADS*-domén egy, a DNS megkötésért felelős α -hélixből és két antiparalell lefutású β -lemezből áll. A K-domént feltehetően három amfipatikus α -hélix alkotja (K1, K2, K3). Az ábra felső részén található számok egyes aminosavak pozícióját, a háromszögek pedig az intronokat jelölik (Forrás: Kaufman és mts., 2005.)

3.3.2.2. A DAM transzkripciós faktorok szerepe a nyugalmi állapot szabályozásában

A *Rosaceae* családban a *Prunus* fajok esetében őszibaracknál igazolták először a DAM gének szerepét a rügynyugalom kialakításában egy olyan, ún. „evergrowing” (*evg*) mutáns segítségével, melynek merisztémaszövevei állandóan osztódnak, és sem a nappalhossz rövidülése, sem a hőmérséklet csökkenése nem tudja kiváltani a növekedés leállítását, vagyis a növény képtelen nyugalmi állapotba kerülni. Bielenberg és mts. (2008) összehasonlító géntérképezést végeztek az *evg* és a vad típusú, normál növekedésű növények genomjának egy 132 kb hosszúságú régióján. Összesen tizenkilenc gént azonosítottak, melyből hat *MADS-box* típusú gén hiányzott az *evg*-típus genomjából. Feltételezték tehát, hogy ez a hat gén lehet többek között felelős a növekedés leállításáért és a rügynyugalom kialakításáért, hiányuk miatt pedig a mutációt hordozó növények erre nem képesek.

A DAM gének pontos funkcióinak feltérképezésére Li és mts. (2009) őszibarackon végeztek szövetspecifikus génexpressziós vizsgálatokat vegetatív hajtás (szár, hajtásrügy, levél), valamint virág- és gyümölcsmintákból származó cDNS-sel. Ennek során azt tapasztalták, hogy az egyes gének kifejeződésének helye eltérő, expressziós szintjük pedig a vegetációs időszak során változik, ami összefüggésben lehet a fotoperiódus változásával. Szabályozott körülmények között, mesterséges megvilágítás mellett kimutatták, hogy a *DAM2* gén kifejeződését mérsékli, még a *DAM1*, 4, 5 és 6 génekét növeli a nappalhossz csökkenése. A *DAM1*, *DAM2* és *DAM4* gének expressziós szintjének alakulása a tenyészidőszak során összhangban volt a növekedés leállításával, majd a virágrügy-berakódás folyamatával.

Yamane és mts. (2011a; 2011b) további kísérletek során az őszibarack *DAM5* és *DAM6* gének szerepére összpontosítva összefüggést tapasztaltak e két gén transzkripciós szintjének változása, valamint a rügynyugalom indukciója és megszűnése között. Megfigyelték, hogy a virágrügyek mélynyugalmi állapota két fázisra osztható: a virágszerv-differenciálódásra és azt követő stádiumra, ahol a virágszerv fejlődés átmenetileg gátolt, feltehetően a *DAM5-6* gének hatásának köszönhetően. Ez a gátlás meghatározott időtartamú hidegkezelés hatására szűnik meg, ami kiváltja a két DAM gén expressziós szintjének csökkenését. Ebből kiindulva valószínűsíthető, hogy e két DAM gén szerepe a virágszerv-fejlődés gátlásában, ezáltal a nyugalmi időszak fenntartásában lehet. Horvath és mts. (2010) a kutyatejből származó *DAM1* gént transzgenikus lúdfű vonalban kifejeztetve megfigyelték, hogy a transzformáns növények a vad típushoz képest később kezdenek virágozni. Ennek alapján a DAM gének feltehetően az *FT* gének gátlásával „kényszerítik” a növényt nyugalmi állapotba. Az elméletet alátámasztja, hogy az őszibarack DAM gének homológjai az *Arabidopsis* *SVP* és *AGL24* génjeinek, melyek gátolják egyes virágszerv-identitás gének expresszióját (Gergis és mts. 2009). Korábban japán kajsz

(*Prunus mume* Sieb. et Zucc) esetében már feltételezték a *DAM5* és *DAM6* gének rügynyugalom kialakításában játszott szerepét (Yamane és mts. 2008). A *P. mume* genomjában azonosított *DAM6* gén szekvenciája pedig több mint 90%-ban egyezett az őszibarack cDNS könyvtárból származó *DAM6* génnel (Yamane és mts. 2008). Prudencio és mts. (2018) a mandula (*P. dulcis* Mill.) *DAM6* gén (*PdDAM6*) szekvenciáját azonosították, melynek expressziós vizsgálata szintén alátámasztotta a mélynyugalom szabályozásában betöltött szerepét.

Más *Rosaceae* fajokból is azonosítottak már DAM transzkripciós faktorokat kódoló géneket. Japán körte (*Pyrus pyrifolia* Nakai) esetében három *MADS-BOX* típusú gén (*MADS13-1*; *MADS13-2* és *MADS13-3*) expressziója összhangban volt a rügynyugalom kialakulásával és megszűnésével. A *MADS13-1* gén kifejeződésének gátlásához megfelelő mennyiségű hideghatásra volt szükség. Emellett különbség mutatkozott a rövid és a hosszú hideghatást igénylő körtefajták genomjának *DAM* géneket kódoló régiójában (Saito és mts., 2013). Niu et al (2015) eredményei alapján a japán körtéből azonosított DAM proteinek a virágzást szabályozó egyik *FT*-gén (*PpFT1*) transzkripcióját gátolják. Almában négy *DAM*-típusú szekvenciát (*MdDAMa*, *-b*, *-c* és *-d*) azonosítottak, melyek közül az *MdDAMa* génnek tulajdonítottak szerepet a nyugalmi állapot szabályozásában. Filogenetikai vizsgálattal arra is rámutattak, hogy a *DAM* gének igen egyedi klasztert alkotnak a *Rosaceae* családon belül (da Silveira Falavigna és mts., 2014; Mimida és mts., 2015). További növényfajoknál, mint a kivi (*Actinidia* spp.) és a nyírfa (*Betula pendula* Roth.) is igazolták már a DAM transzkripciós faktorok nyugalmi állapot szabályozásában betöltött szerepét (Elo és mts., 2001; Wu és mts., 2012).

3.3.3. A hideghatás által indukált génkifejeződés szabályozása növényekben

A növények az egyes környezeti tényezők változásaira bonyolult jelátviteli hálózatok segítségével reagálnak, az alacsony hőmérsékleti stresszválasz esetén sincs ez másként. A CBF-fehérjék által felismert *CRT/DRE* elem számos hideg- és szárazság-stresszre indukálható gén promóter régiójában megtalálható, melyeket összefoglaló néven *CBF*-regulonnak nevez a szakirodalom (Stockinger és mts., 1997; Liu és mts., 1998). Ide tartoznak többek között a dehidrin-fehérjéket kódoló gének, melyek vízvesztéses stressz által indukálhatók. A nyugalmi időszak alatt a növények sejtjeiben a dehidratáció két okból kifolyólag is bekövetkezhet: egyrészt az áttelelő szervek víztartalma és ozmotikus potenciálja jelentősen csökken, másrészt fagy hatására a citoplazma víztartalma átáramlik az extracelluláris térbe. Ez a folyamat a nyugalmi állapot természetes velejárója, és a sejten belüli jégképződés megakadályozásában van szerepe. A dehidrin fehérjék pontos működése még tisztázatlan, de bizonyított, hogy fontos szerepet töltenek be a kiszáradás elleni védelemben, ezáltal a hideg- és fagytoleranciában is

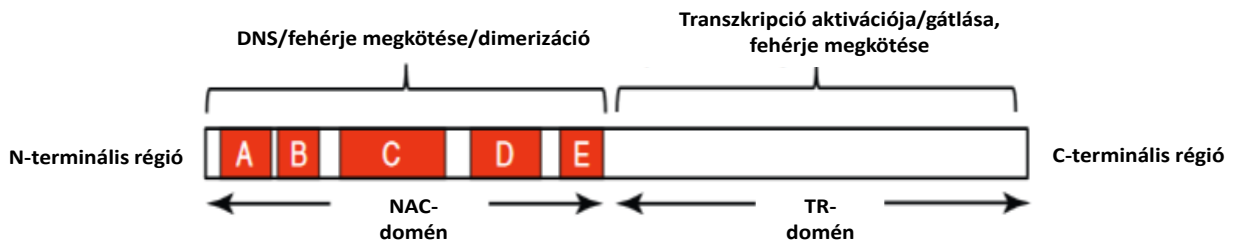
(Welling és Palva, 2006). A már részletesen bemutatott *Rosaceae DAM* gének promóter-régiója is tartalmaz egy olyan konzervált elemet, amely homológ a *CBF*-kötőhellyel (Wisniewski és mts., 2011; Mimida és mts., 2015; Zhao és mts., 2018). A *DAM*- és *CBF*-gének transzkripció aktivitása hasonló mintázatot mutatott a nyugalmi időszak alatt japán körte (Niu és mts., 2015) és japán kajszli (Zhao és mts. 2018) esetében is.

Számos olyan szabályozó elem jelenléte is bizonyított, melyek magukat a *CBF*-gének működését befolyásolják. Ilyen az ún. *ICE1*, amely az *Arabidopsis CBF3* indukciójáért felelős, vagy a *LOS2* és *SFR6* fehérjék, melyek erősítik, ill. a *HOS1*, ami gátolja a *CBF*-gének transzkripcióját. Ez utóbbi egy olyan RING-finger motívumot tartalmaz, mely valószínűleg a *CBF/DREB* proteinek degradációját teszi lehetővé. A *FRY2* egy transzkripció represszor, mely a *CBF* gének upstream szabályozó régiójában fejt ki hatását (Yang és mts., 2005; Alisoltani és mts., 2015).

Az előbb felsorolt elemek működését a hőmérséklet szabályozza, ezen kívül azonban fontos még egyéb tényezőket is megemlítenünk. Az abszcizinsav (ABS) mint stresszhormon serkentő hatással volt az *Arabidopsis CBF4* gén expressziójára, hidegkezelés nélkül is indukálva az általa szabályozott *COR* gének működését. Kim és mts. (2002) lúdfüvel végzett kísérletei kimutatták, hogy alacsony hőmérsékleten a fény konstitutív módon serkenti a *CBF1-3* és a *cor15a* gének expresszióját. Ezáltal igazolták, hogy a *CBF* transzkripció faktorok a fitokróm-B által szabályozott fény-jelátviteli út elemeiként is funkcionálnak. A cirkadián óra szintén befolyásolja a *CBF*-gének aktivitását, mint ahogy azt Harmer és mts. (2000) kísérletei is igazolták *Arabidopsis* esetében.

3.3.4. A *NAC* transzkripció faktorok bemutatása

A *NAC* transzkripció faktorok az egyik legnagyobb növény-specifikus fehérjecsaldót alkotják, a szárazföldi növényekben általános a jelenlétük. Felfedezésük óta csak a lúdfüben több mint száz *NAC*-típusú gént azonosítottak (Reichmann és mts., 2000). A rövidítés három olyan fehérje nevéből származik (*NAM*, *ATAF1,2*, *CUC2*), melyek hasonló szerkezetű DNS-kötő elemet tartalmaznak (Souer és mts., 1996; Aida és mts., 1997). A *NAC* transzkripció faktorok közös szerkezeti eleme az N-terminális régió található, igen konzervált *NAC*-domén, mely kb. 150 bázispár hosszúságú, és többféle funkcióval rendelkezhet (DNS vagy fehérje megkötése, dimerizáció), melyet az egyes szubdoménok határoznak meg (5. ábra). A C-terminális régió változékonyabb, és nem tartalmaz semmilyen ismert protein-domént, habár gyakran előfordulnak benne egyszerű aminosav-ismétlődések, és nagy mennyiségben tartalmaz szerin, treonin, prolin és glutamin aminosavakat (Aida és mts. 1997; Ooka és mts., 2003, Puranik és mts., 2012).



5. ábra: Egy NAC protein általános szerkezeti felépítése. A NAC-domén további öt szubdoménra osztható (A – E, pirossal jelölve). Az erősen konzervált, pozitív töltésű C és D szubdomén a DNS megkötéséért felelős, még az A domén egy funkcionális dimer kialakításában vesz részt. A változékonyabb B és E szubdoménok feltehetően a NAC gének funkcióbeli változatosságát határozzák meg. A diverzebb C-terminális régió elsősorban transzkripciós regulátorként (TR- domén) működik, olykor fehérje-megkötő funkcióval kiegészülve (Forrás: Puranik és mts., 2012.)

3.3.4.1. A NAC transzkripciós faktorok szerepe a növényi fejlődési folyamatokban

A NAC gének fejlődési folyamatokban betöltött meghatározó szerepét elsőként abnormális növekedésű petúniahibrideken bizonyították. Ezek a mutáns növények recesszív homozigóta formában hordozzák a *nam* (*no apical meristem*) gént, melynek következtében hajtásaikban nem fejlődik apikális merisztémaszövet (Souer és mts., 1996). Hasonló rendellenességet figyeltek meg a lúdfű ún. ‘cup-shaped cotyledon’ mutánsain, ahol a *CUC1-2* gének mutációja következtében a csúcs-merisztéma mellett a sziklelevél is hiányosan alakul ki. A vizsgált *CUC* gének szintén NAC- típusú transzkripciós faktorokat kódolnak, működésük elengedhetetlen a hajtás csúcs osztódószövet kialakulásához és az embrió normális fejlődéséhez (Aida és mts., 1997; Aida és mts., 1999). Egy másik *Arabidopsis* NAC fehérje a virágszervek kialakításában vesz részt és aktiválásához két *MADS-box* gén (*APETALA 3* és *PISTILLATA*) szükséges (Sablowski és Meyerowitz, 1998). Az *Arabidopsis NAC1* génje az oldalgyökerek kialakításában játszik szerepet, és expresszióját az auxin hormon indukálja (Xie és mts., 2000).

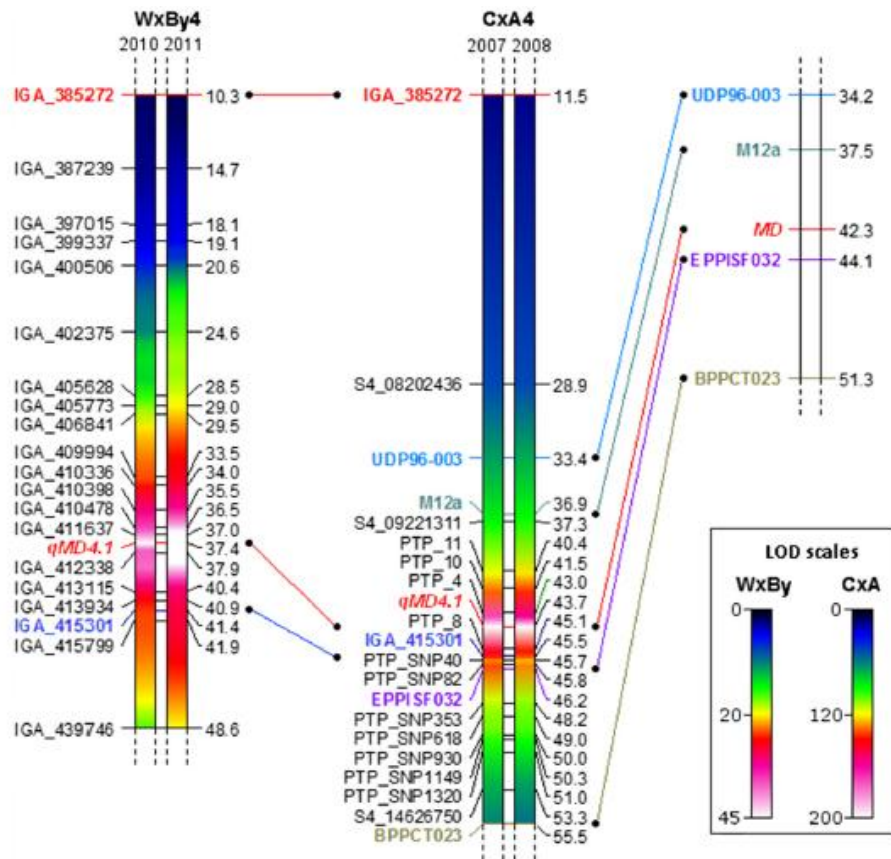
A NAC transzkripciós faktorokkal kapcsolatos kutatások jelentős része a hormonokhoz kapcsolt stressz-válaszreakciókban betöltött szerepüket vizsgálja. Az *Arabidopsis ATAF1* volt az első azonosított NAC gén, ám funkcióját csak nemrégiben írták le: az abszcizinsav által vezérelt szárazságstressz gének negatív regulátoraként működik (Lu és mts., 2007). Az *Arabidopsis NAC1* az auxin alapú válaszreakciót szabályozza, és az oldalgyökerek fejlődésében van szerepe (Xie és mts., 2000). Egy másik NAC-típusú gén túltermeltetése növelte a szárazság- és sótűrést rizs növényben (*Oryza sativa* L.) (Hu és mts., 2008). Az öregedés (szeneszcencia) folyamata által kiváltott oxidatív stressz hatására megnő a növényi sejtek szalicilsav-koncentrációja, ami

aktiválja az ún. *SAG* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENES*) gének expresszióját (Morris és mts., 2000). Az *Arabidopsis* NAC016 fehérjéje felgyorsítja a levélöregedés folyamatát azáltal, hogy stimulálja a *SAG* gén transzkripcióját (Kim és mts., 2013). A NAC-típusú gének közreműködése a patogének elleni rezisztencia kialakításában is több növényfajban bizonyított, úgymint a szója (de Sá és mts., 2012), a kukorica (Voitsik és mts., 2013) vagy a szőlő (Wang és mts., 2013). Számos, különböző stresszválaszban szerepet játszó NAC gén mutat hasonló expressziós mintázatot, ami arra enged következtetni, hogy egy gén akár több folyamatban is közreműködhet (Hickman és mts., 2013; Sun és mts., 2015).

3.3.4.2. A NAC transzkripciós faktorok szerepe a gyümölcsérés szabályozásában

A közelmúltban kísérleti eredményekkel igazolták, hogy a NAC fehérjék a termés- és gyümölcsérés folyamatának szabályozásában is részt vesznek. A klimaktérikus termések, mint a paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.), a banán (*Musa* spp. L.), és a csonthéjas gyümölcsfajok esetében fokozott etiléntermelés szükséges a megfelelő éréshez (Lelièvre és mts., 1997). A paradicsom különböző érési mutánsainak (pl. *rin* - *ripening inhibitor*, *nor* - *nonripening*, és *cnr* - *colorless nonripening*) vizsgálata hasznos információkkal szolgált az etilénhez kapcsolt jelátviteli molekuláris hálózatokról (Moore és mts., 2002; Manning és mts., 2006; Giovannoni, 2004; Martel és mts., 2011). Számos transzkripciós faktor kontrollálja ezt a folyamatot, melyek közül a *NOR* gének NAC-típusú fehérjéket kódolnak, és interakcióba lépnek egy másik, MADS-box típusú transzkripciós faktorról (Martel és mts., 2011). Banánban hat NAC-típusú fehérjét azonosítottak, melyek közül a *MaNAC1* és 2 gén kifejeződése az etilén által szabályozott, és a növekedésszabályozó anyag koncentrációjának növekedésével együtt nő az expressziós szintjük. Ezenfelül közvetlen kapcsolatba lépnek több *EIN3* (*ethylene-insensitive 3*) típusú fehérjével, melyek az etilén-jelátviteli út fő regulátorai a gyümölcsérés során (Shan és mts., 2012).

Őszibarackban azonosítottak egy szekvenciát (*ppa008301m*) az érési időhöz kötődő, 4-es kapcsoltságú csoporton található QTL-en belül (qMD4.1 lókuszt), mely egy NAC transzkripciós faktort kódol (Dirlewanger és mts., 1999; Quilot és mts., 2004; Eduardo és mts., 2011) (6. ábra).



6. ábra: Az őszibarack 4. kapcsoltsági csoportjának összehasonlítása a Pirona és mts. (2013) által végzett kísérletben használt térképező populációk között, melyek a ‘NJ Weepy’ × ‘Bounty’ (W×By) és a ‘Contender’ × ‘Ambra’ (C×A) keresztezésekből származtak. A színes vonalak a két populáció összehasonlítására használt SNP-markereket jelölik. Az ábra jobb felső sarkában a 4-es kromoszóma kiemelt régiója található, rajta a *ppa008301m* szekvenciáról származó *qMD4.1* genetikai marker pozíciója pirossal szerepel. Baloldalt a markerek neve, jobb oldalt a genetikai távolság (cM) van feltüntetve (Forrás: Pirona és mts., 2013).

A vizsgált *Prunus persica NAC1* gén szekvenálása során egy 9 bázispárnyi in-frame inszerciót fedeztek föl, melynek következménye a C-terminális régióban található három aminosav (treonin, aszparaginsav és prolin) tandem duplikációja (7. ábra). Az allél együtt öröklődött a korai érésidővel a kísérletben vizsgált F2 populációkban: a korai érésű egyedek az inszerciót tartalmazó allélt hordozták, a kései érésűek pedig az eredeti, referenciagenomban (Verde és mts., 2013) megtalálható allélt. A három aminosav duplikációjával járó szerkezetmódosulás feltehetően hatással van a fehérje funkciójára is, ám ennek feltérképezéséhez további vizsgálatok szükségesek. A *PpNAC1* gén allélvariációi azonban jó eséllyel használhatók funkcionális markerként nemesítési programokban, érési időre történő szelekcióhoz (Pirona és mts. 2013).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5      15      25      35      45      55
ppa008301m_WT  MGVPETDPLS QLSLPPGFRF YPTDEELLVO YLCRKVAGYQ FSLQIIAEID LYKFDPWVLP
ppa008301m_MUT MGVPETDPLS QLSLPPGFRF YPTDEELLVO YLCRKVAGYQ FSLQIIAEID LYKFDPWVLP

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65      75      85      95      105     115
ppa008301m_WT  SKAIFGEKEW YFFSPRDRKY PNGSRPNRVA GSGYWKATGT DKIITEGRK VGIRKALVFI
ppa008301m_MUT SKAIFGEKEW YFFSPRDRKY PNGSRPNRVA GSGYWKATGT DKIITEGRK VGIRKALVFI

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125     135     145     155     165     175
ppa008301m_WT  VGRAPKGTKT NWIMHEYRLI EPSRKNSSK LDEWVLCRIY KKSSSSAAQK PMTTSVSSKE
ppa008301m_MUT VGRAPKGTKT NWIMHEYRLI EPSRKNSSK LDEWVLCRIY KKSSSSAAQK PMTTSVSSKE

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185     195     205     215     225     235
ppa008301m_WT  HSNQSSSSCS SQLDDVLEWL PDIDDRCTL PRINSLKTLO QQQEDSKLGL AGLNVVPELC
ppa008301m_MUT HSNQSSSSCS SQLDDVLEWL PDIDDRCTL PRINSLKTLO QQQEDSKLGL AGLNVVPELC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245     255     265     275     285     295
ppa008301m_WT  PNNQPQQSQG QMNVNYSNND MYVPSIPPLC HVESPPERLA KTVDEEVQSG FRTQRVDNSG
ppa008301m_MUT PNNQPQQSQG QMNVNYSNND MYVPSIPPLC HVESPPERLA KTVDEEVQSG FRTQRVDNSG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305     315     325     335
ppa008301m_WT  FFCNSNVMTQ NFCNETDP~~ ~YGYSNRLGR SGLGFGGAEK
ppa008301m_MUT FFCNSNVMTQ NFCNETDPTD YGYSNRLGR SGLGFGGAEK

```

7. ábra: A *ppa008301m* szekvencia (*PpNAC1* gén) kétféle allélvariációjának illesztése aminosav-sorrend alapján. A *ppa008301m_WT* a 'Lovell' referencia allél, a *ppa008301m_MUT* pedig az inszerciót tartalmazó allél jelöli. A két allél esetén eltérő kópiaszámú aminosav-tripletet piros keret jelöli. A fekete keret a NAC-domén helyzetét mutatja. (Forrás: Pirona és mts., 2013).

A *PpNAC1* interakcióba lép egy másik, az őszibarack vörös hússzínét kialakító, szintén NAC-típusú (BL – blood flesh) transzkripciós faktorról. A BL-fehérje heterodimert képez a *PpNAC1*- fehérjével, aktiválva ezzel az antocián-felhalmozódást szabályozó *PpMYB10.1* transzkripciós faktort az érés késői szakaszában (Zhou és mts., 2015). Korábban Blake (1932) már megállapította, hogy a vérbarack fenotípus kapcsoltságot mutat a kései érésidővel, amit az újabb QTL-térképezéssel kapcsolatos kutatások megerősítettek (Werner és mts., 1998; Quilot és mts., 2004; Shen és mts., 2013).

A *PpNAC1* gén gyümölcsérésben betöltött szerepét Eduardo és mts. (2015) eredményei is alátámasztják. Egyes nektarin-jellegű őszibarackok utódai között megjelennek az ún. SR (*slow ripening*) genotípusok, melyekre jellemző, hogy kevesebb etilén és szén-dioxid termelődik az érés során, így a gyümölcsök lassan érnek, és gyakran még lombhullás után is a fán maradnak (Brecht és mts., 1984). Gyümölcsstermesztés szempontjából ez egy nemkívánatos tulajdonság, melyet az *Sr*-gén határoz meg. A recesszív homozigóta egyedek mutatják a késleltetett gyümölcsérést, és minőségben (íz, aroma, húsállomány) jelentősen elmaradnak a normál érésű genotípushoz képest (Ramming, 1991). Két heterozigóta szülővonal keresztezéséből származó utódpopuláció térképezése során megállapították, hogy az SR és az érési időt kialakító QTL-ek a

4-es kapcsoltsági csoport azonos genomi régiójában található, mely magába foglalja a *ppa008301m* szekvenciát is. A lókuszra fejlesztett PCR alapú marker együtt öröklődött az SR-fenotípussal, és nem mutatott amplifikációt az *srsr* genotípusok esetében. Ennek alapján feltételezik, hogy ezen egyedek genomjában egy nagyobb kiterjedésű deléció található, mely a *ppa008301m* szekvenciát is érinti, így az is elképzelhető, hogy a *PpNAC1* gén fehérjetermékének hiánya okozza az SR-fenotípus kialakulását (Eduardo és mts., 2015).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált növényanyag

Az RNS-izoláláshoz és a qPCR vizsgálatokhoz a Szent István Egyetem (SZIE), Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék Soroksáron található kajszi génbankjából választottunk négy olyan fajtát, melyek virágzási ideje és fagyűrése a Tanszék korábbi megfigyelései alapján különbözik. Az USA-ból származó ‘Aurora’ (szin. ‘Early Blush’ és NJA 53) és ‘Goldrich’ (szin. ‘Sun Giant’) két gazdaságilag is jelentős, korai virágzású, kevésbé fagyűrő fajta. A szintén észak-amerikai eredetű ‘Stella’ és a közép-ázsiai ‘Zard’ mélynyugalma hosszabb, később virágoznak, és jobb fagyűréssel rendelkeznek (Szalay és mts., 2006; Milatovic és mts., 2013), ezenkívül számos betegséggel szemben ellenállóságot mutatnak, így nemesítési alapanyagként használhatók. Minden fajtából 3-3 fát választottunk ki, melyek egyéves vesszőiről november és március között több időpontban virágrügyeket gyűjtöttünk két, egymást követő évjáratban. A mintákat a gyűjtést követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, és a feldolgozásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az őszibarack genomi DNS-minták izolálásához a növényanyagot a SZIE Kertészettudományi Kar Kísérleti Üzem és Tangazdaságának ültetvényéből (Budapest, Soroksár), a Nemzeti Élelmiszerlánc-Biztonsági Hivatal (NÉBIH) Növénytermesztési és Kertészeti Igazgatóság Tordasi Növényfajtakísérleti Állomásáról, valamint a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK), Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet érdei kutatóállomásáról szereztük be. Vegetatív rügyeket gyűjtöttünk 2015 novembere és 2016 februárja között 125 olyan fajtáról, melynek érési idejéről pontos adat állt rendelkezésre. A vizsgált őszibarackfajták legfontosabb pomológiai tulajdonságait az M.2.1. melléklet foglalja össze. A mintákat a feldolgozásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A rokon fajok vizsgálatához a Tanszéken rendelkezésre álló genomi DNS gyűjteményből választottunk mintákat (2. táblázat).

2. táblázat: Az őszibarack *PpNAC1* szekvencia-homológok vizsgálatához használt *Prunus* fajok

Faj	Fajta	Érési idő	Elemzés ¹
<i>P. cerasus</i>	Piramis	korai	Fl, S
<i>P. cerasus</i>	Érdi jubileum	középidei	Fl
<i>P. cerasus</i>	Korai pipacs	középidei	S
<i>P. cerasus</i>	Kántorjánosi 3	kései	S
<i>P. domestica</i>	Stanley	korai	Fl, S
<i>P. domestica</i>	President	kései	Fl
<i>P. dulcis</i>	Tuono	korai	Fl, S
<i>P. dulcis</i>	Tétényi kedvenc	korai	S
<i>P. dulcis</i>	Tétényi keményhéjú	kései	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Harmat	korai	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Szamarkandszkij rannij	korai	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Korai zamatos	korai	Fl, S
<i>P. armeniaca</i>	Ceglédi Piroska	középidei	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Ceglédi óriás	középidei	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Magyar kajszi C.235	középidei	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Pannónia	középidei	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Zard	középidei	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Pisana	kései	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Rózsakajszi C.1406	kései	Fl
<i>P. armeniaca</i>	Corlate (GNT 10/10)	kései	Fl, S
<i>P. armeniaca</i>	Kecs-psar	nagyon kései	Fl

¹FL: fragmentumhossz-analízis, S: részleges DNS- szekvenálás

4.2. DNS-kivonás

A genomi DNS izolálása az őszibarack, a kajszi és a vizsgálatba bevont rokon fajok esetében is vegetatív rügyekből történt a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával, a gyártó utasításait követve. A DNS-minták minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) ellenőriztük.

4.3. RNS-izolálás és reverz transzkripció

Kajszi virágrügyekből az összes RNS izolálását kb. 100 mg növényi szövetből kiindulva hajtottuk végre, a Jaakola és mts. (2001) által leírt módszert alkalmazva. Az RNS-minták minőségét és mennyiségét 1%-os TAE agaróz gélen, valamint NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Az RNS-mintákat a genomi DNS okozta szennyeződés eliminálása érdekében DN-áz I enzimmal kezeltük (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Mintánként 2 ng RNS-t használtunk a reverz-transzkripcióhoz a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitet (Thermo Fisher Scientific) és az ahhoz mellékelt oligo(dT)₂₀ primert alkalmazva, a gyártó utasításait követve.

4.4. PCR reakció és szekvencia-azonosítás

A kajszi *CBF* szekvencia izolálása genomi DNS-ből történ, míg a *DAM5-6* szekvenciák izolálásához virágrügyből származó cDNS mintákat használtunk. Az új kajsziszekvenciák izolálásához a szakirodalomban fellelhető, rokon fajokra (japán kajszi, mandula és őszibarack) tervezett primereket alkalmaztuk (3. táblázat). A PCR-reakció lépései a következők voltak: kezdeti denaturációs lépés (95 °C, 3 min.); amplifikáció: 94 °C; 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min (*35 ciklus), valamint egy kiegészítő lépés (72 °C, 5 min).

A *Prunus* *NAC*-szekvenciák izolálása genomi DNS-ből történt, melyhez a *NAC*-indel (inszerciót vagy delécióit tartalmazó) specifikus primert (Pirone és mts., 2013; forward: 5'-AGAACTCAGCGGGTTGATAACT-3'; reverse: 5'-TGCACCCCTACTCGATTCT-3') használtuk. A forward primer a *NAC* transzkripció faktor variábilis C-terminális régióját kódoló szakaszhoz kötődik. A reverz primer viszont a génszekvencia 3' UTR régiójához kötődik, tovább növelve ezzel a specifitását. A PCR reakció lépései Pirone és mts. (2013) alapján, néhány kisebb módosítással: kezdeti denaturációs lépés (95 °C, 2 min.); amplifikáció: 92 °C; 15 sec, 56 °C 30 sec és 72 °C 30 sec (*40 ciklus) és egy kiegészítő lépés (72 °C, 5 min).

3. táblázat: A *ParCBF1* és *ParDAM5-6* homológok azonosításához alkalmazott primerek

Faj	Primer neve	Szekvencia (5' → 3')	Szerző
<i>P. mume</i>	PmCBFa-F	AAACTCAAACAAGCTAAAACAC	Zhang és mts. 2012
	PmCBFa-R	ATAATCG-CTCGCACAAAT	
	PmCBFb-R	AGCTTTAGACTAAGACCTGC	
	PmCBFb-R	TTTTCTAT-TTGATCGACCTC	
<i>P. dulcis</i>	PdCBF-F	GCCCCAGTCGAGTTTGTGTC	Barros és mts. 2012
	PdCBF-R	AGCATTGCGATGGAGAAAGAAG	
<i>P. persica</i>	PpCBF1-F	AGGGCTTCTTCTTTCTCCAC-3'	Wisniewski és mts. 2011
	PpCBF1-R	AAATCTTTATGTTGACTCACTCA-3'	
	PpDAM5/1-F	GTCTCTCAAACCTGGGGCGTTA	Jiménez és mts. 2010
	PpDAM5/1-R	GATACAACACACAGTCACCCTCCC	
	PpDAM6/1-F	CCAACAACCAGTTAAGGCAGAAGA	Yamane és mts. 2011a
	PpDAM6/1-R	GGAAGCCCCAGTTTGAGAGA	
	PpDAM5/2-F	ATCTCCACCACCTGCAACAGT	
	PpDAM5/2-R	CTTCTTAACGCCCCAGTTTGAG	
	PpDAM6/2-F	TAATGTTGGAGGTGGAGGAGAA	
	PpDAM6/2-R	GGGAAGCCCCAGTTTGAGA	
	PpDAM5/3-F	CCCCGAAACCCACCAACGAAGATG	Bielenberg és mts., 2008
	PpDAM5/3-R	CAGCACTGTTGCAGGTGGTG	
	PpDAM6/3-F	CCAACAACCAGTTAAGGCAGAAGA	
	PpDAM6/3-R	GGAAGCCCCAGTTTGAGAGA	

A PCR reakció összetétele minden vizsgálat esetén a következőképpen alakult 25µL/minta végtérfogatra számolva: 20–50 ng templát DNS, 1X DreamTaq Green Buffer (Fermentas, Szeged, Magyarország), 4,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 mM primer és mts. és 0,75 U DreamTaq polimeráz (Fermentas, Szeged, Magyarország). A PCR-termékeket 1%-os TBE agaróz gélben választottuk szét (40 perc, 80 V) és etidium-bromidos festéssel, UV-fénnyel átvilágítva tettük láthatóvá, GeneRuler 100 bp, 100 bp Plus, illetve 1 kb méretmarker (ThermoFisher Scientific) mellett.

A PCR-termékeket pTZ57R/T plazmid vektorba klónoztuk az InsTAclone PCR Cloning Kit használatával, a gyártó leírása szerint (Thermo Fisher Scientific). A reakcióelegy 6µL 5X ligációs puffert, 3µL (55ng/µL) pTZ57R/T vektort, 1µL (5U/µL) T4 DNS-ligázt és 4µL PCR

terméket (20-50ng/ μ L) tartalmazott 30 μ L végtérfogatra számolva. A leghatékonyabb ligálás érdekében a mintákat egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A ligációs termékekkel JM109 kompetens sejteket transzformáltunk. Ennek során 7 μ L ligációs terméket adtunk 50 μ L kompetens sejthez, majd a mintát 20 percig jégen tartottuk, ezt követően pedig 45 sec hősokkot alkalmaztunk 42 °C-os vízfürdőben. Ezután a mintákat tartalmazó csöveket ismét jégre tettük (2 min.), majd hozzáadtunk 950 μ L szobahőmérsékletű LB folyékony táptalajt (pH 7.0; 10g/L Bacto-tripton, 5g/L Bacto-élesztő kivonat, 10 g NaCl) és 30 percig inkubáltuk 37 °C-on rázatva (150 rpm). A transzformáció sikerességét kék-fehér szelekcióval ellenőriztük. Mindegyik ligációs reakcióhoz készítettünk 1 db. ampicillin-tartalmú agar plate-et (7 g agar/1L LB, 100 μ g/ml ampicillin). Szélesztés előtt 100 μ L (100 mM) IPTG-t (0,5 mM) és 20 μ L (50mg/ml) X-galt oszlattunk szét az ampicillines plate felszínén és 30 percig 37 °C-on állni hagytuk. A transzformált sejt kultúrából 50-100 μ L mennyiséget oszlattunk szét egy agar plate-en, melyeket ezt követően egy éjszakán át (16-24 óra) inkubáltunk 37 °C-on.

A plazmidot tartalmazó fehér színű telepeket másnap leoltottuk masterplate-re (7g agar/1L LB, 100 μ g/ml ampicillin), majd a mintákkal kolónia PCR-t végeztünk. A kolónia PCR-elegy összetétele: 1X DreamTaq Green Buffer (Fermentas, Szeged, Magyarország), 4,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 mM M13 primer (forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'; reverse: 5'- AACAGCTATGACCATG-3'). A telepeket leoltás után pipettaheggyel a PCR-elegybe mostuk. A PCR során pozitívnak bizonyult (vagyis az inszertet tartalmazó) telepekről fogpiszkálóval óvatosan levettünk egy-egy fehér telepet a masterplate-ről, és 2 mL folyékony LB táptalajt és 2 μ L ampicillint (100 mg/mL) tartalmazó sterilizált üvegekbe helyeztük. Az üvegeket parafilmmel lezártuk, majd egy éjszakán át 37 °C-on rázattuk (250 rpm). A baktérium-szuszpenzióból a GeneJET™ Plasmid Miniprep Kittel (Thermo Fisher Scientific) izoláltuk a plazmid DNS-eket. A szekvenálás az ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) automata DNS-szekvenátor használatával történt (BAYGEN Intézet Szekvenáló Platform, Szeged). Minden esetben három-négy klón szekvenciáját határoztattuk meg mindkét irányból.

A *Prunus NAC*- szekvenciák fragmentumhossz-analíziséhez fluoreszcens festékkel jelölt forward primert használtunk (NAC-indelF, 526-FAM). A fragmentumméret detektálása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) használatával történt (Biomi Kft., Gödöllő). Az adatok elemzéséhez az ABI Peak Scanner 1.0 programot használtuk GS500 LIZ méret-standarddal.

4.5. A *CBF*, *DAM5* és *DAM6* gének expressziós vizsgálata kajsziiban

A *P. armeniaca* *CBF*- és *DAM5-6* gének expressziójának mértékét real-time PCR-rel vizsgáltuk (Bio-Rad CFX96 Touch real-time PCR készülék, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a reakcióhoz a qPCRBIO SyGreen Blue Mix qPCR kitet használtuk (PCR Biosystems Ltd., Egyesült Királyság). Egy reakció 5 μ L 1x SyGreen Blue Mixet, 0,2 mM forward és reverse primert és 1,5 ng cDNS templátot tartalmazott 10 μ L végtérfogatra számolva. A PCR reakció hőmérsékleti profilját következőképpen határoztuk meg: 95 °C, 3 min; 95 °C; 5 sec, 60 °C 25 sec (lánc hosszabbítással együtt) *40 ciklus; az olvadási görbék meghatározásához 65 °C \rightarrow 95 °C, 0,5 °C-onként emelkedve. A reakcióhoz használt, az újonnan meghatározott *ParCBF1*, *ParDAM5* és *ParDAM6* szekvenciákra tervezett specifikus primereket a 4. táblázat foglalja össze. Referencia génnek az aktint választottuk.

4. táblázat: A *ParCBF1* és *ParDAM5-6* gének expressziós vizsgálatához tervezett primerek

Primer	Szekvencia (5' \rightarrow 3')	Tapadási hőmérséklet (°C)	Termék hossza (bp)
qACT F	GTGCCTGCCATGTATGTTGCCA	60	226
qACT R	CAGTGGTGGTGAACATGTACCCYC		
qCBF F	GGCTACTTGAAC TGGGATGACATG	60	104
qCBF R	ACACAAACAAATACATGATTGAC		
qDAM5 F	GCTTATGGATCCGGAGAGGCTGAATA	60	101
qDAM5 R	CAGCACTGTTGCAGGTGGTGGAGATA		
qDAM6 F	GTTTGTGGAGCCGGAGACGTTGATT	60	100
qDAM6 R	GCAGCTGGTGGAGGTGGCAATTTGG		

Az egyes vizsgálati időpontokban a mintagyűjtés mind a négy fajtánál három biológiai ismétléssel történt. A real-time PCR reakcióhoz minden mintából 3–3 technikai ismétlést alkalmaztunk. Az eredmények kiértékelése a real-time PCR készülék gyártója által biztosított Bio-Rad CFX Maestro szoftverrel történt, az ábrázoláshoz a Microsoft Office 2010 Excel programcsomagot használtuk. A génexpresszió relatív szintjét meghatározó, ún. „fold change” értékeket a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számítottuk ki (Bookout és Mangelsdorf, 2003).

4.6. Bioinformatikai elemzések

A *NAC*, *CBF*- és *DAM5-6* DNS-szekvenciák homológvizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (Altschul és mts., 1990), valamint a MegaBLAST algoritmust használtuk (Morgulis és mts., 2008). A szekvenciák illesztéséhez a MEGA6 (Tamura és mts., 2013) programot, az illesztések grafikai bemutatásához és a százalékos szekvencia-egyezés értékének meghatározásához pedig a BioEdit 7.2.0. programot (Hall, 1999) alkalmaztuk. A realtime PCR-hez tervezett primereket az Oligoanalyzer 3.1 (www.idtdna.com) program segítségével ellenőriztük. A *CBF*- és *DAM* transzkripciós faktorok jellegzetes fehérje-motívumainak térszerkezeti modellezéséhez a SWISS-MODEL-t használtuk (Arnold és mts., 2006). A modell minőségi ellenőrzéséhez a Global Model Quality Estimates és a Qualitative Model Energy Analysis módszereket alkalmaztuk (Benkert és mts., 2008).

A különböző fajokból származó *CBF* és *DAM* szekvenciák közötti evolúciós kapcsolat ábrázolásához filogenetikai vizsgálatot végeztünk a legnagyobb valószínűség (Maximum Likelihood) módszert alkalmazva, mely a Jones-Taylor-Thornton mátrixon alapul (Jones és mts., 1992). Az elemzés összesen 27 aminosav szekvenciát foglalt magába, a végső adatbázisban 280 pozíció szerepelt. A törzsfán az egyes elágazások szignifikanciájának jellemzésére bootstrap-analízist végeztünk (Felsenstein, 1985) 1000 darab véletlenszerűen előállított pszeudoszekvencia használatával. A 80%-nál nagyobb bootstrap-támogatottságot mutató kládokat tekintettük statisztikailag megbízhatónak. Az elemzést a MEGA5.1 (Tamura és mts., 2011) program segítségével végeztük el.

4.7. Statisztikai vizsgálatok

4.7.1. A real-time PCR eredmények statisztikai értékelése

A real-time PCR eredményeket a három biológiai párhuzamos átlagaként fejeztük ki. A normalitás vizsgálatot követően egytényezős ANOVA vizsgálatot és Duncan-féle tesztet végeztünk ($P < 0,05$) a szignifikáns különbségek meghatározására. Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 13.0 (SPSS INC., Chicago, IL, USA) programcsomag segítségével végeztük el.

4.7.2. A vizsgált őszibarack fajták *NAC*-genotípusa és érési ideje közötti összefüggés meghatározása

Az őszibarack *NAC*-genotípusok és az érési idő közötti összefüggést statisztikai elemzéssel támasztottuk alá, amihez khí-négyzet próbát alkalmaztunk. A *NAC* genotípus és az

érési idő is kategorikus értékek, így az adatokat egy 3x3-as kontingencia táblázatban ábrázoltuk a következőképpen: a három genotípus-kategóriához (két homozigóta – 192/192 és 201/201 és egy heterozigóta – 192/201) három érési idő kategóriát alakítottunk ki a Julián-napokban megadott adatok alapján: korai (165–203 Julián-nap), középidéjű (204–237 Julián-nap) és kései (238–274 Julián-nap).

Az eloszlás értékeinek kiszámításához a Cramér-féle V-tesztet használtuk: $(\chi^2/N)^{1/2}$ – ahol χ^2 a valószínűségi együttható, N pedig a vizsgált fajták száma. Ennek segítségével kiszámítható a NAC-genotípus és az érési idő közötti összefüggés mértéke a Goodman-Kruskal (λ) mérőszám alapján (<http://vassarstats.net/newcs.html>). A Cramér-féle V-teszt eredményét a következőképpen elemeztük: <0.10 = nincs kapcsolat; 0.10 – <0.20 = gyenge kapcsolat; 0.20 – <0.25 = közepes kapcsolat; 0.25 – <0.30 = közepesen erős kapcsolat; 0.30 – <0.35 = erős kapcsolat; 0.35 – <0.40 = nagyon erős kapcsolat; 0.40 – <0.45 rendkívül erős kapcsolat; 0.45 – <0.99 = a két változó összefügg egymással; 1.00 = a független változó tökéletesen meghatározza a függő változó értékét (Baker és mts., 2008). A kontingencia-táblázat értékeit a következőképpen számítottuk ki: a (megfigyelt gyakoriság – várt gyakoriság)/ várt gyakoriság * 100.

4.8. A hidegigény és a virágzási idő meghatározása

A soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság területén egy iMETOS® IMT200 (Pessl Instruments, Weiz, Ausztria) automata meteorológiai állomás található, mely óránként rögzíti a levegő hőmérsékletét egy PT100 1/3 Class B szenzorral ($\pm 1^\circ\text{C}$ -os hibahatárral). Az eszköz nyílt területen, az ültetvénytől légvonalban körülbelül 400 m-re helyezkedik el. Az ‘Aurora’, ‘Goldrich’, ‘Stella’ és ‘Zard’ hidegigényét az Utah modell (Richardson, 1974) és a dinamikus modell (Fishman és mts., 1987) felhasználásával határoztuk meg. A hidegghatás felhalmozódásának kezdetét attól az időponttól számítjuk, amikor a hidegghatás mutató adatok pozitív előjelűvé válnak, vagyis a hőmérséklet tartósan $12,5^\circ\text{C}$ alá esik. A mélynyugalom megtörésének idejét kajszi gallyak mesterséges virágoztatásával határoztuk meg (kb. 100 rügy/ág) Ruiz és mts. (2007) módszere alapján. A virágzás időpontjának azt az állapotot tekintettük, amikor a rügyek 50%-ából virág fejlődött.

4.9. A mikrosporogenezis vizsgálata

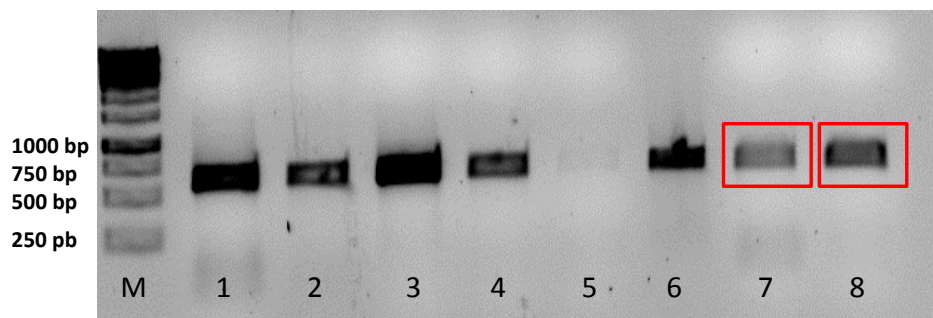
A négy kiválasztott kajszifajtáról a génexpressziós vizsgálatokhoz való mintagyűjtéssel egy időben a mikrosporogenezis tanulmányozásához is gyűjtöttünk virágrügyeket (fajtánként 8–10 rügy). Ezekből portokpreparátumokat készítettünk 2%-os kármin-ecetsav oldattal és Zeiss Axio Imager A2 típusú fénymikroszkóp (Carl Zeiss, Thornwood, New York, USA) alatt figyeltük meg a pollenfejlődés egyes szakaszait, melyeket Zeiss Axio Cam digitális kamerával dokumentáltuk 400× nagyításon. Mindkét évben négy fejlődési állapotot tudunk elkülöníteni: archespórium (differenciálatlan szövetállomány); meiózis előtti szakasz (a pollenanyasejtek kialakulása és elkülönülése); a meiózist követő négy utódsejtes tetrad állapot és a mikrosporák, illetve a fejlődő pollenszemek.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A kajszi CBF- és DAM5-6 szekvenciák izolálása

5.1.1. A ParCBF1 szekvencia azonosítása és jellemzése

A korán virágzó csonthéjas gyümölcsfák esetében a virágzás időpontja a termésbiztonság tekintetében meghatározó jelentőségű. A mélynyugalom kialakításának és megszűnésének hátterében álló néhány gén azonosítása több faj esetében megvalósult (pl. mandula, japán kajszi) (Bielenberg et al, 2008; Jiménez és mts. 2010; Yamane és mts. 2011a; Wisniewski és mts. 2011; Barros és mts. 2012; Zhang és mts. 2012). Munkánk célja az volt, hogy ezen gének homológ szekvenciáit azonosítsuk az európai kajszi (*P. armeniaca*) genomjában. A 'Korai zamatos' genomi DNS-éből egy 756 bp hosszúságú fragmentumot amplifikáltunk az őszibarackra tervezett, CBF-F jelű forward primer (Barros és mts., 2012) és a CBF1 R reverz primer (Wisniewski és mts., 2011) alkalmazásával (8. ábra).



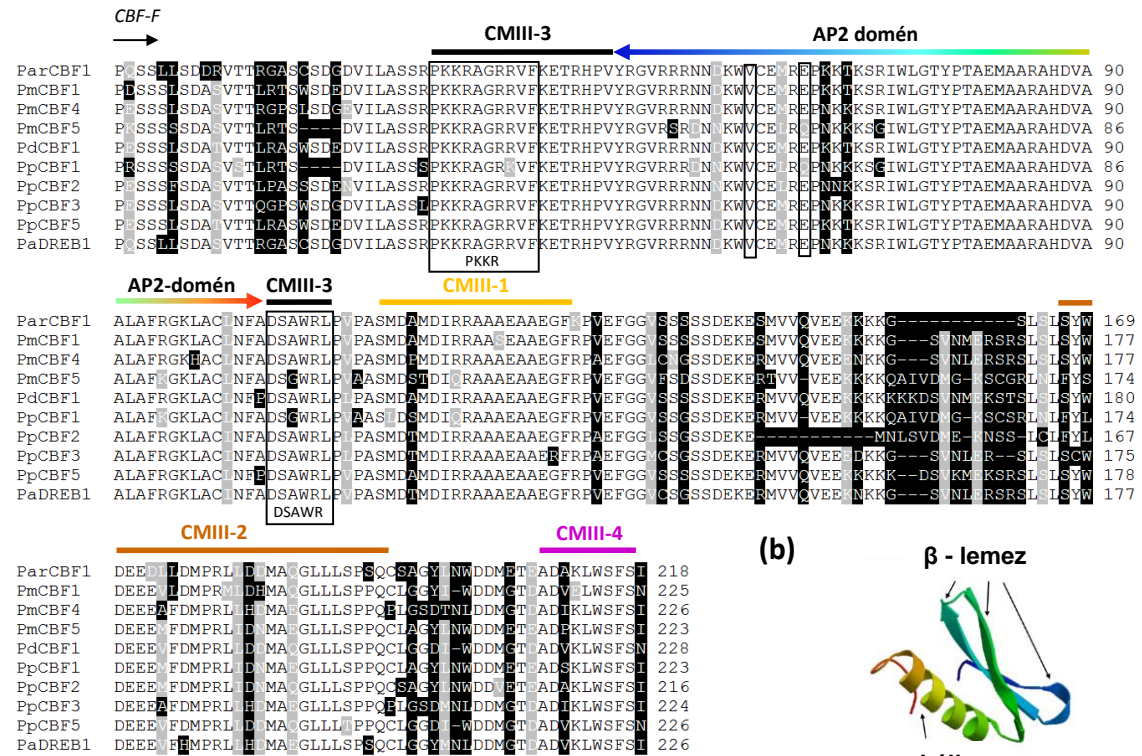
8. ábra: Az őszibarackra tervezett, CBF-F jelű forward (Barros és mts. (2012) és a CBF1 R reverz primer (Wisniewski és mts. 2011) használatával amplifikált, különböző *Prunus* fajokból származó PCR-termékek detektálása agaróz-gélelektroforézissel. A minták sorrendje: 1. *P. cerasus* 'Érdi jubileum', 2. *P. cerasus* 'Piramis', 3. *P. domestica* 'Stanley', 4. *P. domestica* 'President', 5. *P. dulcis* 'Tuono', 6. *P. dulcis* 'Tétényi keményhéjú', 7. *P. armeniaca* 'Zard', 8. *P. armeniaca* 'Korai zamatos'. Méretmarkerként a GeneRuler 1 kb DNA Ladder-t (Thermofisher Scientific) használtuk. A kajsziából származó, klónozott amplifikátumokat piros keret jelzi.

A fragmentum klónozását követően meghatároztattuk a DNS-szekvenciáját, majd a National Center of Biotechnology Information (NCBI) MegaBLAST algoritmusával végzett homológiavizsgálat során 29 olyan *Prunus* szekvenciát találtunk, melynek *E*-értéke nulla volt. Az újonnan azonosított szekvencia szignifikáns homológiát mutatott a CBF/DREB transzkripció faktor kódoló génekkel, a legnagyobb mértékű egyezést a *Prunus mume* CBF/DREB1 génje esetében kaptuk. A szekvencia az MH464453 azonosítószámmal került

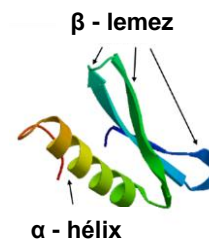
felvételre az NCBI GenBank adatbázisába. A felszaporított DNS-szekvencia tartalmazta a fehérjeszintézis végét jelző stop kodont, így a fehérjekódoló rész csak 654 bp méretű volt.

A prediktált aminosav szekvenciákat illesztettük az NCBI adatbázisban található számos rokon *Prunus* faj hasonló szekvenciájával (9. ábra). A *ParCBF1* szekvencia tartalmazza az erősen konzervált AP2 DNS-kötő domént és négy CMIII domént (CMIII1-4), melyek közül a CMIII1, 2, és 4 az AP2 domén után *downstream* irányban helyezkedik el, a CMIII3, mely magába foglalja a PKKR/PAGR és DSAWR motívumot, mind 3'-, mind 5' irányból szegélyezi azt. Az AP2 domén molekuláris szerkezetét (Ribbon – diagramját) a 9. (b) ábra szemlélteti. Az AP2 fehérjék közül egyedül az *Arabidopsis thaliana* AtERF1 fehérje (Protein Data Bank adatbázisbeli azonosítója: 1gcc) röntgenkristallográfiával meghatározott térszerkezete ismert (Allen és mts., 1998). Ezért a SWISS-MODEL (Arnold és mts., 2006) program által végzett modellezés során ezt használtuk templátként annak felderítése érdekében, hogy a fehérje aminosav-szekvenciájában található-e olyan régió, mely jelentősen torzítaná a funkcionálisan aktív térszerkezetet. A *ParCBF1* és az AtERF1 DNS-kötő domének közötti aminosav-szekvenciabeli egyezés 51,7%-os volt. A modell GMQE (Global Model Quality Estimates) értéke 0,76, míg QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) értéke -2,74 volt. A *ParCBF1* tehát nagymértékű egyezést mutat más *Prunus* fajokból származó *CBF* szekvenciákkal és minden olyan szerkezeti elem megtalálható benne, mely biológiai funkciója betöltéséhez szükséges.

(a)

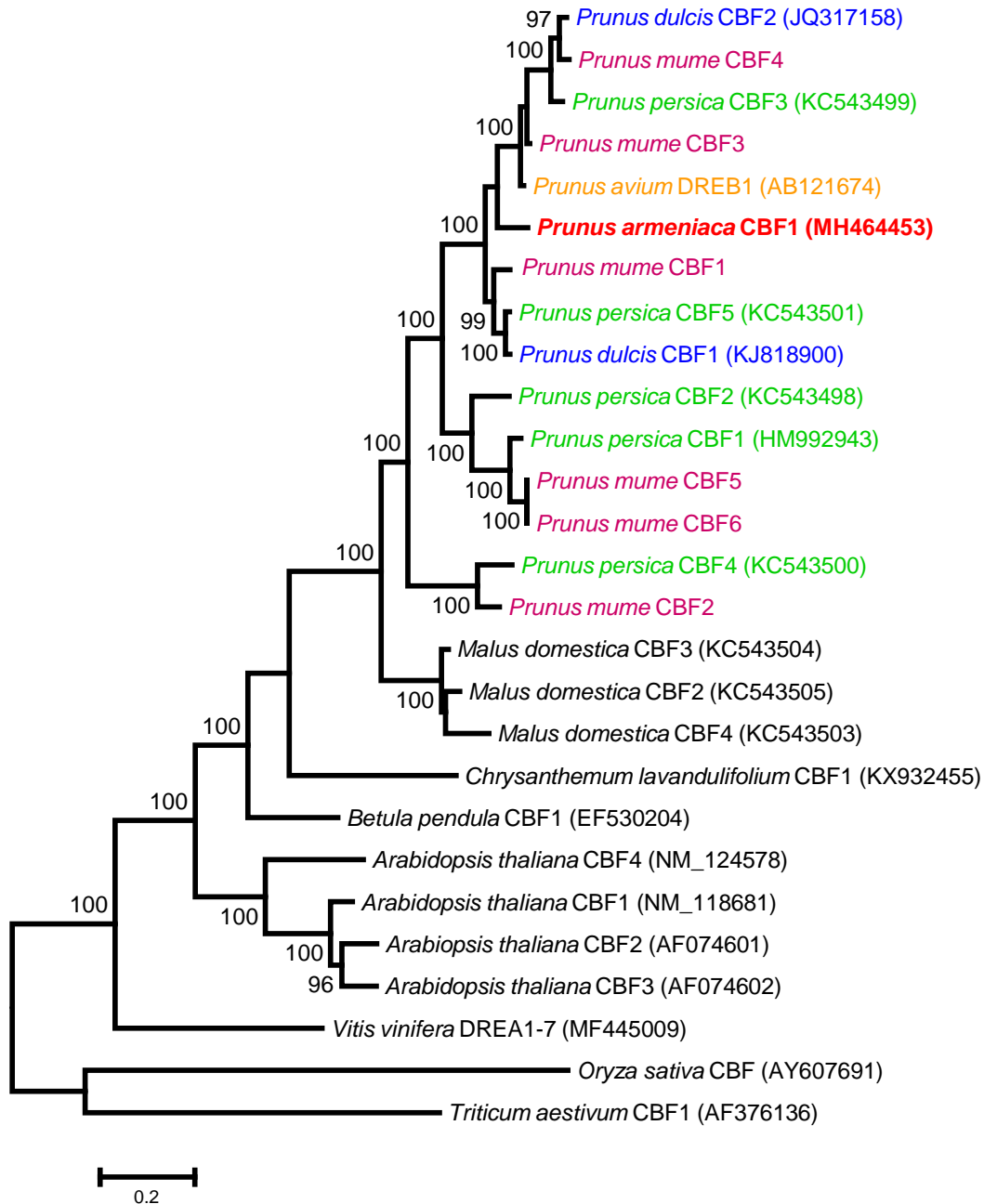


(b)



9. ábra: *Prunus* C-repeat binding factor (CBF) szekvenciák illesztése és a *Prunus armeniaca* CBF1 fehérje szerkezete. (a) A *P. armeniaca* CBF és más, rokon *Prunus* fajokból származó CBF gének részleges aminosav-szekvenciáinak illesztése. A szekvenciák végén található szám az aminosavak számát jelzi. A vonalak a szekvenciák méretbeli eltérése miatt az illesztés során keletkezett hézagokat jelölik. A fekete háttér az eltérő aminosavakat, a szürke háttér a konzervatív aminosav-cseréket mutatja. A PKKR/PAGR sejtmagi lokalizációs szignált és a DSAWR motívumot fekete keret jelöli. A CBF-re jellemző további szekvencia-részleteket a szekvenciák fölött látható narancssárga (CMIII-1), barna (CMIII-2), fekete (CMIII-3) és lila (CMIII-4) vonalak jelzik. Az AP2 DNS-kötő domént szivárványszínű nyíl jelöli, melynek színsorrendje megfelel a (b) ábrán látható szalagdiagram modell színezésének. Az AP2 doménen belül a DNS-kötő specifikusért felelős két fontos aminosavat (a 14. pozícióban lévő valint, és a 19. pozícióban található glutaminsavat) egy-egy keskeny keret jelöli. A szekvencia elején a magasabban elhelyezkedő fekete nyíl az amplifikáláshoz használt forward primerből származó szekvenciárészt jelöli. Az illesztésben ábrázolt CBF szekvenciák (génbanki azonosítószáma/a szekvenciát közlő irodalmi forrás) a következők voltak: *ParCBF1* (MH464453) (*P. armeniaca* L.); *PmCBF1*, *PmCBF4* és *PmCBF5* (*P. mume*) Zhao és mts., 2018 által publikálva; *PdCBF1* (KJ818900) (*P. dulcis*); *PpCBF1* (HM992943), *PpCBF2* (KC543498), *PpCBF3* (KC543499) és *PpCBF5* (KC543501) (*P. persica*); és *PaDREB1* (AB121674) (*P. avium*). (b) Az AP2 domén térszerkezeti modellje (<http://swissmodel.expasy.org>). Az AP2 domént egy α -hélix és három β -lemez alkotja.

A *ParCBF1* homológiájának és funkcióképességének további alátámasztása céljából számos egyszikű (*Oryza sativa*, *Triticum aestivum*) és kétszikű (*Arabidopsis thaliana*, *Betula pendula*, *Vitis vinifera*, *Malus domestica*, *Prunus sp.*) fajból korábban azonosított CBF szekvenciával végeztünk filogenetikai analízist (10. ábra).



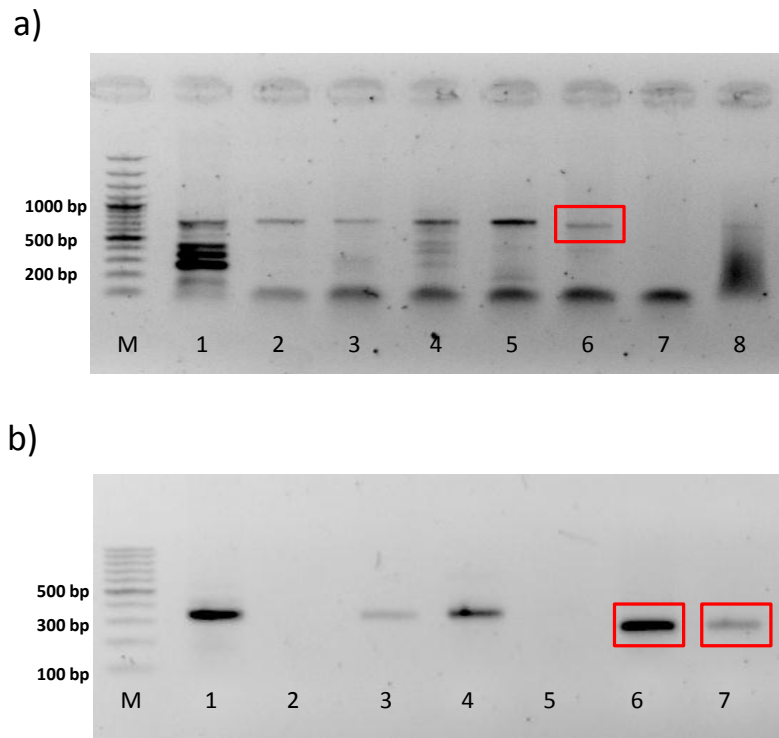
10. ábra: C-repeat binding factor (CBF)-gének prediktált aminosav-szekvenciáinak filogenetikai elemzése a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) módszerrel. Piros szín jelzi az újonnan azonosított ParCBF1 szekvenciát, a többi szín pedig a különböző *Prunus* fajokból származó CBF szekvenciákat jelöli. Az elágazások statisztikai támogatottságát a rajtuk feltüntetett bootstrap értékek mutatják.

Korábbi vizsgálatok igazolják, hogy az elemzéshez használt legtöbb gén kifejeződését az alacsony hőmérséklet indukálja (Stockinger és mts. 1997, Liu et al, 1998; Kitashiba és mts., 2004; Xiao és mts., 2006; Welling és Palva, 2008; Galiba és mts., 2009; Wisniewski et al 2011; Soltész és mts., 2013; Zhang és mts. 2013). A legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) analízissel épített törzsfá azt mutatta, hogy az egyszikűekből származó szekvenciák egy külcsoportot alkotnak, míg az *Arabidopsis*, *Malus* és *Prunus* szekvenciák közös kládot képeznek a kétszikűekből származó szekvenciákon belül. Az *Arabidopsis*, *Malus* és *Prunus* szekvenciák kládjai mind 100%-os bootstrap támogatottsággal rendelkeztek. Ez a mintázat jól demonstrálja az egyes *Prunus CBF* gének közötti nagyfokú hasonlóságot.

A *ParCBF1* szekvenciát az elemzés egy komplex, számos elágazást tartalmazó kládba sorolta be, mely a *P. dulcis*, *P. persica* és *P. mume* CBF szekvenciákat is tartalmazta. A szekvenciák ugyan nem alkottak fajspecifikus kládokat, de az elemzés alapján mind besorolható volt olyan, statisztikailag is alátámasztott (bootstrap $\geq 97\%$) alcsoportokba, melyek az egyes fajokból származó szekvenciákat vegyesen tartalmazták.

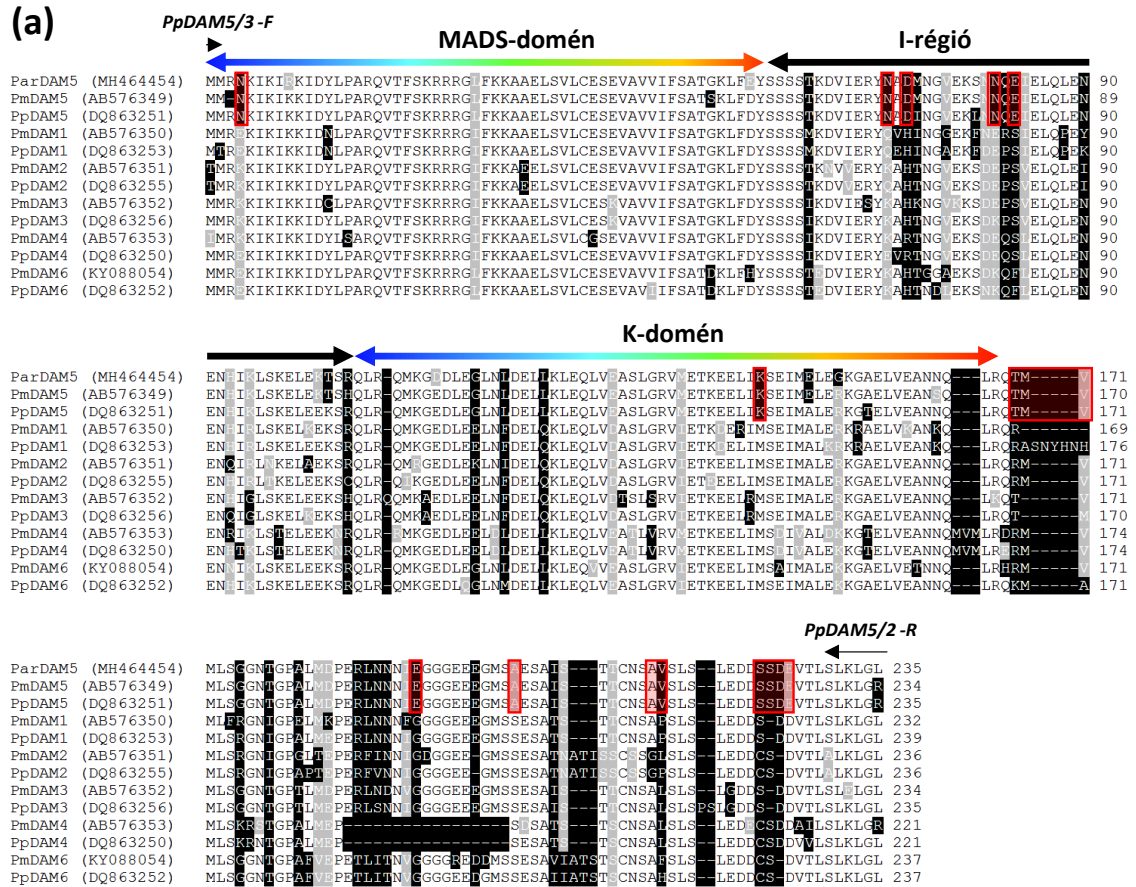
5.1.2. A *ParDAM5* és *ParDAM6* gének azonosítása és jellemzése

A csonthéjas gyümölcsfák mélynyugalmi állapotát szabályozó dormancy-associated MADS-box transzkripciós faktorokat kódoló géneket az őszibarack homológ génjeire (*PpDAM5* és *PpDAM6*) tervezett primerekkel végzett PCR során amplifikáltuk a 'Zard' virágrügyből izolált cDNS templát használatával. Egy *DAM5* (729 bp) és egy *DAM6* (230 bp) típusú szekvenciát azonosítottunk a *PpDAM5/3-F* (Bielenberg és mts., 2008) és *PpDAM5/2-R* (Yamane és mts., 2011a), valamint *PpDAM6/3* (Bielenberg és mts., 2008) primerpárt (3. táblázat) tartalmazó PCR reakció eredményeként, melyeket klónozás követően elküldtünk szekvencia-meghatározásra (11. ábra).

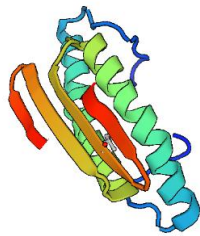


11. ábra: Az őszibarackra tervezett, DAM5- és DAM6 – specifikus primerek használatával amplifikált, különböző *Prunus* fajokból származó genomi, valamint kajsziből származó PCR-termékek detektálása agaróz-gélelektroforézissel. A kajsziből származó, klónozott és szekvenálásra küldött amplifikátumokat piros keret jelzi. (a) a PpDAM5/3-F (Bielenberg és mts., 2008) és PpDAM5/2-R (Yamane és mts., 2011) primérpárral felszaporított szekvenciák. A minták sorrendje: 1 – *P. domestica* ‘Stanley’, 2 – *P. cerasus* ‘Kántorjánosi’, 3 – *P. dulcis* ‘Tétényi kedvenc’, 4 – *P. persica* ‘Springtime’, 5 – *P. armeniaca* ‘Zard’ (genomi DNS), 6 – 8: *P. armeniaca* ‘Zard’ (virágrügy cDNS). Méretmarker (M): GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). (b): A PpDAM6/3 (Bielenberg és mts., 2008) primérpárral felszaporított szekvenciák. A minták sorrendje: 1 – *P. domestica* ‘Stanley’, 2 – *P. cerasus* ‘Kántorjánosi’, 3 – *P. dulcis* ‘Tétényi kedvenc’, 4 – *P. persica* ‘Springtime’, 5 – *P. armeniaca* ‘Zard’ (genomi DNS), 6 – 8: *P. armeniaca* ‘Zard’ (virágrügy cDNS). Méretmarker (M): GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

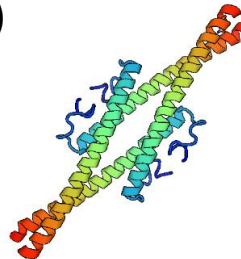
A homológiavizsgálatot az NCBI MegaBLAST algoritmusával végeztük el. A rokon fajok homológ szekvenciái közül az őszibarack *PpDAM5* és a japán kajsziből származó *PmDAM5* mutatták a legnagyobb mértékű egyezést a *ParDAM5* szekvenciával (E -érték = 0) (12. (a) ábra). A *ParDAM6* szekvencia jelentős hasonlóságot mutatott a *P. pseudocerasus*, japán kajsziből származó és őszibarack szekvenciákhöz (E -érték: 2×10^{-101} és 10^{-83} között). A szekvenciákat benyújtottuk az NCBI GenBank adatbázisába, ahol az MH464454 és MH464455 azonosító szám alatt találhatók meg.



(b)



(c)



12. ábra: *Prunus Dormancy-Associated MADS-box* gének részleges aminosav-szekvenciáinak illesztése és a *Prunus armeniaca* DAM5 fehérje szerkezete. (a) A *P. armeniaca* DAM5 részleges aminosav-szekvencia illesztése az őszibarack (*Pp*) és a japán kajszli (*Pm*) DAM szekvenciáival. A szekvenciák végén található szám az aminosavak számát jelzi. A vonalak a szekvenciák méretbeli eltérése miatt az illesztés során nyitott hézagokat jelölik. A szekvencia elején és végén található fekete nyíl az amplifikáláshoz használt primer kötőhelyét jelöli. A fekete háttér az eltérő aminosavakat, a szürke háttér a konzervatív aminosav-cseréket mutatja. A MADS-domént, a K-domént és az I-régiót az illesztés fölött látható nyilak jelölik. A MADS- és K- doméneket jelző nyilak színsorrendje megfelel a 12 (b) és (c) ábrákon látható szalagdiagram modellek színezésének. A DAM5 szekvenciára specifikusan jellemző kisebb motívumokat piros keret jelzi. (b) A MADS-domén és (c) a K-domén homo-tetramer térszerkezeti modellje (<http://swissmodel.expasy.org>).

A fehérjeszerkezeti elemek vizsgálata további bizonyítékkal szolgált a funkcióképes kajszi *DAM5* és *DAM6* homológ szekvenciák azonosításához. A *ParDAM5* esetében három fő fehérjedomént határoztunk meg: az N-terminális régió található, erősen konzervált, DNS-kötő és dimerizációért felelős MADS-box domént (M-domén), a feltehetően fehérje-fehérje interakciók kialakításáért felelős K-domént, és a kettőt összekötő, variábilis I-régiót. Az M-domén esetében az emberi MEF2 (myocyte enhancer factor 2) fehérje (PDB azonosító: 1c7u.1) szolgált templátként, mivel növényi eredetű homológ szekvenciák 3D szerkezete még nem volt elérhető (12. (b) ábra). A MEF2 MADS doménja szintén DNS-kötő funkciót lát el (Huang és mts., 2000). A MEF2 a *ParDAM5* MADS-doménja közötti aminosavszekvencia-egyezés 53,6%-os volt. A modell megbízhatósága 0,76 GMQE-, valamint -2,68 QEMEAN értékekkel jellemezhető. A K-domén szerkezeti modelljéhez az *Arabidopsis* *Sepallata* 3 MADS transzkripciósfaktort (Puranik és mts. 2014) használtuk templátként, melynek homo-tetramer modellje 0,73 GMQE és 0,14 QMEAN értékekkel jellemezhető (12 (c). ábra).

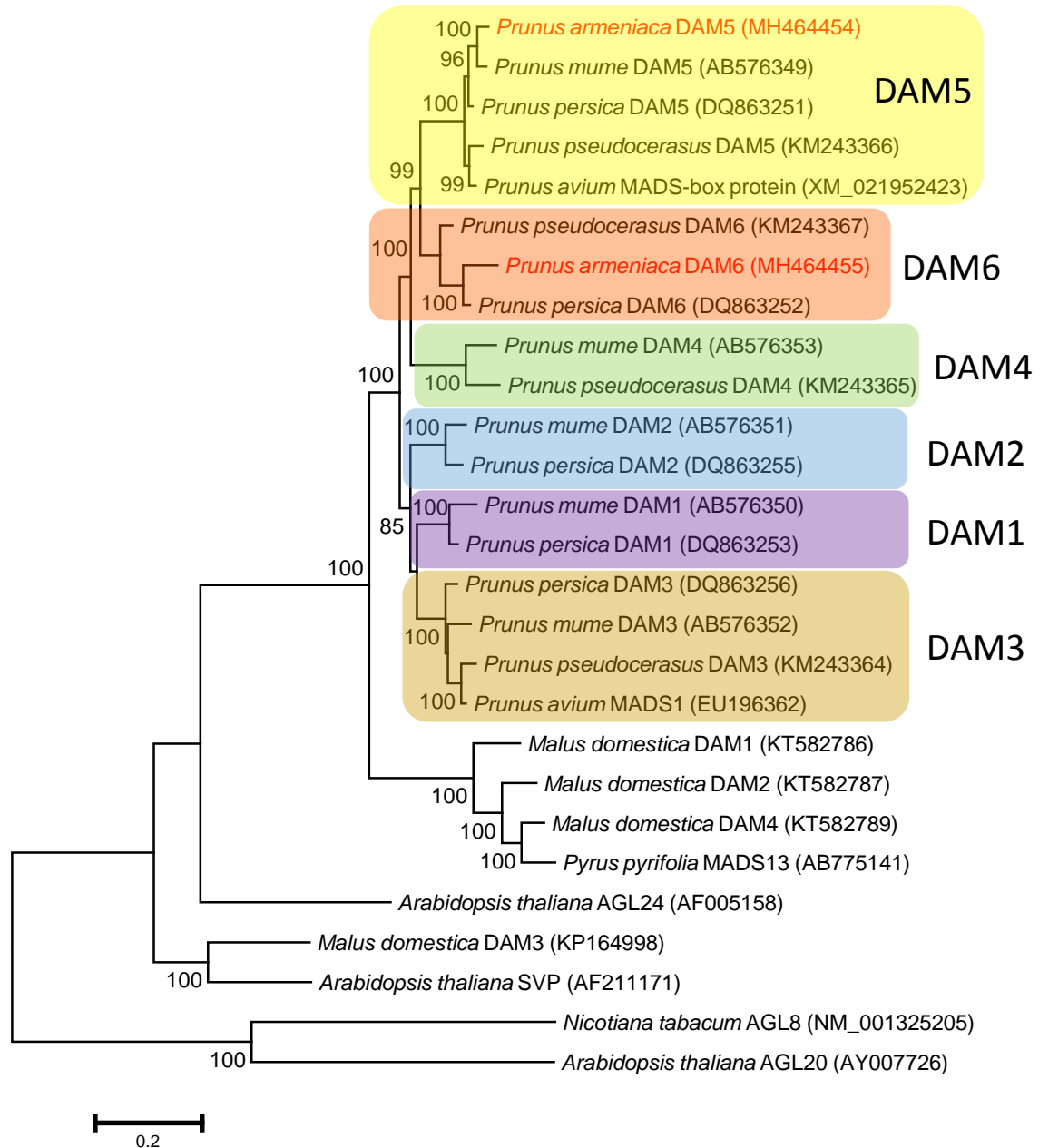
A klónozott *ParDAM6* szekvencia hossza nem tett lehetővé hasonló, részletes elemzést, de számos jellegzetes motívumot detektáltunk, melyeket kizárólag az általunk izolált és a rokon fajokból származó *DAM6* szekvenciákban tudunk azonosítani (13. ábra).

	<i>PpDAM6/3 -F</i> →		<i>PpDAM6/3 -R</i> ←			
ParDAM6 (MH464455)	NNQLRQKMV	M	LSGGNTGPAF	VEPETLIITNVGGGGEEEDGMSSESAQIATSTSCNSD	VLSLEDDCSNVTLSLKLGL	75
PmDAM6 (KY088054)	NNQLRH	M	LSGGNTGPAF	VEPETLIITNVGGGGREEDGMSSESAVATSTSCNSAF	SLSLEDDCSDVTL	75
PpDAM6 (DQ863252)	NNQLRQKM	M	LSGGNTGPAF	VEPETLIITNVGGGGEEEDGMSSESAIATSTSCNSA	HSLSLEDDCSDVTL	75
PdDAM6_T (MK578670)	NNQLRQKM	M	LSGGNTGPAF	VEPETLIITNVGGGGEEEDGMSSESAIATSTSCNSA	QLSLEDDCSDVTL	76

13. ábra: A *P. armeniaca* *DAM6* parciális génszekvencia lefordított aminosavszekvenciájának illesztése a japán kajszi (*PmDAM6*), az őszibarack (*PpDAM6*) és a mandula (*PdDAM6*) homológ szekvenciáival. A nem-konzervatív aminosav-cseréket fekete, a konzervatív aminosav-cseréket szürke háttér jelöli. A szekvenciák végén található szám az aminosavak számát mutatja. A kék keret a kizárólag a *DAM6* szekvenciákra jellemző motívumokat jelzi. A szekvencia elején és végén elhelyezkedő nyilak az amplifikáláshoz használt primerekől származó szekvenciárészt jelölik.

A *DAM* fehérje-szekvenciák filogenetikai elemzése alapján (14. ábra) a *Prunus* és *Malus* fajok testvér-kládot alkotnak az *Arabidopsis* *AGL24*-gyel. A *Rosaceae* fajokon belül a *Malus* és *Pyrus* eredetű szekvenciák képeznek közös csoportot, mely a *Prunus* fajokból származó szekvenciák csoportjával testvérkládot alkot. A *Prunus* szekvenciák csoportja 100%-os bootstrap-támogatottságot kapott, és a hat különböző gén (*DAM1*-től *DAM6*-ig) alapján hat alcsoportra ágazott, melyekbe az újonnan azonosított *Prunus armeniaca* *DAM5* és *DAM6* szekvenciák is besorolhatók. Minden génspecifikus elágazás statisztikailag megbízhatónak bizonyult (bootstrap = 100%). A *ParDAM5* szekvencia a *P. mume* *DAM5* szekvenciával, még a

ParDAM6 a *P. persica* homológ szekvenciával mutatta a legközelebbi rokonságot (bootstrap = 100%). Az elemzés alapján elmondható, hogy a *ParDAM5* és a *ParDAM6* evolúciós kapcsolatban áll a rokon fajokból származó *DAM5* és *DAM6* génekkel, és feltehetően azonos funkciót tölt be a kajszi esetében.



14. ábra: Dormancy-associated MADS-box (DAM) gének aminosav-szekvenciájának filogenetikai elemzése a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) módszer alapján. Az újonnan azonosított *ParDAM5* és *ParDAM6* szekvenciák neve pirossal szerepel. Az eltérő DAM gének alkotta csoportokat különböző színek mutatják. Az elágazások felett feltüntetett bootstrap értékek a statisztikai megbízhatóságot jellemzik.

5.2. A hidegigény és a mikroszpóra fejlődésének jellemzése a két vizsgált nyugalmi időszakban

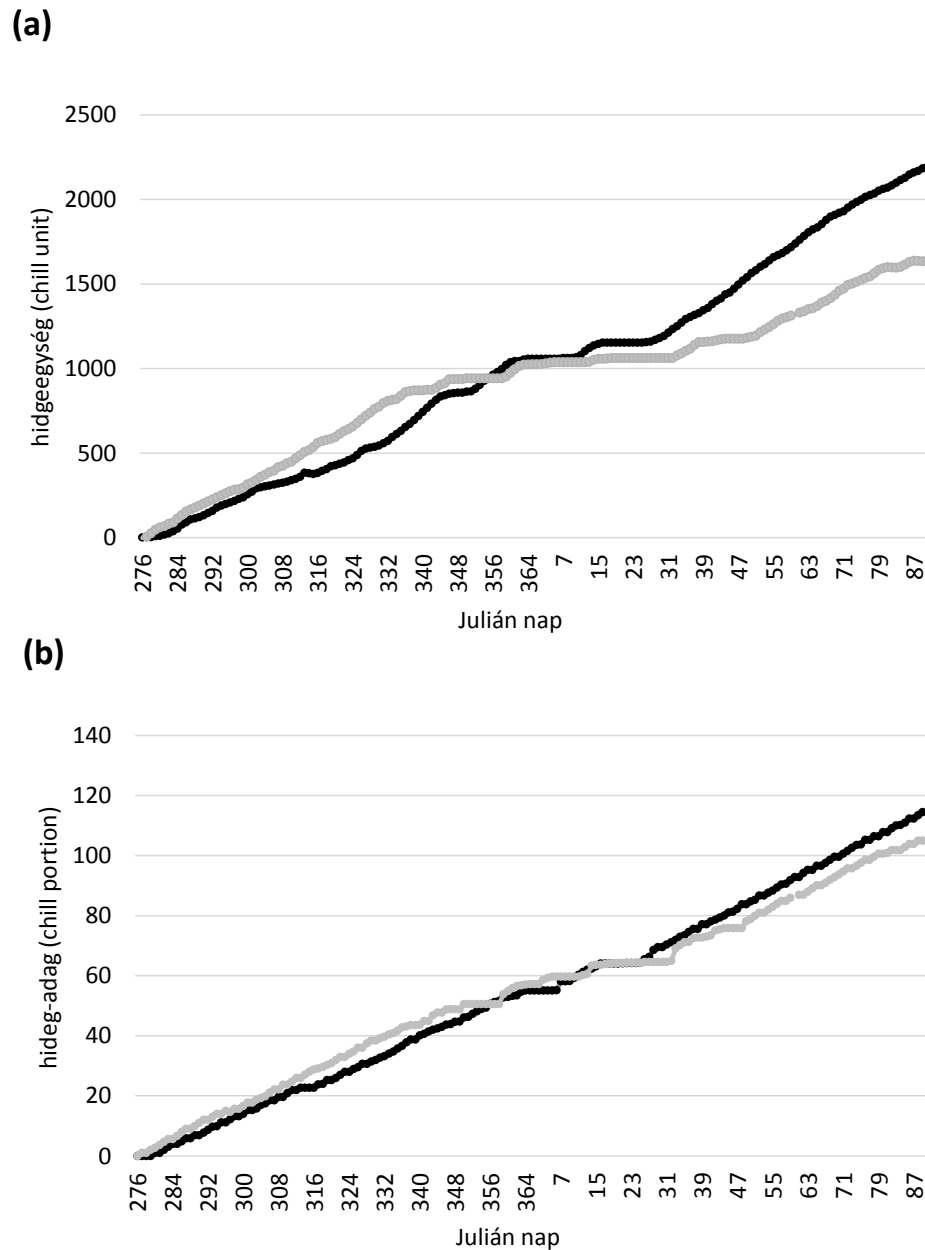
A két vizsgálati időszakot eltérő időjárási körülmények jellemezték. 2015 novemberében az első mintaszedési időpont körül enyhe időjárás volt tapasztalható, a napi minimum hőmérséklet egyes napokon 0 °C fölé esett. Az első komolyabb lehülés decemberben következett be, a vizsgálati időpontok közül ekkor mértük a leghidegebb napi minimum hőmérsékletet. Ezt egy tartósan enyhébb periódus követte 2016 januárjától márciusig, amikor is a napi minimum hőmérséklet ritkán esett -5 °C alá.

A 2016 novemberében mért hőmérsékleti értékek nem voltak jelentősen alacsonyabbak az egy évvel korábbinál, de napi minimum értékek az első mintagyűjtési napot megelőzően rendszerint 0 °C alá estek. December folyamán jelentős hőmérséklet-csökkenés következett be, a napi minimum érték gyakran elérte a -10 °C-ot. Ezt 2017 januárjában egy még komolyabb lehülés követte, a minimum hőmérséklet rendszerint -10–20 °C közé esett a mintagyűjtési időpontok körüli napokban. A 2017. február-március hónapok hőmérséklet szempontjából a 2016-os évhez hasonlóan alakultak.

5.2.1. A vizsgált kajszifajták hidegigénye

A nyugalmi időszakban a hideghatás felhalmozódása szeptember végét követően indult az első jelentősebb lehülésekkel. A hideghatás felhalmozódása 2015/16-os szezonban az október 3-tól, a 2016/17-es szezonban október 4-én vette kezdetét (M.2.2. melléklet). A dinamikus modell alapján a hidegadagok felhalmozódása is október elején vette kezdetét. A két vizsgált nyugalmi időszakban a hideghatás felhalmozódásának alakulását október 3. és március 30. között a 15. ábra mutatja be. A nyugalmi időszak első felében ez sokkal intenzívebb volt a 2016/17-es időszakban. A december 21-ét követő időszakban azonban a hidegegység-értékek felhalmozódása a 2015/16-os időszakban volt intenzívebb. Ennek megfelelően a december 21. és január 9. közötti időszakban közel azonos mennyiségű hideghatás jellemezte mindkét vizsgált nyugalmi időszakot, a felhalmozott hidegegység-értékek közti különbség 25 egységnél kisebb volt. A dinamikus modell alapján számított hideg-adag értékek tekintetében a 2016/17-es időszakban január 26-tól kezdve számoltunk magasabb értékeket az előző évjáráthoz képest. Összességében a 2015/16-os nyugalmi időszak végére számottevően nagyobb hidegegység (kb. 500 CU) és hideg-adag (kb. 10 CP) felhalmozódását határoztuk meg a 2016/17-es évjáráthoz viszonyítva.

A hideghatás-felhalmozódás üteme a két modell alapján igen hasonlóan alakult, de az eredmények a két vizsgálati időszakot összevetve a dinamikus modell esetében sokkal homogénebbnek bizonyultak. A variációs koefficiens (cv) március 1-ig 19,7% volt az Utah modell alkalmazásakor, és ennél jóval kisebb, 4,6% volt a dinamikus modell esetén.



15. ábra: A hidegigény felhalmozódása hidegegység (chill unit) értékben (Utah modell) (a) és hideg-adag (chill portion) értékben (dinamikus modell) (b) megadva a 2015/16-os (fekete vonal) és a 2016/17-es (szürke vonal) nyugalmi időszak alatt.

A vizsgált kajszifajták hidegigényét az 5. táblázat foglalja össze. A korai virágzású ‘Aurora’ és ‘Goldrich’ kisebb hidegigénnyel rendelkezett a kései virágzású fajtákhoz (‘Stella’ és ‘Zard’) képest. A különbség Utah hidegegység (CU) értékekben mérve 122–224, hidegadag értékben mérve 5–11 között alakult. Az Utah-modell alapján 2016/17-es nyugalmi időszakban mind a négy fajta hidegigénye alacsonyabbnak (8,4–11,8%) bizonyult az előző évjáráthoz képest. A dinamikus modell alapján ez a különbség csupán 1,4% körüli, vagyis a két évjáratot összevetve sokkal kiegyenlítettebb értékeket adott. Az ‘Aurora’ és a ‘Goldrich’ virágzási ideje mindkét évben ugyanarra a napra esett, még a ‘Stella’ és ‘Zard’ virágzása 2015/16-ban egy nappal korábban következett be.

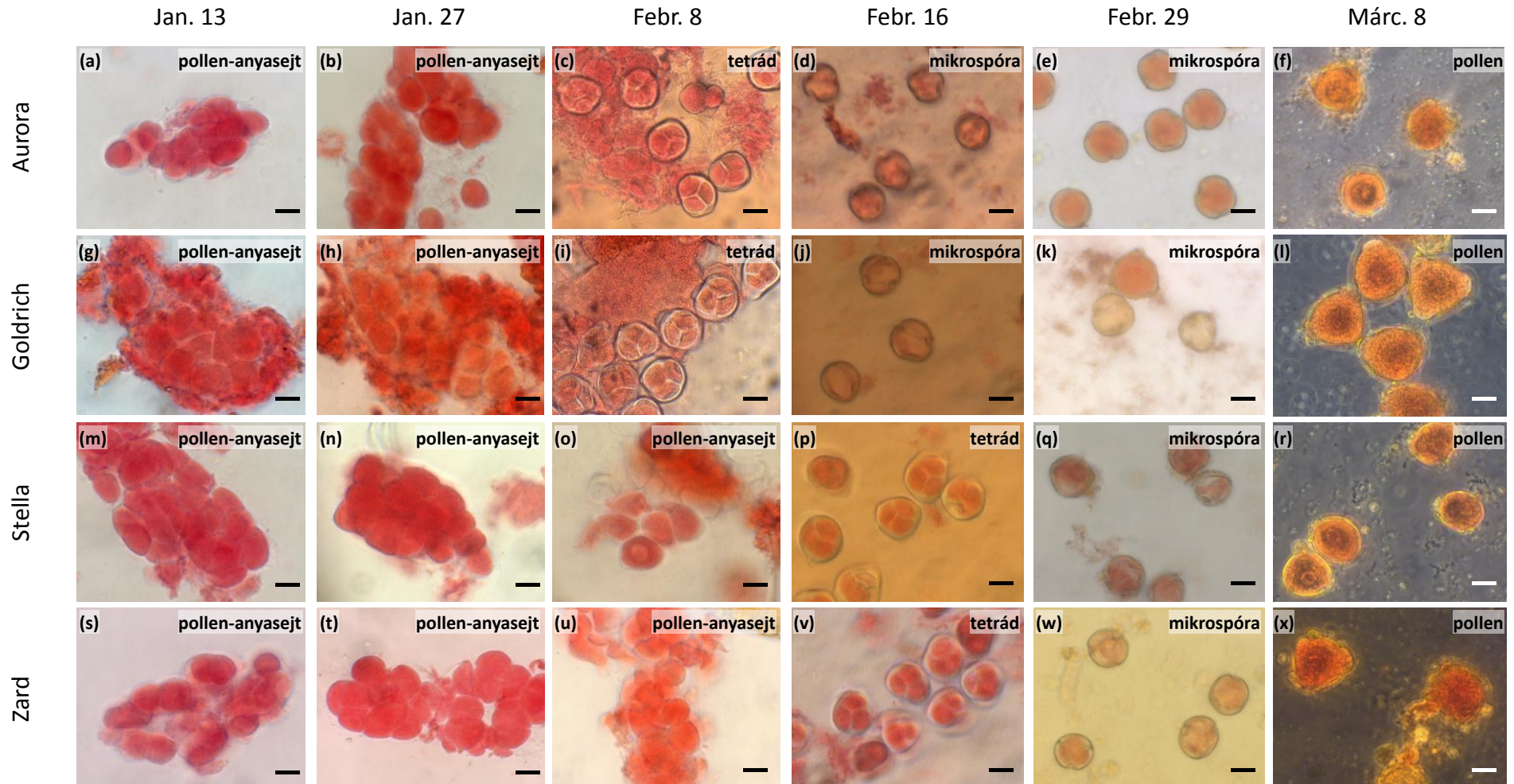
5. táblázat: A kísérletben használt kajszifajták mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigénye a két vizsgálat nyugalmi időszakban (2015/16 és 2016/17)

Fajta	nyugalmi időszak	Mélynyugalom vége	<u>Hidegegység (Utah-modell)</u>			<u>Hideg-adag (dinamikus modell)</u>			Virágzási idő
			Érték	Átlag	cv* (%)	Érték	Átlag	cv (%)	
Aurora	2015/16	január 31.	1203	1136	8.4	70	70	1.4	március 23.
	2016/17	február 2.	1068			69			március 23.
Goldrich	2015/16	február 5.	1299	1213	10.1	74	74	1.4	március 24.
	2016/17	február 6.	1127			73			március 24.
Stella	2015/16	február 13.	1439	1335	11.0	80	81	1.2	március 30.
	2016/17	február 21.	1231			81			március 31.
Zard	2015/16	február 15.	1473	1360	11.8	81	81	0.0	április 1.
	2016/17	február 22.	1247			81			április 2.

*cv: variációs koefficiens

5.2.2. A mikrosporogenezis vizsgálat eredményei

A pollenfejlődés folyamatát mindkét vizsgálati évben mikroszkópos vizsgálatokkal követtük nyomon január és március között. A 12. ábrán a 2016-os évben megfigyelt fejlődésmenet látható. A 2016-os évben a pollenanyasejtek fejlődése január elején elkezdődött, a tetrad-állapotot február elején figyeltük meg, a mikrospórák február végétől, az érett pollenszemek pedig február végén–március elején váltak láthatóvá. Egy évvel később az egész folyamat késve játszódott le, a meiózis utáni állapotot először február közepén figyeltük meg (13. ábra). Ennek oka feltehetően a január végén–február elején bekövetkezett hosszabb hideg periódus lehetett (M.2.2. melléklet). A kései virágzású ‘Stella’ és ‘Zard’ esetében a meiózis mindkét évben nagyjából egyhetes késéssel következett be a korai virágzású ‘Aurora’ és ‘Goldrich’ fajtákhoz képest. A korai- és kései virágzású fajták mikrospórafejlődés-menetében megfigyelt eltérés egybeesik a fajták hidegigényének teljesülésével. Mind a négy fajta esetében akkor figyeltük meg a tetrad állapotot, amikor megkapta a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hideghatást.



16. ábra: Fénymikroszkópos felvételek a kajszai (*Prunus armeniaca*) pollenfejlődésének (mikrosporogenezis) fázisairól. A korai virágzású 'Aurora' (a-f) és 'Goldrich' (g-l), valamint a kései virágzású 'Stella' (m-r) és 'Zard' (s-x) virágrügyeiről 2016 januárja és márciusa között gyűjtöttünk mintákat. A képek jobb alsó sarkában található méretmarker 20 µm-nek felel meg, a képek hússzoros nagyításban készültek.

5.3. A *ParCBF1* és *ParDAM5-6* génexpressziós vizsgálata a kajszi virágrügyekben

A *ParCBF1* és *ParDAM5-6* gének virágrügyekben mért relatív expressziójának alakulását a 17. ábra mutatja be a mintagyűjtés napján mért napi minimum hőmérsékleti értékekkel és a hidegegység értékekkel összevetve, a két vizsgálati időszakot (2015/16 és 2016/17) összehasonlítva. A 2015/16-os nyugalmi időszakban a *ParCBF1* relatív génexpressziós szintje mind a négy fajta esetében decemberben volt a legnagyobb. A fagytűrő ‘Zard’ fajtánál négyszeres FC-értékeket mértünk a fagyérzékeny ‘Aurora’ fajtához képest. 2015 decemberében a következő nyugalmi időszakhoz képest jóval nagyobb mértékű növekedés figyelhető meg a *ParCBF1* transzkripció mértékében. A különbség ellenére elmondható, hogy a *ParCBF1* génexpressziójának megugrása mindkét évben akkor következett be, amikor a hőmérséklet fagypont alá csökkent (a mintagyűjtés napján 2015-ben $-5,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2016-ban $-2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$). E tekintetben mindkét vizsgálati évben szignifikáns különbségeket figyeltünk meg az ‘Aurora’, valamint a ‘Stella’ és a ‘Zard’ génexpressziója között. 2015-ben a ‘Goldrich’ szintén szignifikánsan nagyobb expressziós értékeket mutatott az ‘Aurora’ fajtához képest. A *ParCBF1* expressziója január végéig mindkét vizsgálati időszakban és mind a négy vizsgált fajta esetében lecsökkent, majd rügyattanásig a nullához közeli értéken maradt.

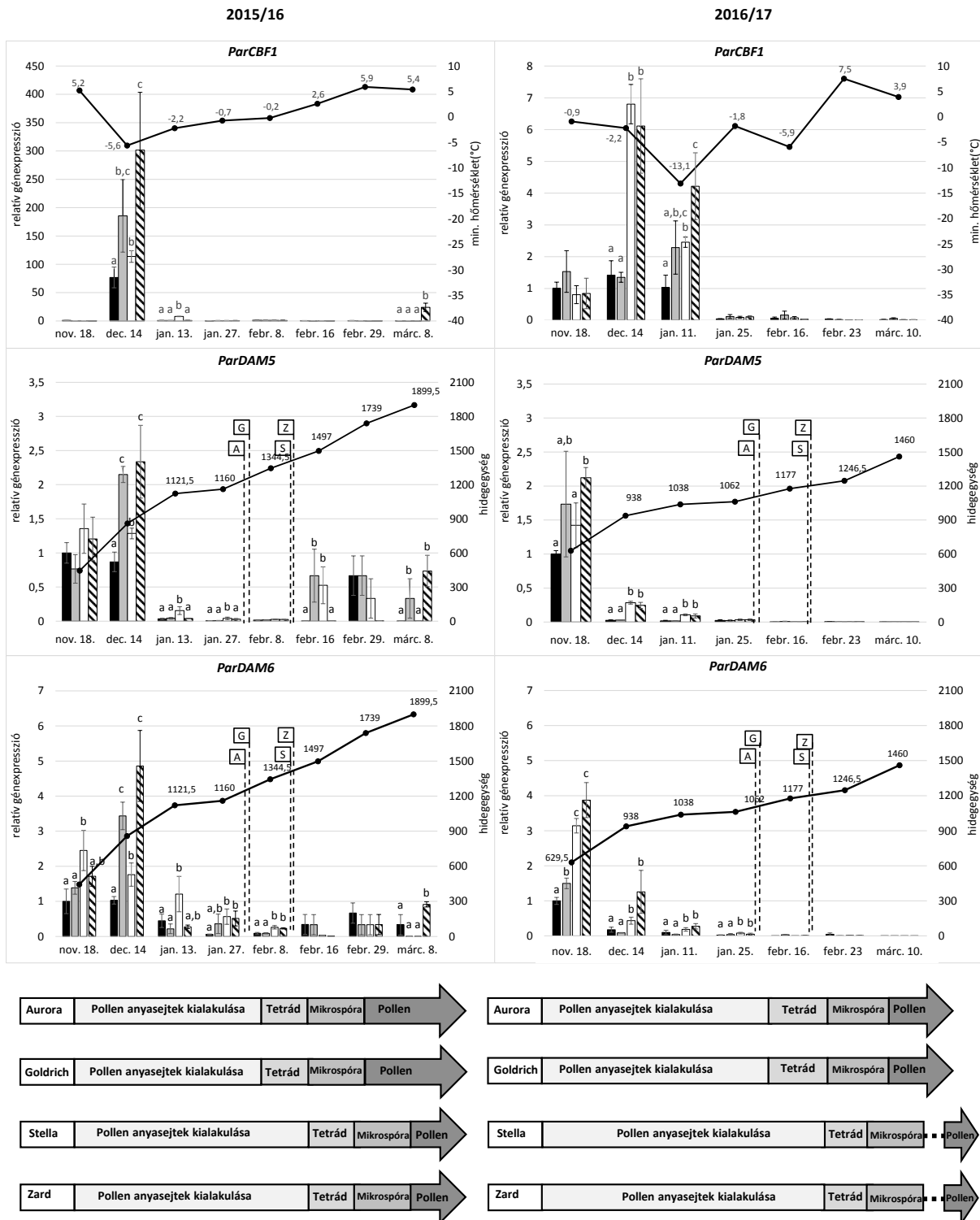
A *ParDAM5-6* gének expressziója a virágrügyekben jellegzetes, mind a két vizsgált nyugalmi időszakban azonos tendenciát mutatott. A nyugalmi időszak elején mindkét gén transzkripció szintje az összes fajta esetében emelkedni kezdett. A legnagyobb expressziós értékeket 2015 novemberében, illetve 2016 decemberében mértük, ezután mindkét gén transzkripcióját fokozatosan csökkenő tendencia jellemezte. A *ParDAM5* és *ParDAM6* génexpresszió számottevő csökkenését követően mindkét évjáratban szignifikáns különbségeket figyeltünk meg egyes fajták esetében. A ‘Stella’ virágrügyeiben 2016 januárjában közepes mértékű, de a többi fajtához képest kiugró *ParDAM5-6* expressziós szintet mértünk. 2017-ben korai és kései fajták között szignifikáns különbségeket figyeltünk meg e tekintetben a február 16-i mintagyűjtési időpontig.

A *ParCBF1* és a *ParDAM5-6* gének transzkripció aktivitása között egyértelmű kapcsolat mutatkozott 2015. december és 2017. január folyamán, amikor is a nagyobb *ParCBF1* expressziós értékeket mutató fajtáknál a *ParDAM5-6* esetében is nagyobb transzkripció aktivitást figyeltünk meg. Január végére a *ParCBF1* expressziója mind a négy fajtánál jelentősen lecsökkent, ennek ellenére a ‘Stella’ esetében továbbra is nagymértékű *ParDAM5-*, valamint mindkét kései virágzású fajta esetében nagyobb *ParDAM6* expressziós szintet mértünk. Ez a különbség a 2016-os évben február 8-ig volt megfigyelhető.

A 2016/17-es nyugalmi időszakban december–január között a két kései virágzású fajtánál szignifikánsan nagyobb *ParDAM5-6* expressziós szintet mértünk a korai virágzású fajtákhoz képest. A *ParDAM6* esetén ez a különbség még a január 25-én gyűjtött mintáknál is megmutatkozott. Hasonló eltérés figyelhető meg a korai és kései virágzású fajták *ParCBF1* expressziójában a január 11-ig terjedő időszakban.

Miután a vizsgált fajták megkapták a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegmennyiséget, mindhárom gén expressziós szintje egyértelműen lecsökkent. Ez a korai és kései virágzású fajtáknál eltérő vizsgálati időponttól volt megfigyelhető. A különbség különösen jól látszik a ‘Stella’ és a ‘Zard’ 2016. február 8-án gyűjtött mintáinál, ahol szignifikánsan nagyobb *ParDAM6* transzkripciós szintet mértünk. Ezzel párhuzamosan ezen fajták mélynyugalmi szakasza a korai virágzású fajtákhoz képest 10–14 nappal később ért véget (5. táblázat). Habár a *ParDAM5* esetén a relatív expressziós értékek kisebbek voltak, hasonló különbség itt is jelentkezett.

A 2015/16-os nyugalmi időszakban február–március folyamán a *ParDAM5* és *ParDAM6* gének valamivel nagyobb transzkripciós aktivitást mutattak, mint a következő nyugalmi időszakban, de ebben az időszakban már nem volt megfigyelhető konzekvens eltérés a korai- és a kései virágzású fajták expressziós mintázata között.



17. ábra: A *ParCBF1*, *ParDAM5* és *ParDAM6* gének expressziós mintázata kajszi (*Prunus armeniaca*) virágrügyekben két egymást követő nyugalmi időszakban. Az ‘Aurora’ (fekete), a ‘Goldrich’ (szürke), a ‘Stella’ (fehér) és a ‘Zard’ (sávozott) virágrügyeiből két egymást követő nyugalmi időszakban gyűjtöttünk mintákat. A relatív génexpressziós értékek három ismétlés átlagából származnak, az egymástól szignifikánsan eltérő értékeket (Duncan-teszt, $P < 0,05$) különböző betűk jelzik (a-c). A mintagyűjtés napján rögzített minimum hőmérsékletet, valamint az adott időpontig felhalmozódott Utah hidegesség-értékeket a fekete pontok jelölik. A szaggatott vonalak az egyes fajták mélynyugalmi állapotának végét jelzik, a négyzetekben található „A”, „G”, „S” és „Z” betűk a fajtanevek kezdőbetűi. Az ábra alján látható diagram a négy fajta mikrospóra-fejlődésének egyes fázisait mutatja.

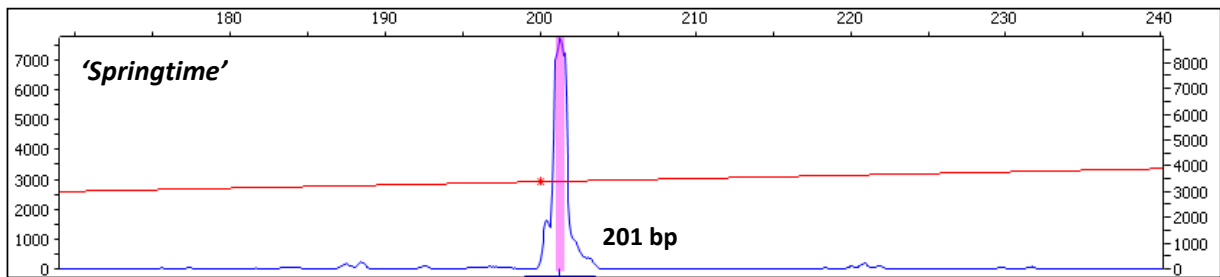
5.4. Az érési időt befolyásoló NAC transzkripció faktor kódoló génhomológok vizsgálata

5.4.1. Az érési idő és az őszibarack NAC-genotípusok között megfigyelt összefüggés

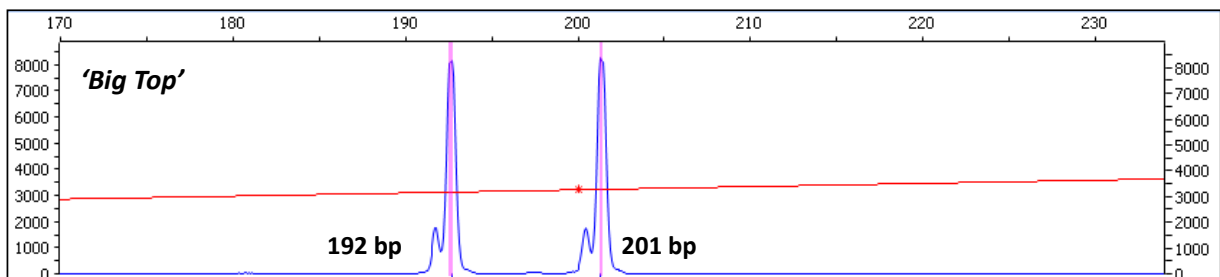
Pirone és mts. (2013) két térképező populáción végzett vizsgálataikkal kimutatták, hogy az őszibarack *PpNAC1* génben (ppa008301m) egy IN/DEL típusú mutációnak köszönhetően kialakult fragmentumhossz-polimorfizmus együtt öröklődik a korai érésidővel. Vizsgálataink során egy érési idő tekintetében igen változatos őszibarack-fajtagyűjtemény genotipizálását végeztük el azzal a céllal, hogy a szűk genetikai hátterű növényanyagon felismert korábbi összefüggést statisztikailag megbízható adatokkal támasszuk alá. A Pirone és mts. (2013) által tervezett és fluoreszcens jelöléssel ellátott NAC-indel specifikus forward primer használatával 125 olyan őszibarack fajtából származó mintán végzetünk PCR reakciót, melyek érési ideje ismert.

A PCR termékek fragmentumhossz-analízise alapján három jól elkülöníthető genotípus határozható meg: 1) homozigóta a 192 bp hosszúságú 'Lovell' fajtában leírt referencia allélra (Verde és mts., 2013), 2) homozigóta az inszerciót tartalmazó 201 bp hosszúságú allélra, 3) heterozigóta genotípus, mely mind a 192 bp, mind a 201 bp hosszúságú allélt hordozza. Az egyes genotípusokhoz tartozó kromatogramokat a 18. ábra szemlélteti. Összesen 33 fajta (a vizsgált fajták 26,4%-a) volt homozigóta a 201 bp allélra, melyek közül 25 fajtára korai (165-203 Julián nap), öt fajtára középidei (204-237 Julián nap) és három fajtára a kései (238-274 Julián nap) érési idő volt jellemző. További 33 fajta volt homozigóta a 192 bp allélra, ebből 19 fajta augusztus 3. dekádja után érett, 12 fajta volt középidei-, két fajta pedig közép-korai érésű. A maradék 59 fajta (a vizsgált fajták 47,2%-a) heterozigótának bizonyult. Ebből 35 fajta középidei, 17 korai, hét fajta pedig kései érésű (M.2.1 melléklet).

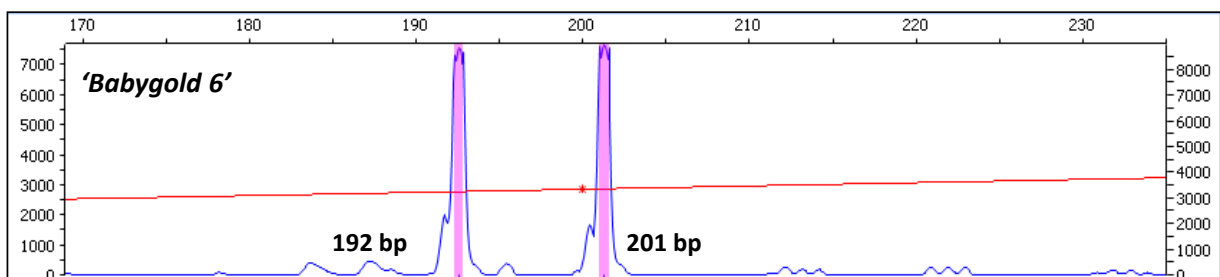
(a)



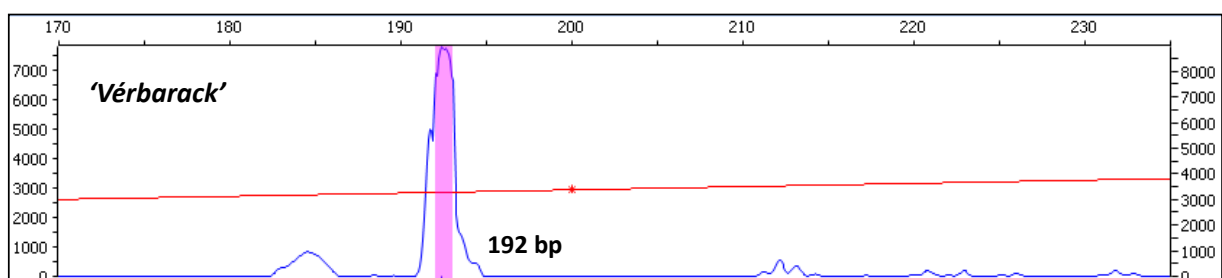
(b)



(c)



(d)



18. ábra: A fragmentumhossz-analízis által meghatározott *PpNAC1* genotípusok kromatogramja. a) A korai, június végén érő 'Springtime' homozigóta a 201 bp hosszúságú, 9 bp-nyi indel-t tartalmazó allélra. b) és c) Két középidei, heterozigóta fajta, a 'Big Top' (július vége) és a 'Babygold 6' (augusztus közepe). d) A szeptember végén érő 'Vérbarack', mely a 192 bp referenciaallélra homozigóta.

A statisztikai analízishez egy 3 x 3-as kontingencia táblázatot hoztunk létre a három érési kategória (korai, középidei, kései) és a három genotípus (192/192 bp, 192/201 bp és 201/201 bp) alapján és a szignifikancia elemzéshez a χ^2 -négyzet próbát alkalmaztuk (6. táblázat). A NAC-genotípus és az érési idő között szignifikáns kapcsolat volt kimutatható ($\chi^2 = 57,2$; $df = 4$; $P \leq 0,0001$). A 192/192 homozigóták kisebb gyakorisággal fordultak elő a korai- és a középidei érési kategóriában, a 201/201 homozigóták jelenléte pedig a középidei és kései érésiidő kategóriákban volt alulreprezentált. A heterozigóta genotípusok gyakorisága a középidei kategóriában volt a legnagyobb. A Cramér-féle V próba értéke 0,478, a Goodman-Kruskal mutató (λ) értéke pedig 0,37 volt.

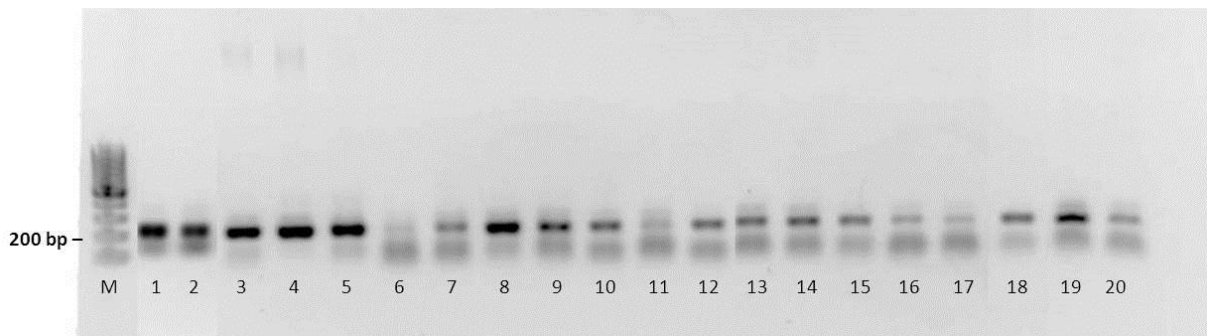
6. táblázat: A NAC-genotípusok és az érési idő összefüggését bemutató kontingencia táblázat

NAC-genotípus	192/192		192/201		201/201		Össz.
Érési idő (Julián-nap)	Mintaszám (db)	F (%)*	Mintaszám (db)	F (%)*	Mintaszám (db)	F (%)*	mintaszám (db)
165-203	2	-82,8	17	-18,1	25	115,2	44
204-237	12	-12,6	35	42,6	5	-63,6	52
238-274	19	148,2	7	-48,9	3	-60,8	29
Mintaszám (db)	33		59		33		125

$F(\%) = (\text{tapasztalt-várható gyakoriság}) / \text{várható gyakoriság} * 100$

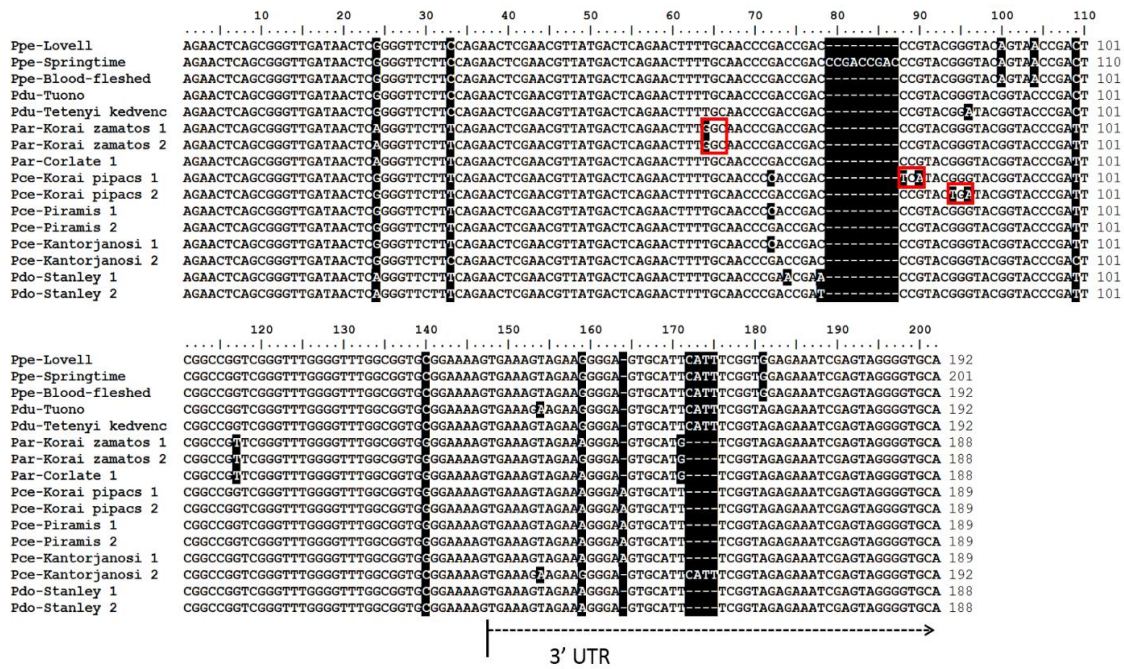
5.4.2. NAC szekvencia-variációk a *Prunus* fajok között

Az őszibarack és rokon *Prunus* fajok genomi DNS-mintáival végzett PCR-sikeressége igazolta a vizsgált NAC szekvencia jelenlétét az összes vizsgált csonthéjas gyümölcsfajban (19. ábra). A fluoreszcensen jelölt NAC-indel specifikus primerrel (Pirona és mts., 2013) az esetleges intraspecifikus szekvencia-variációk azonosítása volt a cél a gén azon szakaszán, ahol az őszibarack korai érését kialakító mutáció bekövetkezett. Az őszibarackra jellemző IN/DEL típusú vagy ahhoz hasonló mutáció nem mutatkozott a NAC gén C-terminális régiójában a többi faj különböző érési idejű fajtái esetében. A mandulafajtáknál egy, az őszibarack referenciaalléllal megegyező méretű (192 bp) fragmentum, a kajszi- és európai szilvafajtáknál szintén egy 188 bp hosszúságú fragmentum volt detektálható. A meggyfajták közül a ‘Korai pipacsmeggy’ és a ‘Piramis’ esetében egy 189 bp hosszúságú ampikon volt azonosítható. Egyedül a ‘Kántorjánosi 3’ meggyfajtában találtunk két különböző méretű (189 bp és 192 bp) fragmentumot.



19. ábra: Hús különböző csonthéjas gyümölcsfajta PCR-analízisének eredménye a NAC-indel specifikus primerpárral. A minták sorrendje (balról kezdve): M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder méretmarker (Thermofisher Scientific), 1 – *P. cerasus* ‘Érdi jubileum’, 2 – *P. cerasus* ‘Piramis’, 3 – *P. domestica* ‘Stanley’, 4 – *P. domestica* ‘President’, 5 – *P. dulcis* ‘Tétényi keményhéjú’, 6 – *P. dulcis* ‘Tuono’, 7 – *P. persica* ‘Springtime’, 8 – *P. persica* ‘Vérbarack’, 9 – *P. armeniaca* ‘Pisana’, 10 – *P. armeniaca* ‘Zard’; 11 – *P. armeniaca* ‘Korai zamatos’, 12 – *P. armeniaca* ‘Harmat’, 13 – *P. armeniaca* ‘Corlate’, 14 – *P. armeniaca* ‘Kecspár’, 15 – *P. armeniaca* ‘Szamarkandszkij-rannij’, 16 – *P. armeniaca* ‘Pannónia’, 17 – *P. armeniaca* ‘Ceglédi Piroska’, 18 – *P. armeniaca* ‘Magyar kajszai C235’, 19 – *P. armeniaca* ‘Ceglédi óriás’, 20 – *P. armeniaca* ‘Rózsakajszai C1406’.

A különböző *Prunus* fajokból ezután tizenöt NAC-szekvenciát választottunk ki, melyekkel homológiavizsgálatot végeztünk és összevetettük az NCBI GeneBank adatbázisában található őszibarack referenciaalléllal. A vizsgált szekvenciák BLAST-analízise alapján az *E*-értékek $9e-88$ és $2e-74$ között változtak. A mandulából származó szekvenciák mutatták a legnagyobb mértékű egyezést az őszibarackkal, míg a többi faj inkább a *P. mume* NAC szekvenciához állt közelebb. Érdekes megjegyezni, hogy a *P. dulcis* (*Pdu*) ‘Tuono’ (KX650378) és a *P. cerasus* (*Pce*) ‘Kántorjánosi 3’ (KX650379) szekvenciák azonosnak bizonyultak. A két meggyfajta, a ‘Piramis’ (KX650386) és a Kántorjánosi 3 (KX650390) szintén közös szekvenciát hordozott. A *P. armeniaca* (*Par*) ‘Korai zamatos’ 1 (KX650380) szekvencia a kései érésű ‘Corlate’ kajszifajtában is megtalálható volt, mely ugyanakkor egy másik allélt (MF464013) is hordozott. Az európai szilvában, a *P. domestica* (*Pdo*) ‘Stanley’ fajtában azonosított egyik szekvencia (KX650377) szintén megtalálható volt a kései érésű ‘President’ fajtában is.



20. ábra: Különböző *Prunus* fajokból származó, a *PpNAC1*-gyel homológ szekvenciák C-terminális és 3' nem transzlálódó régiójának (3' UTR) nukleinsav szintű illesztése. A „Ppe-Lovell” szekvencia a referencia genomból származik, ami megfelel a ppa008301 azonosítójú cDNS szekvenciának. A kései érésű ‘Vérbarack’ (‘Blood-fleshed’) genótipusból származó szekvencia megegyezik a referenciagenommal, az igen korai érésű ‘Springtime’ fajtából származó szekvencia pedig tartalmazza az inszerciót. Az eltérő bázisokat fekete háttér jelzi, a pirossal keretezett tripletek a nem-konzervatív aminosav-cseréket illetve korai STOP-kodont jeleznek.

Az azonosított *Prunus* NAC-szekvenciákat ezután illesztettük a *P. persica* ‘Lovell’ referencia genomból származó (ppa008301m azonosítójú) cDNS szekvenciához (20. ábra). A korai érésű ‘Springtime’ őszibarackfajta tartalmazta a 9 bp-os inszerciót, míg a kései ‘Vérbarack’ szekvenciája teljesen azonos volt a referenciagenomban azonosított szekvenciával. A rokon *Prunus* fajok szekvenciaillesztése nagyfokú egyezést mutatott az őszibarack referencia genom megfelelő régiójával. Habár az őszibarack korai fajtáira jellemző 9 bp inszerciót nem találtuk meg egyik vizsgált csonthéjas faj parciális NAC szekvenciájában sem, számos más jellegzetes szekvencia-módosulást sikerült azonosítani (7. táblázat). Összesen 74 esetben volt detektálható SNP (single nucleotide polymorphism) a részleges NAC-domén szekvencia kódoló régiójában, ebből 25 szinonim, 49 nem szinonim (aminosavcserét eredményező), illetve egy nonszensz egynukleotidos báziscsere volt. Összesen 32 SNP konzervatív, 14 szemi-konzervatív, míg 3 SNP nem-konzervatív aminosav-cserét eredményezett. Ezenkívül egy nonszensz mutációt találtunk a ‘Korai pipacsmeggy’ fajta alléljában. Öt meggysekvenciában történt 1 bp inszerció, kajszipan, szilvában és az öt meggysekvenciából négyben pedig egy 4 bp deléción volt detektálható.

7. táblázat: A NAC-proteint kódoló gén C-terminális régiójában kimutatható homológia és polimorfizmus az őszibarackkal rokon diploid és poliplod *Prunus* fajok esetében

Szekvencia	Génbanki azonosító (saját szekvencia)	Legnagyobb mértékű szekvencia- azonosság az NCBI adatbázisból	NCBI génbanki azonosító	BLAST <i>E</i> érték	Egy-nukleotidos polimorfizmus ^a					Összesen ^b
					szin	nem-szinonim		non- szensz		
						konz.	szemi -konz.	nem- konz.		
<i>Pdu</i> Tuono	KX650378	<i>P. persica</i>	XM_007211 500	9e-88	–	S→G	N→T	–	–	4
<i>Pdu</i> Tétényi kedvenc	KX650383	<i>P. persica</i>	XM_007211 500	9e-88	1	S→G,	N→T	–	–	4
<i>Par</i> Korai zamatos 1	KX650380	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	1e-80	3	S→G, L→F, A→G	N→T	C→G	–	11, 4 bp del.

<i>Par</i> Korai zamatos 2	KX650384	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	7e-79	3	S→G, L→F, A→G	N→T	C→G	–	10, 4 bp del.
<i>Par</i> Corlate	MF464013	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	3e-82	3	S→G, L→F, A→G	N→T	–	–	10, 4 bp del.
<i>Pce</i> Korai pipacsmeggy 1	KX650388	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	2e-74	3	S→G, L→F, A→G	N→T	P→S	–	10, 1 bp ins., 4 bp del.
<i>Pce</i> Korai pipacsmeggy 2	KX650389	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	4e-76	2	S→G, L→F, A→G	N→T	–	TGA	9, 1 bp ins., 4 bp del.
<i>Pce</i> Piramis 1	KX650386	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	9e-78	2	S→G, L→F, A→G	N→T	–	–	8, 1 bp ins., 4 bp del.
<i>Pce</i> Piramis 2	KX650387	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	2e-79	1	S→G, L→F,	N→T	–	–	7, 1 bp ins., 4 bp

						A→G				del.
<i>Pce</i> Kántorjánosi 1	KX650390	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	9e-78	2	S→G, L→F, A→G	N→T	–	–	8, 1 bp ins., 4 bp del.
<i>Pce</i> Kántorjánosi 2	KX650379	<i>P. persica</i>	XM_007211 500	9e-88	–	S→G,	N→T	–	–	4
<i>Pdo</i> Stanley 1	KX650377	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	3e-77	2	D→E, S→G, L→F	T→N, N→T	–	–	9, 4 bp del.
<i>Pdo</i> Stanley 2	KX650385	<i>P. mume</i>	XM_008228 454	7e-79	3	S→G, L→F	N→T	–	–	8, 4 bp del.

^a Egy-nukleotidos polimorfizmus meggy, a szilva és kajszi *NAC* szekvenciákban az őszibarack ('Lovell') referencia allélhoz viszonyítva.

^b A kodoló- és a nem-transzlálódó régióban fellelhető összes szekvenciavariancia.

szin.: szinonim aminosavcsere, konz.: konzervatív aminosavcsere, bp: bázispár, ins.: inszerció, del.: deléció, *Par*: *Prunus armeniaca*, *Pce*: *P. cerasus*, *Pdo*: *P. domestica*, *Pdu*: *P. dulcis*.

5.5. Új tudományos eredmények

1. Egy 756 bp hosszúságú *C-repeat Binding Factor (CBF)* fehérjét kódoló részleges génszekvenciát azonosítottunk a *P. armenica* 'Korai zamatos' genomi DNS-éből. A szekvencia az MH464453 azonosítószámmal került felvételre az NCBI GenBank adatbázisába. A *ParCBF1* szekvencia azonosításához az NCBI adatbázisban fellelhető rokon *Prunus* fajok *CBF* szekvenciáival homológiavizsgálatot és filogenetikai elemzést végeztünk el.
2. Egy fehérjeszerkezet jóslására alkalmas szoftver segítségével elkészítettük a *ParCBF1* CBF transzkripciós faktorokra jellemző AP2 DNS-kötő doménjének térszerkezetét.
3. A *Dormacy Associated MADS-box 5* (729 bp) és *6* (230 bp) transzkripciós faktorokat kódoló szekvenciát azonosítottunk a *P. armenica* 'Zard' virágrügüből izolált cDNS-ből. A szekvenciák az MH464454 és MH464455 azonosító számmal kerültek fölvetelre az NCBI GenBank adatbázisába. A *ParDAM5* és *ParDAM6* szekvenciák azonosságát az NCBI adatbázisban fellelhető rokon *Prunus* fajok *DAM*-típusú szekvenciáival végzett homológiavizsgálattal és filogenetikai elemzéssel bizonyítottuk. A prediktált aminosav-szekvencia alapján illesztéseket készítettünk, melyben azonosítani tudtuk a *DAM*-fehérjékre jellemző motívumokat.
4. A *ParDAM5* esetében elkészítettük két jellegzetes fehérje-domén, az M-domén és a K-domén térszerkezeti modelljét.
5. Génexpressziós vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a *ParCBF1* aktivitását a téli nyugalmi időszak alatt az alacsony hőmérséklet határozza meg, míg a *ParDAM5-6* expresszióját feltehetően részben a *ParCBF1* transzkripciós faktor, részben a vizsgált fajták hidegigényének teljesülése szabályozza.
6. Megállapítottuk, hogy két korai és két kései virágzású kajszifajta virágrügyeiben a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigény teljesülésével a *ParDAM5-6* expressziója szignifikánsan csökken, ezzel egyidőben megjelenik a pollenen-anyasejtek osztódását követő ún. „tetrád” állapot.
7. Meghatároztuk 125, eltérő pomológiai tulajdonságokkal rendelkező őszibarackfajta *NAC*-genotípusát. Statisztikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az általunk vizsgált őszibarackfajták *NAC*-genotípusa és érési ideje között szignifikáns kapcsolat van. Ezzel bizonyítottuk a *PpNAC1* funkcionális markerként való alkalmazhatóságát érési időre történő szelekció során.

8. Rokon *Prunus* fajok genomi DNS-mintáival végzett PCR-vizsgálattal igazoltuk az őszibarack érési idejét befolyásoló *NAC* gén homológ szekvenciáinak jelenlétét az összes vizsgált csonthéjas gyümölcsfajban. A PCR-termékek klónozásával és szekvenálásával 15 új, a *PpNAC1*-gyel homológ részleges génszekvenciát azonosítottunk kajszi (*P. armeniaca*), mandula (*P. dulcis*), európai szilva (*P. domestica*) és meggy (*P. cerasus*) esetében. Ezekben a szekvenciákban összesen 69 esetben azonosítottunk SNP-t (single nucleotide polymorphism) a részleges *NAC*-domén szekvencia kódoló régiójában, melyek további vizsgálata segítheti e gének szerepének tisztázását.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A *P. armeniaca* CBF- és DAM5-6 homológ gének azonosítása szerkezetük alapján

A kajszit korai virágzása különösen érzékennyé teszi a tavaszi fagyokkal szemben. A rügpattanás kezdetét a genetikailag meghatározott mélynyugalom, valamint a környezeti tényezők által szabályozott kényszernyugalom hossza szabja meg (Faust és mts., 1997; Rohde és Bhalerao, 2007; Ruiz et al, 2007; Heide, 2008; Hanninen és Tanino, 2011). A nyugalmi állapot kialakulását és megszűnését szabályozó komplex genetikai hálózat egyes elemeit a közelmúltban azonosították (Yang és mts., 2005; Alisoltani és mts., 2015). A mérsékelt égövi fás növények, köztük a *Prunus* fajok esetében is a CBF és DAM gének játszanak meghatározó szerepet ezekben a jelátviteli folyamatokban (Saito és mts., 2013; Zhao és mts., 2018).

Csonthéjas gyümölcsök közül elsőként cseresznyében (Kitashiba és mts., 2002), meggyben (Owens és mts., 2002) és őszibarackban (Wisniewski és mts., 2011) azonosítottak CBF-típusú transzkripciós faktorokat kódoló géneket, később mandulában (Barros és mts., 2012) és japán kajsziiban (Guo és mts., 2014) is találtak homológ szekvenciákat. Munkánk célja CBF-szekvencia-homológok azonosítása volt kajsziiból (*P. armeniaca*), mivel erről a fajról még nem állt rendelkezésre hasonló adat, miközben gazdaságilag igen jelentős gyümölcsfaj, és termesztésének északi határán, a hűvösebb klímájú termőterületeken a korai virágzás komoly veszteséget okozhat a termesztőknek.

Mandula (Barros és mts., 2012) és őszibarack (Wisniewski és mts., 2011) CBF gének alapján tervezett primerekkel egy 756 bp hosszúságú, intron nélküli szekvenciát (*ParCBF1*) amplifikáltunk a 'Korai zamatos' genom DNS-éből (8. ábra). A PCR-termékek klónozása és szekvenálása után MegaBLAST analízist végeztük, melynek során az általunk izolált kajszi *ParCBF1* nagyfokú egyezést és szignifikáns homológiát mutatott a rokon *Prunus* fajok hasonló szekvenciáival. Az aminosav-szintű illesztés alapján azonosítani tudtuk az AP2 domént és a CBF-típusú fehérjék más, jellegzetes motívumait is (9. ábra). Az AP2 és PKK domének feltehetően a fehérje sejtmagi lokalizációját határozzák meg, ugyanakkor ugyanezek a domének a fehérje C-terminális oldalán található hidrofób aminosavakkal együttműködve befolyásolják a transzaktivációt (Carlow és mts., 2017). Ezek a fehérjedomének igen konzervatív elemei a funkcióképes CBF fehérjéknek (Jaglo és mts., 2001; Nakano és mts., 2006), jelenlétük ennek megfelelően szükséges feltétele annak, hogy a kajszi *ParCBF1* gén működőképes transzkripciós faktort kódoljon.

A *ParCBF1* molekuláris szerkezetének meghatározásához templátként az *Arabidopsis AtERF1*-DNS-kötő domén 3D modelljét használtuk, melyet Allen és mts. (1998) írt le nukleáris mágneses rezonancia módszer (NMR) segítségével. A minőségi értékeléshez használt GMQE és QMEAN mutatók alapján a modell megbízhatónak bizonyult és megfelelt az AP2 jellegzetes térszerkezetének, melynek fő elemei a három béta-lemez és egy, ezekkel majdnem párhuzamos alfa-hélix szerkezet (9. ábra). Ez a térszerkezet teszi lehetővé nyolc egymást követő aminosav kapcsolódását, melyek a DNS nagy árkához kötődnek, tovább erősítve az azonosított *ParCBF1* fehérje működőképességét. A CBF transzkripciós faktorok specifikusan kötődnek a CRT/DRE elemhez (Sakuma és mts., 2002), amely a *DAM* gének promóterében is megtalálható. Ezt a lehetséges szabályozási kapcsolatot az AP2 domén intakt szerkezete is alátámasztja.

A *Prunus* genom számos *CBF*-típusú gént tartalmaz. Ezek közül *in silico* analízissel hat *CBF* gént azonosítottak az őszibarack (Wisniewski és mts., 2014) és a *P. mume* (Zhao és mts., 2018) genomjában. A filogenetikai analízis alapján az általunk izolált kajszii szekvencia (*ParCBF1*) a rokon *Prunus* fajokból származó *CBF* szekvenciák homológja, mely szoros evolúciós kapcsolatot és funkcióbeli hasonlóságot jelez (10. ábra). Zhao és mts. (2018) filogenetikai vizsgálatai kimutatták, hogy a *PmCBF1* és a *PpCBF5* szekvenciák közös kládot alkotnak, így feltehetően homológ gének annak ellenére, hogy a különböző fajokban eltérő számokkal jelölték őket (ennek feltételezhetően az az oka, hogy a *CBF* gének számozása a leírásukat követően minden fajnál véletlenszerűen történt, és nem a *DAM* gének esetében látható módon, homológia alapján). A korábbi kutatások alapján várhatóan legalább öt további *CBF* génhomológ azonosítható lesz még kajsziban, a *ParCBF1* nyugalmi állapotot szabályozó szerepét igazolja, hogy legközelebbi homológjai hasonló funkciót töltenek be a mandula és a japán kajszii esetében is (Barros et al., 2012; Zhao és mts., 2018).

Őszibarackban és japán kajsziban hat *DAM* gént azonosítottak (Bielenberg és mts., 2008; Sasaki és mts., 2011), melyek közül kettő (*DAM5* és *DAM6*) bizonyítottan a mélynyugalom megszűnésének szabályozásához volt köthető az őszibaracki esetében (Yamane és mts., 2011b). A *ParDAM5* és *ParDAM6* részleges szekvenciáit japán kajszira (Yamane és mts., 2011a) és őszibarackra (Bielenberg és mts., 2008) tervezett génspecifikus primerek segítségével izoláltuk (11. ábra). A két szekvencia a homológiavizsgálat alapján közeli rokonságban áll a GenBank adatbázisban fellelhető *Prunus DAM* szekvenciákkal, melyet a filogenetikai analízis eredménye is bizonyított (14. ábra). A *ParDAM5-6* az *Arabidopsis SVP/AGL24* főcsoportba sorolódott, ahogy azt korábban a *P. mume DAM5-6* esetében is bizonyították (Yamane és mts., 2008). A *ParDAM5* aminosav szekvencia-illesztése alapján a MADS-box fehérjék II. típusú (MIK^C) alcsaládjára jellemző összes fontos fehérjedomént (MADS-domén, I-régió és K-domén) (Horvath, 2015) azonosítani tudtuk (12. ábra).

A MADS-domén szerkezeti modelljéhez (12b. ábra), mivel növényi eredetű homológ szekvenciák 3D szerkezete jelenleg nem ismert, az emberi MEF2 protein szolgált templátként, melyek MADS doménja szintén DNS-kötő funkciót lát el (Huang és mts., 2000). A K- (keratinlike) domén esetében az *Arabidopsis* *Sepallata* 3 MADS transzkripciós faktor 3D modelljét (Puranik és mts., 2014) használtuk. A GMQE és QMEAN mutatók alapján mindkét szerkezeti modell megbízható volt. Ezek az eredmények megerősítik a *P. armeniaca* DAM5 és DAM6 transzkripciós faktorokat kódoló gének működőképességét.

Számos más faj esetében elérhetők olyan szekvenciák, melyek működőképes DAM-típusú géneket reprezentálnak. A szekvencia-illesztések alapos vizsgálata során így lehetőség volt olyan aminosav-pozíciók és kisebb motívumok azonosításra, melyek kifejezetten a DAM5 és DAM6 génekre jellemzőek, és jól elkülöníthetik őket a többi DAM szekvenciától. A DAM5 aminosav-szekvencia esetében tizenegy ilyen eltérést találtunk, melyből hat a konzervatív régiókban (MADS-, és K-domén, I-régió) található, öt pedig a C-terminális régióban. Egyik ezek közül a K-domént *downstream* irányból szegélyező indel régió. (12a. ábra). A 75 aminosav hosszúságú DAM6 szekvenciában szintén azonosítottunk hat jellegzetes elemet (13. ábra). A Bielenberg és mts. (2008) által közölt hat őszibarack DAM fehérje illesztésében a 260 aminosavból 122 pozíció változatlan volt. Úgy tűnik, a konzervált aminosav-régiók a biológiai funkció szempontjából kulcsfontosságúak. Az egyes génspecifikus szekvenciák pontos funkciójának felderítése számos új kutatási lehetőséget rejt magában.

6.2. A *ParCBF1* szerepe a hideg indukálta jelátviteli hálózatban

A *ParCBF1* gén a csökkenő hőmérséklet hatására nagymértékben expresszáldott. 2015-ben a csúcserőteket decemberben mértük, ami a meteorológiai mérések alapján a 2015/16-os nyugalmi periódus leghidegebb hónapja volt. Az ezt követő enyhe időszakban a *ParCBF1* expressziója lecsökkent. 2017-ben a január hónap összességében jóval hidegebb volt, mint 2016-ban, és a *ParCBF1* expressziójában nem következett be jelentős mértékű csökkenés (17. ábra). A CBF gének a hőmérséklet csökkenésére gyorsan indukálódnak *Arabidopsis* növényekben (Stockinger és mts., 1997; Liu és mts., 1998), de fás növényeknél is megfigyelték ezt a tendenciát alma (Wisniewski és mts., 2011), mandula (Barros és mts., 2012) és japán kajszli vizsgálata során (Guo és mts., 2014; Zhang és mts., 2013). A *ParCBF1* jellegzetes expressziós mintázata igazolja az alacsony hőmérsékleti stresszválaszban betöltött szerepét.

Az eddig azonosított *Rosaceae* DAM5-6 gének promóterrégiója tartalmazza a CBF transzkripciós faktorok kötőhelyét képező jellegzetes CCGAC motívumot (Wisniewski és mts. 2011; Yamane és mts., 2011a; Mimida és mts., 2015; Zhao és mts., 2018), ami arra utal, hogy

ezek a gének is részei a CBF-regulonnak. A *ParDAM5* és *ParDAM6* gének, őszibarack- és japán kajszi-homológjaikhoz hasonlóan (Yamane és mts., 2011a,b; Zhao és mts., 2018), nagymértékű transzkripciós aktivitást mutattak a nyugalmi időszak kezdetén, melynek mértékét elsősorban a hidegindukálható *ParCBF1* expressziós rátája, valamint a fajta hidegigénye határozott meg (17. ábra). A *ParDAM5* és *ParDAM6* expresszója és a minimum hőmérsékleti értékek között összefüggés mutatható ki: 2015 decemberében, ahol a mintagyűjtés napján hidegebb volt, mint a 2016-os évben (M.2.2. melléklet), mind a négy fajta estében nagyobb *ParCBF1* és *DAM5-6* expressziós értékeket mértünk.

A nyugalmi időszak második felében szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a korai- és kései virágzású kajszi-fajták expressziós mintázatában, ami arra utal, hogy a *ParDAM5-6* működését az adott fajtára jellemző, a mélynyugalom megszűnéséhez szükséges hidegigény is befolyásolja. A *ParDAM6* esetében ez az eltérés 10–14 nappal később mutatkozott meg, ami arra utal, hogy a két kajszi *DAM* gén szabályozása kissé eltérően működik (17. ábra). A japán kajszi *DAM* gének expressziós szintje korrelált a promóterrégiójukban található CBF-kötőhelyek számával. A hat génből a *PmDAM5* és *PmDAM6* rendelkezett a legtöbb ilyen kötőhellyel, és a legnagyobb mértékű expresszió is ezeket a géneket jellemezte (Zhao és mts., 2018). A különbséget tehát a CBF-kötőhelyek számában való eltérés is okozhatja.

6.3. A vizsgált kajszi-fajták mikrosporafejlődés-menete és hidegigénye közötti összefüggés

A pollenanyasejtek meiózisos osztódása számos irodalmi adat szerint a mélynyugalmi szakasz végét jelzi (Szalay és mts., 1999; Szabó és mts., 2002; Szalay és mts., 2006; Julian és mts., 2011; Julian és mts., 2014). Julian és mts. (2011) megfigyelése alapján a portok-kezdeményekben található diploid sporogén szövet az ősz folyamán, a nyugalmi időszak kezdetére már kialakul. A pollenfejlődés ezt követően szünetel és a mélynyugalom megtörése után folytatódik a mikrosporák kialakulásával. Az általunk vizsgált kajszi-fajtáknál a négy utódsejtes ún. „tetrád” fázis szintén a mélynyugalmi periódus végén volt megfigyelhető (16. és 17. ábra). A tetrád állapotot a kései virágzású fajtáknál mindkét évben 7-8 nappal később figyeltük meg, mint a korán virágzó fajtáknál. Julian és mts. (2014) hasonló eredményről számol be öt eltérő hidegigényű és virágzási idejű kajszi-fajta pollenfejlődésének vizsgálata során. Ennek alapján megállapítható, hogy a pollenfejlődés folyamata genetikai szabályozás alatt áll, és függ az adott genotípus hidegigényétől.

A hím gametofiton kialakulására a külső hőmérséklet is hatással van, ami lehetővé teszi, hogy a folyamat csak kedvező időjárási körülmények esetén induljon meg, ezáltal elkerülhető a fejlődő virágszervek károsodása. Ennek megfelelően a genotípus okozta különbségek mellett a két nyugami időszak között is láttunk eltéréseket a pollenfejlődés ütemében (17. ábra). A 2016/17-es időszakban mind a korai, mind a kési virágzású fajtáknál az előző évhez képest nagyjából egy héttel később figyeltük meg a mikrosporogenezis egyes fázisait. Ennek ellenére 2017-ben a virágzási időben csupán egynapos eltérést rögzítettünk az előző évhez képest (5. táblázat). Ennek lehetséges oka, hogy a hideghatás felhalmozódása 2015/16-ban január 15. után sokkal intenzívebb volt, így a fajták feltehetően hamarabb megkapták a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegmennyiséget (15. ábra). Julian és mts. (2014) hasonló különbségeket figyelt meg hidegebb és enyhébb évjáratokat összehasonlítva néhány mediterrán kajszifajta esetén. Enyhébb teleken a közepes- és nagy hidegigényű fajták pollenfejlődése számottevő késéssel ért a tetrád fázisba, mivel a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigényt a fák később kapták meg. Habár a virágzás időpontját elsősorban szintén a genetikailag rögzített hidegigény szabja meg, évről évre egyéb tényezők (a virágzás előtti hőmérséklet, a napsugárzás intenzitása stb.) is módosíthatják (Rodrigo és mts., 2002; Ruiz és mts., 2007; Julian és mts., 2014).

6.4. A kajszifajták hidegigénye és *ParDAM5-6* expresszió közötti kapcsolat

A rögzített hőmérsékleti adatok alapján a két vizsgálati időszak időjárási körülményei jelentősen eltérnek egymástól (M.2.2. melléklet). A hidegfelhalmozódás mértéke a nyugalmi időszak első felében 2016/17-ben intenzívebb volt, míg a nyugalmi időszak második felében ebből a szempontból a 2015/16-os időszak volt hatékonyabb (15. ábra). A mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegmennyiség 2016/17-ben minden fajtánál alacsonyabb volt (5. táblázat). Eredményeink alátámasztják Viti és mts. (2010) megfigyeléseit, miszerint enyhébb nyugalmi periódusban a vizsgált fajták (melyek között a ‘Goldrich’ is szerepelt vizsgálatukban) hidegigénye kisebb volt a hidegebb évjáratokhoz képest. A két modellt összehasonlítva a dinamikus modell az Utah modellnél kisebb eltéréseket mutatott a két évjárat között. A dinamikus modell ennek alapján a hűvösebb klímájú területeken is pontosabb eredményeket adhat, ahogyan azt korábban a melegebb, mediterrán éghajlatú területeken tapasztalták (Ruiz és mts., 2007; Viti és mts., 2010).

A korai virágzású fajták esetében a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigény mindkét nyugalmi időszakban kisebb volt a kései virágzású fajtákhoz képest (5. táblázat). Az ‘Aurora’ átlagos hidegigénye Utah CU egységben kifejezve hasonló volt a Viti és mts. (2006)

által mért 1140 ± 60 átlagértékhez, még a ‘Goldrich’ esetében valamivel nagyobb hidegigényt határoztunk meg a Spanyolországban és Olaszországban mért adatokhoz képest (Viti és mts., 2010). A ‘Stella’ és a ‘Zard’ hidegigényéről nem található publikált adat. Eredményeink alapján mindkét fajta nagyobb hidegigénnyel rendelkezik, mint a két korai virágzású fajta (5. táblázat).

Az ‘Aurora’ és a ‘Goldrich’ mélynyugalmi állapota január 31. és február 6. között ért véget, a két évjárat között mindössze 1–2 napos eltérést figyeltünk meg. Habár a hideg-felhalmozódás intenzitása elérően alakult a vizsgált két nyugalmi időszak során, a különbségek január második felére eltűntek, ami megmagyarázza, miért következhetett be a mélynyugalom megtörése mindkét évjáratban közel azonos időpontban (15. ábra). A kései virágzású fajtáknál az évjáratok közötti különbség 7 (‘Zard’) és 8 (‘Stella’) nap volt. Ez feltehetően annak a következménye, hogy 2016/17-ben a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hideghatás felhalmozódása lassabban következett be.

Eredményeink alapján a vizsgálatba bevont korai és kései virágzású fajták mélynyugalmi állapota február elején-közepén ér véget (17. ábra). A *ParDAM5-6* expresszió mértéke január elejétől (2015/16), illetve december közepétől (2016/17) erőteljesen csökkenni kezdett. A mélynyugalmi szakasz végét jelentő 4–6 hétben mindkét vizsgálati időszakban szignifikáns ($P \leq 0,05$) különbségeket mértünk a *ParDAM5-6* gének expressziójában a korai (‘Aurora’ és ‘Goldrich’) és a kései (‘Stella’ és ‘Zard’) virágzású fajták között (17. ábra). Yamane és mts. (2011b) feltételezik, hogy a *P. persica DAM5-6* gének a mélynyugalomban lévő rügyek dózisfüggő növekedési inhibitoraiként működnek, és a kis hidegigényű fajtánál kisebb expressziós szintet mértek, mint a nagyobb hidegigényű fajtáknál (Yamane és mts., 2011c). A *P. armeniaca DAM5-6* gének nagyobb expressziós szintje hosszabb nyugalmi állapotot és késői virágzást idézett elő a ‘Stella’ és a ‘Zard’ esetében, ami alapján arra következtethetünk, hogy a *ParDAM5* és *ParDAM6* kajszinál is hasonló funkciót tölt be.

Magyarország átlaghőmérséklete az elmúlt évszázadban közel $0,8$ °C-kal emelkedett (Lakatos és mts., 2011). Ennek hatására utóbbi 24 év vizsgálatai alapján a kajszifajták mélynyugalmi periódusa 19–23 nappal tolódott korábbra, még virágzásuk átlagosan 3 nappal korábban következik be (Szalay és mts., 2019). A csonthéjas gyümölcsfajok, köztük a kajszi virágrügyek nyugalmi állapotát szabályozó gének azonosítása és működésük jellemzése kulcsfontosságú információkkal szolgál a termesztőknek és a nemesítőknek. Az újonnan azonosított *ParCBF1*, a *ParDAM5* és a *ParDAM6* gének rendelkeznek azokkal a szerkezeti sajátosságokkal, valamint a genetikailag és környezeti tényezők által meghatározott expressziós mintázattal, ami valószínűsíti, hogy ezek a gének fontos elemei a kajszi nyugalmi állapotát szabályozó molekuláris rendszernek.

6.5. A *P. persica* NAC1 allél mutációinak jellemzése

Az őszibarack *PpNAC1* génben bekövetkezett 9 bp inszerció az első leírt funkcióvesztéssel járó mutáció a fehérje C-terminális régiójában (Pirona et. al, 2013), amely szerkezeti tulajdonságai alapján feltehetően transzkripciós aktivációs doménként működik (Olsen és mts., 2005). Korábban egy *Petunia* NAC-génben azonosítottak egy 6 bp inszerciót, ami egy transzpozon beékelődése, majd kivágódása következtében keletkezett, és két extra aminosav beépülésével működésképtelenné tette a gén által kódolt fehérjét (Souer és mts., 1996). A *PpNAC1*-ben található 9 bp inszerció szintén egy transzpozon lenyomata (footprint) vagy egy inszercióval kialakult direkt ismétlődés lehet. Egy nemrég azonosított, nem-autonóm transzpozon, a *FaSt*, mely gyakran előfordul az őszibarackgenomban, a transzpozíció során 9 bp-os direkt ismétlődéseket hoz létre (Halász és mts., 2014). A célszekvencia ugyan meglehetősen különbözik az *PpNAC1*-ben találhatóától, mely többnyire C-t és G-t tartalmaz, míg a *FaSt* transzpozon az A-ban és T-ben gazdag régiókba ékelődik. Ennek ellenére egy mutátor típusú transzpozon szerepe nem zárható ki a 9 bp-os inszerció létrejötté során. Az inszerció jelenléte ezenkívül magyarázható még egy, a DNS-replikáció során a szomszédos CCGA-ismétlődések között bekövetkezett elcsúszással („slippage”). Az *indel* pozíció után egy CCCGTACGGG palindrom szekvencia található (20. ábra), mely gyakran okoz inszerciót/deléciót a replikáció során kialakuló hajtűhurok-szerkezet miatt (Montgomery és mts., 2013).

Az őszibarack esetében már ismert polimorfizmuson kívül újabb faj- illetve fajtaspecifikus szekvenciabeli különbségeket is sikerült azonosítani (7. táblázat). Egy CATT-ismétlődés található a *P. persica*, a *P. dulcis* és a *P. cerasus* ‘Kántorjánosi’ 2 szekvenciák 3’ UTR régiójában, míg a kajszi-, szilva-, valamint a többi öt meggy-szekvenciákban ez a motívum csak egy példányban található meg. A meggy esetében egy 1 bp inszerció található a CATT motívumtól *upstream* irányba, 4 bp távolságra (20. ábra). A felsorolt példákban látszik, hogy a *Prunus* fajokból származó NAC gének ezen szakaszán igen gyakran történtek különböző mutációs események.

A magyaváló francia őszibarack fajták, mint a ‘Belle Garde’ és a ‘Reine des Vergers’, a 19. század második felében váltak népszerűvé Magyarországon. Ezek a fajták kései, szeptemberi érésűek, csakúgy, mint a többi sárgahúsú tájfajta (pl. ‘Crosby’, ‘Elberta’, ‘Lady Palmerston’, ‘Magyar aranyduránca’, ‘Mezőkomáromi duránca’, ‘Württembergi király’) (Rapaics, 1940; Mohácsy, 1954). Hazánkban emiatt terjedt el maga az „őszibarack” elnevezés. Az USA-ban indított nemesítési programokban eközben a korai érést tűzték ki célul. A fragmentumhossz analízis eredménye alapján a *PpNAC1*-ben bekövetkezett, korai érést előidéző mutációra heterozigóta ‘Amsden’ (M.2.1. melléklet) volt az első korai érésű fajta, mely Magyarországon is

elérhetővé vált, és 2012-ig ültetvény-telepítésre is engedélyezték (Nemzeti Fajtajegyzék, 2012). Azóta az inszerciót tartalmazó allél elterjedésével számos országban egyre inkább a korai, nyári hónapokban érő fajták uralják a piacot. Akagi és mts. (2016) szintén erős szelekcióról számoltak be a 4-es kromoszóma *PpNAC1* körüli régiójában, a teljes genomra kiterjedő SNP-polimorfizmus vizsgálata alapján.

Mivel a *PpNAC1* bizonyítottan meghatározó szerepet játszik az őszibarack érési idejének szabályozásában, felmerült a kérdés, hogy vajon rokon fajok esetében is van-e hasonló szekvenciabeli különbség az eltérő időben érő fajták között. A 2. táblázatban felsorolt fajtákból származó mintákkal szintén PCR-vizsgálatot végeztünk az őszibarackra tervezett (Pirone és mts. 2013) primer-párral, majd az amplikonokat klónoztuk és szekvenáltattuk. Kajszi, európai szilva és mandula esetében kettő, míg a meggyből hat, a *PpNAC1*-gyel homológ, részleges szekvenciát azonosítottunk (20. ábra). Az őszibarack korai érését okozó 9 bp-os inszerciót nem találtuk meg a többi *Prunus* szekvenciában, ellenben számos egyéb nukleotid-polimorfizmus fellelhető volt a kérdéses génszakaszon, melyek módosíthatják a fehérje funkcióját (20. ábra és 7. táblázat).

A három nem-konzervatív- és egy non-szensz aminosav cserét okozó mutációt a kajszi és a meggy korai érésű fajtáiban ('Korai zamatos' és 'Korai pipacsmeggy') találtuk meg (20. ábra). A 'Korai zamatos' fajtában két szekvencia-variációt azonosítottunk, melyek csupán a gén 3' UTR - régiójában térnek el egymástól. Mindkét szekvencia esetében egy cisztein → guanin csere történt közvetlenül a funkcióját veszített őszibarack allélban található inszerció előtt *upstream* irányban, mely a kései érésű 'Corlate' fajtából származó allélban nem található meg. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy ez a nem konzervatív aminosav csere összefüggésben állhat a korai éréssel a 'Korai zamatos' fajta genomjában. A 'Korai pipacsmeggy' június közepén érik, nagyjából három héttel megelőzve a 'Kántorjánosi 3' fajtát. Érdekes módon a korai fajta kétféle *NAC* szekvencia-változatot hordoz, melyek közül az egyikben egy nem-konzervatív prolin → szerin aminosavcsere történt. A *NAC* fehérjék C-terminális régiójában több olyan misszensz mutációt leírtak, melyek funkcióvesztést eredményeztek a szerkezeti instabilitás vagy a fehérjetranszport gátlása következtében (Takada és mts. 2001). Minthogy a cisztein és a prolin a diszulfidhidak kialakításában játszik szerepet, valamint képes a helikális szerkezeti elemek megtörésére (Patthy, 2008), egy ilyen aminosav-módosulás nagymértékben gátolhatja egy fehérje normális működését.

A *P. cerasus* 'Korai pipacsmeggy' 2. szekvenciában egy korai stopkodon található a *PpNAC1* inszerciótól 3' irányban, 6 bp távolságra (20. ábra). Ez várhatóan 18 aminosavval rövidíti meg a fehérje C-terminális végét, mely komoly hatással lehet a funkcióképességére. Ez az eltérés nem található meg a kései érésű 'Kántorjánosi 3' alléljában, mely azonban számos szinonim SNP-t és konzervatív aminosav-cserét tartalmaz. A másik korai meggyfajta, a 'Piramis'

esetében két, kissé eltérő allélt azonosítottunk, a szekvenciabeli különbségek azonban nem jelentősek így feltehetően nincsenek hatással a fehérje működésére. A gén további régióit azonban érdemes lenne elemezni más lehetséges mutációk azonosítása érdekében.

A diploid őszibarack esetében munkánk során statisztikai elemzéssel is alátámasztottuk a *PpNAC1* gén érési időt szabályozó hatását, melyet a működésképtelen allélok száma határoz meg (6. táblázat). A funkciójukat veszített *NAC* allélok elemzése rávilágíthat a poliploid növények genomjában, nagyobb kópiaszámban jelen lévő allélok közötti interakcióra. A poliplod fajok genomjában gyakrabban halmozódnak fel mutációk, ha a paralóg génpár egyik tagja mentesül a szelekciós nyomás alól, mint ahogy azt a meggy *S*-haplotípusok estében megfigyelték (Tsukamoto és mts., 2006). A poliploid európai szilva- és a meggy-szekvenciáinak mutációs gyakorisága a vizsgált génszakaszon nem különbözött a diploid fajokétól (7. táblázat), ami azt jelzi, hogy feltehetően mindegyik funkcióját veszített allél közvetlen hatással lehet az érési idő alakulására a poliploid fajokban is. Az általunk végzett homológia-alapú vizsgálat bizonyítékkal szolgál arra, hogy a diploid kajszis és mandula, a tetraploid meggy, valamint a hexaploid európai szilva genomja olyan homológ *NAC*-szekvenciákat hordoz, melyek az érési időt szabályozó, fő gének közé tartoznak. Ezt a cseresznye és kajszis esetében végzett QTL-térképezés eredményei is megerősítik (Dirlewanger és mts., 2012).

Habár a rokon fajokban azonosított mutáns allélok pontos funkciója még feltérképezésre vár, a *Prunus* genomok közötti igen jelentős szinténia miatt (Dondini és mts., 2007; Olmstead és mts., 2008; Dirlewanger és mts., 2012) minden bizonnyal befolyásolják az érési idő alakulását a vizsgált kajszis- és meggyfajták esetében. Diploid fajoknál, mint az őszibarack, a *PpNAC1* lókuszt alléljainak meghatározása alapján már viszonylag megbízható előrejelzést tehetünk az adott genotípus érési idejére, és a legtöbb fajta esetében használható, függetlenül annak eredetétől. Poliplod fajoknál, mint az európai szilva és a meggy, ez összetettebb feladat, hiszen szükség van az összes allél teljes szekvenciájára, hogy minden, vélhetőleg funkcióképtelen variációt azonosítani lehessen. Egy genotípuson belül ráadásul az egyes allélvariánsok száma és egymással való kölcsönhatása is befolyásolhatja az érési idő alakulását. Az egyes rokon *Prunus* fajok *NAC*-lókuszában kimutatott allél-változatok alapján egy megbízható, költséghatékony molekuláris diagnosztikai módszer (allél-specifikus PCR, PCR-RFLP, nagyfelbontású olvadáspont analízis) is kidolgozható, melynek segítségével az érési idő akár már magonc korban költséghatékony módon meghatározható lehet.

6.6. A *PpNAC1* funkcionális markerként való alkalmazhatósága

Az őszibarack *NAC* gén C-terminális régiójában található 9 bp inszerció jelenléte és a korai érés között feltételezhető összefüggést Pirona és mts. (2013) két hasadó populáción végzett vizsgálatai valószínűsítették. Munkánk során 125, eltérő érésidejű őszibarackfajtát genotipizáltunk, hogy igazoljuk a *PpNAC1* gén hatását és molekuláris markerként való alkalmazhatóságát. A statisztikai elemzések (szignifikancia-vizsgálat chí-négyzet próbával, Goodman-Kruskal mutató) a két változó, a *NAC*-genotípus és az érési idő-kategória között igen szoros kapcsolatot mutattak ki (6. táblázat). Az eredmények alapján tehát a *PpNAC1* megbízható marker lehet az őszibarack nemesítés során az érési időre történő szelekció esetében.

Mind a korai, mind a kései érési kategóriában találtunk olyan fajtákat, melyek genotípusa eltért ettől az általános tendenciától. A korai érésű 'Favorita Moretti' (július első dekádja) és 'Kínai 8' (július második dekádja) a 192 bp allélra voltak homozigóták, a kései érésű 'Royal Pride' (augusztus vége), 'Harken' és 'Orion' (szeptember 1. dekádja) pedig a 201 bp allélt hordozták homozigóta formában. Ez arra utal, hogy az érési idő meghatározásában más lókuszek is közreműködnek, hiszen a *NAC* fehérjék egy összetett hálózat részei, mely több, a gyümölcséréshez köthető folyamatot szabályoz (Nuñez-Lillo és mts., 2015; Shan és mts., 2012).

Erre jó példa az igen kései érésű 'Vérbarack', melynek vörös hússzínét a gyümölcs mezokarpiumában felhalmozódó antocianin okozza (Mohácsy, 1954). Shen és mts. (2013) eredményei alapján a *PpNAC1* heterodimert képez egy másik *NAC*-típusú gén termékével, mely a „vérbarack”-fenotípus kialakításáért felelős. Ez a gén az 5-ös kapcsoltsági csoporton található és a vörös húsú őszibarack fajtákban sokkal nagyobb mértékben fejeződik ki, mint a hagyományos hússzínű fajtákban. A heterodimer aktiválja a *PpMYB10.1* transzkripciós faktort, mely az antocianin felhalmozódásáért felelős a gyümölcshúsban (Zhou és mts., 2015). Az általunk vizsgált korai és középidei érésű fajták között nem találni vörös hússzínű genotípusokat (M.2.1. melléklet). A kódoló szekvenciában bekövetkezett 9 bp-nyi inszerció következtében a *PpNAC1* gén feltehetően funkcióvesztéses mutációt szenvedett, mely nem csak korai érést eredményez, hanem az antocianin-felhalmozódást szabályozó *NAC*-heterodimerek képződését is gátolja. Ez megmagyarázná, miért figyelhető meg szoros összefüggés a „vérbarack” fenotípus és a kései érési idő között annak ellenére, hogy e két tulajdonságot kódoló gének eltérő kromoszómákon helyezkednek el (Pirona és mts., 2013; Zhou és mts., 2015).

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A hazai csonthéjas gyümölcs-termesztés számára az elmúlt pár évtizedben kritikus tényezővé vált a téli–koratavaszi időszakban tapasztalható szélsőséges hőmérsékletingadozás. A mérsékelt égövi fafajok, így gyümölcstermő növényeink életciklusa is aktív- és nyugalmi periódusra osztható. A mélynyugalmi állapot genetikailag rögzített tulajdonság, melynek segítségével a növény átvészeli a növekedés és fejlődés szempontjából kedvezőtlen időszakot. A mélynyugalom bizonyos mennyiségű hideghatásra ér véget, az ezt követő kényszernyugalmi időszakban a fejlődési folyamatok megindulását a külső környezeti hatások szabályozzák. Ma már számos fás növény, köztük több *Rosaceae* családba tartozó faj esetében azonosítottak olyan fehérjéket kódoló géneket, melyek a nyugalmi állapot szabályozásában vesznek részt.

Munkánk során két ilyen transzkripciós faktort kódoló géncsalád, a *CBF* (*C-repeat binding factor*) és a *DAM* (*dormancy associated MADS-box*) egy-egy tagjának vizsgálatát végeztük el kajszai (*Prunus armeniaca* L.) esetében. Irodalmi adatok alapján a *CBF* gének gyorsan indukálódnak az alacsony hőmérséklet hatására és a fagytűrés szempontjából jelentős, ún. *COR* (*cold-regulated*) gének aktiválást végzik. A *DAM* gének olyan, MIKC-típusú MADS-box transzkripciós faktorokat kódolnak, melyeknek a nyugalmi állapot szabályozásában van szerepük. Őszibarackban hat *DAM* gén ismert, melyek közül feltehetően a *DAM5* és *-6* felelősek a nyugalmi állapot kialakításáért (Bielenberg és mts., 2008).

Kajszai genomi DNS-ből az 756 bp hosszúságú *ParCBF1*, valamint a *ParDAM5* (729 bp) és *ParDAM6* (230 bp) szekvenciákat izoláltuk, melyhez a szakirodalomban fellelhető, őszibarackra tervezett primerpárokat használtunk (Wisniewski és mts., 2011; Yamane és mts., 2011a; Bielenberg és mts., 2008). A fragmentumokat klónozást követően szekvenáltattuk, majd rokon fajok hasonló szekvenciáival homológvizsgálatot végeztünk a NCBI MegaBLAST algoritmusának segítségével. Mind a *ParCBF1*, mind a *ParDAM5* és *ParDAM6* nagyfokú egyezést mutatott más *Prunus* fajokból származó *CBF* és *DAM* génekkel. A rokonsági kapcsolatot filogenetikai elemzéssel is alátámasztottuk mind a *ParCBF*, mind a *ParDAM5* és *ParDAM6* szekvenciák esetében.

A szekvenciák következtetett aminosav-sorrendjének illesztésével azonosítottuk a *CBF* és *DAM* transzkripciós faktorok jellegzetes fehérje doménjeit. A fehérje-térszerkezet modellezésére alkalmas SWISS-MODEL (Arnold és mts., 2006) program segítségével elkészítettük a *ParCBF1* AP2 DNS-kötő doménjének, valamint a *ParDAM5* MADS- és K-doménjének modelljét. Mindhárom általunk izolált kajsziszekvenciában azonosítottuk a *CBF* és *DAM* transzkripciós faktorok jellemző motívumait, ami arra utal, hogy e fehérjék biológiai funkciója sértetlen.

Az újonnan azonosított *ParCBF* és *ParDAM5-6* géekkel expressziós vizsgálatokat is végeztünk két korai ('Aurora' és 'Goldrich') és két kései virágzású ('Stella' és 'Zard') kajszi fajta virágrügyeiből származó cDNS-mintákkal, két évjáratot (2015/16 és 2016/17) összehasonlítva. A *ParCBF1* génexpressziója mindkét évjáratban a nyugalmi időszak első felében volt a legnagyobb. E tekintetben szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a fagyérzékeny 'Aurora', valamint a fagyűrő 'Stella' és a 'Zard' között. A *ParDAM5-6* gének expressziója a nyugalmi időszak elején az összes fajta esetében emelkedni kezdett. A legnagyobb expressziós értékeket 2015 novemberében, illetve 2016 decemberében mértük, ezután mindkét gén transzkripcióját fokozatosan csökkenő tendencia jellemezte. A korai és kései virágzású fajták között szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a február 8-i mintagyűjtési időpontig. A *ParCBF1* és a *ParDAM5-6* gének transzkripciós aktivitása között egyértelmű kapcsolat mutatkozott a nyugalmi időszak első felében, amikor is a nagyobb *ParCBF1* expressziós értékeket mutató fajtáknál a *ParDAM5-6* esetében is magasabb expressziós szintet figyeltünk meg.

Mindkét vizsgálati időszakban nyomon követtük a kísérlethez kiválasztott kajszi fajta nyugalmi állapotát hidegigényük meghatározásával és a pollenfejlődés (mikrosporogenezis) folyamatának megfigyelésével. A növényeket ért hideghatás felhalmozódását az ún. hidegegység (chill unit) értékekben számoltuk ki a Utah modell (Richardson és mts., 1974) és hideg-adag (chill portion) értékekben a dinamikus modell (Fishman és mts., 1987) alapján. A hideghatás-felhalmozódás üteme a két modell alapján igen hasonlóan alakult, de az eredmények a dinamikus modell esetében sokkal homogénebbnek bizonyultak. A 2015/16-os nyugalmi időszak végére mindkét modellel számottevően nagyobb hidegmennyiség felhalmozódását határoztuk meg a 2016/17-es évjárhoz viszonyítva. A korai virágzású 'Aurora' és 'Goldrich' kisebb hidegigénnyel rendelkezett a kései virágzású 'Stella' és 'Zard' fajtákhoz képest.

A pollenfejlődés folyamatát mindkét vizsgálati időszakban mikroszkópos megfigyelésekkel követtük nyomon január és március között. Négy fejlődési állapotot tudunk elkülöníteni: archesporium (differenciálatlan szövetállomány); meiózis előtti szakasz (a pollenanyasejtek kialakulása és elkülönülése); a meiózist követő négy utódsejtes tetrád állapot és a mikrospórák, illetve a fejlődő pollenszemek. A 2016/17-es időszakban kb. kéthetes csúszást figyeltünk meg az előző évjárhoz képest, melynek oka feltehetően a január végén–február elején bekövetkezett hosszabb hideg periódus lehetett. A kései virágzású 'Stella' és a 'Zard' esetében a meiózis mindkét évben nagyjából egyhetes késéssel következett be a korai virágzású 'Aurora' és 'Goldrich' fajtákhoz képest.

A génexpressziós vizsgálatokat összevetettük a hideghatás-felhalmozódás, valamint a mikrosporogenezis vizsgálatok eredményeivel. Ennek alapján a *ParCBF1* aktivitását az alacsony hőmérséklet határozza meg, míg a *ParDAM5-6* expresszióját feltehetően részben a *ParCBF1*

transzkripció faktor, részben a vizsgált fajták hidegigényének teljesülése szabályozza. Megállapítottuk, hogy mind a korai, mind a kései virágzású kajszifajták virágrügyeiben a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigény teljesülésével a *ParDAM5-6* expressziója szignifikánsan lecsökken, és megjelenik a pollenenanyasejtek osztódását követő ún. tetrad állapot.

A gyümölcserés ideje gazdasági szempontból igen fontos tulajdonság, mely poligénes öröklődésű, ami különösen megnehezíti a szelekciót és az új fajták előállítását. A molekuláris markerezési eljárások alkalmazásával a keresztezésekből származó utódpopulációk vizsgálata és értékelése sokkal hatékonyabban megvalósítható, hiszen akár már csíranövény korban szelektálhatjuk a kívánt genotípusokat.

Őszibarackban (*Prunus persica* L.) Pirona és mts. (2013) azonosítottak egy NAC transzkripció faktor kódoló gént (*ppa008301m*), melyben egy inszerciós mutációnak köszönhetően kimutatható volt egy nagyobb méretű allél, ami együtt öröklődött a korai érésidővel. Vizsgálataink során egy érési idő tekintetében igen változatos őszibarack-fajtagyűjtemény genotipizálását végeztük el azzal a céllal, hogy a szűk genetikai háttérű növényanyagon felismert korábbi összefüggést statisztikailag megbízható adatokkal támasszuk alá. A Pirona és mts. (2013) által tervezett és fluoreszcens jelöléssel ellátott NAC-indel specifikus forward primer használatával 125 olyan őszibarack fajtából származó mintán végzetünk PCR reakciót, melyek érési ideje ismert. A PCR termékek fragmentumhossz-analízise alapján három jól elkülöníthető genotípust határoztunk meg: 1) homozigóta a 192 bp hosszúságú 'Lovell' fajtában leírt referencia allélra (Verde és mts., 2013), 2) homozigóta az inszerciót tartalmazó 201 bp hosszúságú allélra, 3) heterozigóta genotípus, mely mind a 192 bp, mind a 201 bp hosszúságú allélt hordozza. A statisztikai elemzés alapján (Cramer – féle V-teszt) a NAC-genotípus és az érési idő között szignifikáns kapcsolat volt kimutatható.

A rokon *Prunus* fajok szekvenciaillesztése nagyfokú egyezést mutatott az őszibarack referenciagenom megfelelő régiójával. Az őszibarack korai érésű fajtáira jellemző 9 bp inszerciót nem találtuk meg egyik vizsgált csonthéjas faj parciális NAC szekvenciájában sem, de számos más szekvencia-módosulást sikerült azonosítani. Diploid fajoknál, mint az őszibarack, a *PpNAC1* lókus alléljainak meghatározása alapján már viszonylag megbízható előrejelzést tehetünk az adott genotípus érési idejére. Poliplod fajoknál ez összetettebb feladat, hiszen szükség van az összes allél teljes szekvenciájára, ezen kívül az egyes allélvariánsok száma és egymással való kölcsönhatása is befolyásolhatja az érésidő alakulását. Eredményeink alapján az őszibarack *PpNAC1* gén funkcionális markerként alkalmazható a nemesítési alapanyag érési időre történő szelekciójára. A rokon fajok homológ szekvenciáiban azonosított allélvariációk

pedig szintén lehetővé teszik egy megbízható, korai szelekciót lehetővé tévő markerezési eljárás kidolgozását.

Vizsgálataink során a csonthéjas gyümölcsfák két gazdasági szempontból jelentős tulajdonságát (a virágzási időnek és az érésidőnek) meghatározó genetikai háttér felderítéséhez szolgáltatunk adatokat, melyek segítségével a nemesítési programokban jól használható, költséghatékony molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozására is mód nyílt.

8. SUMMARY

In the past few decades, extreme temperature fluctuations during winter and early spring become a critical issue for the Hungarian stone-fruit production. The life-cycle of temperate tree species, such as our fruit crops includes active and dormant periods. Endodormancy state is genetically determined, and it's essential for deciduous trees to survive unfavorable weather conditions during winter. Endodormancy-release occurs after a certain amount of chill and during the subsequent ecodormnacy state developmental processes are regulated by environmental factors. In the last few years, a number of dormancy-related genes have been identified in case of woody plants, including several species from *Rosaceae* family.

One of the aims of our study was to evaluate two of these transcription factor-coding gene families, the *CBF* (*C-repeat biding factor*) and the *DAM* (*dormancy associated MADS-box*) in apricot (*Prunus armeniaca* L.). According to previous studies *CBF* genes induce quickly at low temperature, activating the frost tolerance-related *COR* (*cold-regulated*) genes. The *DAM* genes belong to the MIKC-type MADS-box transcription factor coding genes and their main role is to regulate endodormancy. Six *DAM* genes have been described in peach (Bielenberg et al., 2008) from which *DAM5* and *DAM6* are probably responsible for endodormancy set and release.

The 756 bp length *ParCBF1*, *ParDAM5* (729 bp) and *ParDAM6* (230 bp) sequences have been isolated form apricot genomic DNA using primer pairs from previous studies on peach (Wisniewski et al., 2011; Jiménez et al., 2010; Bielenberg et al., 2008). After cloning and sequencing, a homology test was performed with sequences form other *Prunus* species using the NCBI MegaBLAST algorithm. All *ParCBF1*, *ParDAM5* and *ParDAM6* show high similarity to the *CBF* and *DAM* genes of other *Prunus* species. A phylogenetic analysis further supported the homology and functionality of these new *P. armeniaca CBF1* and *DAM5-6* genes.

The characteristic protein-domains of CBF and DAM transcription factors were identified using the alignment of the predicted amino acid sequences. The molecular model of the AP2 DNA-binding domain from *ParCBF1* and MADS- and K- domains from *ParDAM5* were made using the SWISS-MODEL server (Arnold et al., 2006). Typical molecular motifs of CBF and DAM transcription factors could be identified in all new apricot sequences, suggesting that these proteins are functionally intact.

To further study the functionality of the newly identified *ParCBF1* and *ParDAM5-6* genes, an expression analysis was made on flower bud cDNA samples from two early flowering ('Aurora' and 'Goldrich') and two late flowering ('Stella' and 'Zard') apricot cultivars, comparing two consecutive dormancy seasons. The highest *ParCBF1* expression levels were

detected during the first part of the dormant period in both years. Significant differences were observed between the frost-sensitive ‘Aurora’ and frost-tolerant ‘Stella’ and ‘Zard’. The *ParDAM6-5* expression started to increase at beginning of dormancy season in all cultivars. The highest transcript levels were detected in November (2015) and December (2016). After a considerable drop in *ParDAM5* and *ParDAM6* expression, significant differences were found between the early and late-flowering cultivars until 8 February. At the beginning of the dormant season, the expression levels of *ParDAM5* and *ParDAM6* were correlated with the *ParCBF1* expression rates: cultivars with higher *ParCBF1* transcript level had also increased *ParDAM5-6* expression rates.

Dormancy state of the four apricot cultivars was evaluated during both seasons by the definition of their chilling requirements and the observation of pollen development (microsporogenesis). Chilling accumulation was calculated in chill-units using the Utah model (Richardson et al., 1974) and in chill-portions using the Dynamic model (Fishman et al., 1987). Comparing the two models, tendency of chill accumulation was quiet similar but Dynamic model showed lower variation across years. During the dormant season of 2015/16 the amount of chill was considerably higher than in 2016/17. The early flowering ‘Aurora’ and a ‘Goldrich’ had lower chilling requirement in both years compared to the late flowering cultivars.

Pollen development was studied using optical microscope between January and March in both seasons. Four developmental stages were distinguished: archesporium (undifferentiated sporogenic tissue); premeiotic conditions (development and separation of pollen mother cells); tetrad (after meiosis) and microspores (development of pollen grains). In the second experimental season, there was a one-week delay in the process which might have been caused by low temperatures at the beginning of February. The late-flowering cultivars, ‘Stella’ and ‘Zard’ showed one-week delay in the timing of meiosis and the development of pollen grains in both years compared to the respective developmental stages of the early-flowering ‘Aurora’ and ‘Goldrich’.

Gene expression studies were compared to the chill-accumulation and microsporogenesis data. The activity of *ParCBF1* was mostly regulated by low temperatures, while *ParDAM5-6* transcript levels were changed according to the *ParCBF1* expression rates and the fulfilment of cultivar chilling requirements. The expression level of *ParDAM5-6* was significantly downregulated after the fulfilment of chilling requirement in case of all cultivars and the meiosis of pollen mother cells (tetrad stage) occurred after that.

As many important agronomic traits, fruit maturation day (MD) is also polygenic, which causes difficulties during selection and the improvement of new cultivars. Molecular diagnostic

assays would simplify the evaluation of breeding material and would make possible the selection of desired genotypes at early seedling age.

A NAC transcription factor coding gene (*ppa008301m*) has been found to be a strong candidate of a major gene influencing MD in peach (*Prunus persica* L.) by Pirona és mts. (2013). A 9 bp insertion in this gene resulted in earlier MD in two segregating peach populations. Our study was carried out to test whether this mutation in the *PpNAC1* gene can be used as a reliable functional marker for MD in a wide range of peach cultivars of various origins and phenotypic characters. A total of 125 peach cultivars were genotyped using the NAC-indel specific fluorescent forward primer designed by Pirona és mts. (2013). The fragment-length analysis represented three distinct genotypes: 1) homozygous for the 192 bp ‘Lovell’ reference allele (Verde et al., 2013), 2) homozygous for the 201 bp allele and 3) heterozygous cultivars carrying both the 192 bp and 201 bp alleles. Statistical analysis (Cramer's V test) confirmed a significant correlation between MD and NAC genotype.

The sequence alignment of related *Prunus* species show high level of homology with the respective region of the *P. persica* reference genome. The peach early MD-related 9 bp insertion couldn't be found in the partial NAC sequences of other stone fruit species used in this study, however, a number of other sequence modifications could be identified. In case of diploid species like peach, firm conclusions can be drawn for the MD category of a cultivar based on a simple allele-typing in the *PpNAC1* locus. In polyploid species the identification of additional alleles and the determination of complete gene sequences should be carried out to identify all presumably non-functional sequence variations in the locus, find out the interaction of several alleles and characterize their contribution to fruit MD. The results confirmed that the *PpNAC1* gene would be used as functional marker for the selection of breeding material in case of peach and sequence variations at the respective region of other related species may also be applied in marker assisted selection.

Our studies provided a set of new data about the genetic background of two important agronomic traits of fruit crops (flowering time and maturity date). These results would be useful in breeding programs and would provide an opportunity for designing reliable and cost-efficient molecular diagnostic assays.

9. ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: A <i>Prunus</i> 1-es kapcsoltsági csoport SSR markerek alapján történő összehasonlítása különböző fajok esetében, Dirlewanger és mts. (2004) alapján.....	9
2. ábra: Négy <i>Prunus</i> faj összehasonlító térképezésének eredménye Dirlewanger és mts. (2004) alapján.	11
3. ábra: A mérsékeltövi fás növények éves növekedési ciklusa (Hanninen és Tanino, 2011 alapján, módosítva)	14
4. ábra: A MIKC-típusú MADS-box fehérjék szerkezeti felépítése.	24
5. ábra: Egy NAC protein általános szerkezeti felépítése.	28
6. ábra: Az őszibarack 4. kapcsoltsági csoportjának összehasonlítása a Pirona és mts. (2013) által végzett kísérletben használt térképező populációk között, melyek a ‘NJ Weepy’ × ‘Bounty’ (W×By) és a ‘Contender’ × ‘Ambra’ (C×A) keresztezésekből származtak.	30
7. ábra: A ppa008301m szekvencia (PpNAC1 gén) kétféle allélvariációjának illesztése aminosav-sorrend alapján.....	31
8. ábra: Az őszibarackra tervezett, CBF-F jelű forward (Barros és mts. (2012) és a CBF1 R reverz primer (Wisniewski és mts. 2011) használatával amplifikált, különböző <i>Prunus</i> fajokból származó PCR-termékek detektálása agaróz-gélelektroforézissel.....	42
9. ábra: <i>Prunus</i> C-repeat binding factor (CBF) szekvenciák illesztése és a <i>Prunus armeniaca</i> CBF1 fehérje szerkezete.....	44
10. ábra: C-repeat binding factor (CBF)-gének prediktált aminosav-szekvenciáinak filogenetikai elemzése a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) módszerrel..	45
11. ábra: Az őszibarackra tervezett, DAM5- és DAM6 – specifikus primerek használatával amplifikált, különböző <i>Prunus</i> fajokból származó genomi, valamint kajszli cDNS-ből származó PCR-termékek detektálása agaróz-gélelektroforézissel.	47
12. ábra: <i>Prunus Dormancy-Associated MADS-box</i> gének részleges aminosav-szekvenciáinak illesztése és a <i>Prunus armeniaca</i> DAM5 fehérje szerkezete..	48
13. ábra: A <i>P. armeniaca</i> DAM6 parciális génszekvencia lefordított aminosav-szekvenciájának illesztése a japán kajszli (PmDAM6), az őszibarack (PpDAM6) és a mandula (PdDAM6) homológ szekvenciáival.	49
14. ábra: <i>Dormancy-associated MADS-box (DAM)</i> gének aminosav-szekvenciájának filogenetikai elemzése a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) módszer alapján.....	50

15. ábra: A hidegigény felhalmozódása hidegegység (chill unit) értékben (Utah modell) (a) és hideg-adag (chill portion) értékben (dinamikus modell) (b) megadva a 2015/16-os (fekete vonal) és a 2016/17-es (szürke vonal) nyugalmi időszak alatt.....	52
16. ábra: Fénymikroszkópos felvételek a kajszi (<i>Prunus armeniaca</i>) pollenfejlődésének (mikrosporogenezis) fázisairól.....	56
17. ábra: A <i>ParCBF1</i> , <i>ParDAM5</i> és <i>ParDAM6</i> gének expressziós mintázata kajszi (<i>Prunus armeniaca</i>) virágrügyekben két egymást követő nyugalmi időszakban.....	59
18. ábra: A fragmentumhossz-analízis által meghatározott <i>PpNAC1</i> genotípusok kromatogramja.....	61
19. ábra: Hús különböző csonthéjas gyümölcsfajta PCR-analízisének eredménye a NAC-indel specifikus primerpárral.....	63
20. ábra: Különböző <i>Prunus</i> fajokból származó, a <i>PpNAC1</i> -gyel homológ szekvenciák C-terminális és 3' nem transzlálódó régiójának (3' UTR) nukleinsav szintű illesztése..	64

10. TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat: Növényi transzkripciós faktor-családok és legfontosabb funkcióik.....	19
2. táblázat: Az őszibarack <i>PpNAC1</i> szekvencia-homológok vizsgálatához használt <i>Prunus</i> fajok	34
3. táblázat: A <i>ParCBF1</i> és <i>ParDAM5-6</i> homológok azonosításához alkalmazott primerek	36
4. táblázat: A <i>ParCBF1</i> és <i>ParDAM5-6</i> gének expressziós vizsgálatához tervezett primerek.....	38
5. táblázat: A kísérletben használt kajszifajták mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigénye a két vizsgálat nyugalmi időszakban (2015/16 és 2016/17)	54
6. táblázat: A <i>NAC</i> -genotípusok és az érési idő összefüggését bemutató kontingencia táblázat ..	62
7. táblázat: A <i>NAC</i> -proteint kódoló gén C-terminális régiójában kimutatható homológia és polimorfizmus az őszibarackkal rokon diploid és poliplod <i>Prunus</i> fajok esetében.....	65

11. MELLÉKLET

M.1 IRODALOMJEGYZÉK

- 1) Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. (1997): Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 9: 841–857.
- 2) Aida, M., Ishida, T., Tasaka, M., (1999): Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development*, 126: 1563–1570.
- 3) Akagi T., Hanad, T., Yaegaki H., Gradziel, T. M., Tao, R. (2016): Genome-wide view of genetic diversity reveals paths of selection and cultivar differentiation in peach domestication. *DNA Res* 23: 271–282.
- 4) Alberquerque, N., Garcia-Montiel, F., Carrillo, A., Burgos, L. (2008): Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environ Exp Botany*, 64: 162–170.
- 5) Alisoltani, A., Shiran, B., Fallahi, H., Ebrahimie, E. (2015): Gene regulatory network in almond (*Prunus dulcis* Mill.) in response to frost stress. *Tree Genet Genomes*, 11: p. 1-15.
- 6) Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., Suzuki, M. (1998): A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *Embo J*, 17: 5484–5496
- 7) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipmann, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J mol bio*, 215: 403-410.
- 8) Aranzana, M. J., Decroocq, V., Dirlwanger, E., Eduardo, I., Gao, Z. S., Gasic, K., Iezzoni, A., Jung, S., Peace, C., Prieto, H., Tao, R., Verde, I., Abbott, A. G., Arús, P. (2019): *Prunus* genetics and applications after de novo genome sequencing: achievements and prospects. *Hortic Res*, 6: 1-25.
- 9) Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. (2006): The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22: 195-201.
- 10) Artlip, T. S., Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Norelli, J. L. (2013): CBF gene expression in peach leaf and bark tissues is gated by a circadian clock. *Tree physiol*, 3: p. 866-877.

- 11) Badenes, M. L., Parfitt, D. E. (1995): Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theor Appl Genet*, 90: 1035-1041.
- 12) Baek, S., Choi, K., Kim, G. B., Yu, H. J., Cho, A., Jang, H., Kim, C., Kim, H. J., Chang, K.S., Kim, J.H., Mun, J. H. (2018): Draft genome sequence of wild *Prunus yedoensis* reveals massive inter-specific hybridization between sympatric flowering cherries. *Genome Biol*, 19: 127.
- 13) Bailey, C.H., Cowgill, W. and Hough, L.F. (1982). Estimate of chilling requirements of apricot selections. *Acta Hort*, 85: 184-189.
- 14) Barros, P. M., Goncalves, N., Saibo, N.J.M., Oliveira, M.M. (2012): Functional characterization of two almond C-repeat binding factors involved in cold response. *Tree Physiol*, 32: 1-16.
- 15) Bartholy, J., Pongrácz, R. Barcza, Z., Haszpra, L. Gelybó, G., Kern, A. Hidy, D. Torma, C., Hinyady, A., Kardos, P. (2007): The regional effects of climate change: Present state and the expected tendencies. *Földrajzi Közlemények*, 55: 257–270.
- 16) Bartolini, S., Viti, R., Guerriero, R. (2006). Xylem differentiation and microsporogenesis during dormancy of apricot flower buds (*Prunus armeniaca* L.). *Eur J Hort Sci*, 71: 84-90.
- 17) Becker, A., Theissen, G. (2003): The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*, 29: 464-489.
- 18) Benedict, C., Skinner, J.S. Meng, R., Chang, Y. Bhalerao, R., Hunter, N.P.A., Finn, C.E., Chen, T.H.H., Hurry, V. (2006): The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant Cell Environ*, 29: 1259–1272.
- 19) Benkert, P., Tosatto, S.C.E., Schomburg, D. (2008): QMEAN: a comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, 71: 261–277.
- 20) Bianchi, V. J., Rubio, M., Trainotti, L., Verde, I., Bonghi, C., Martínez-Gómez, P. (2015): *Prunus* transcription factors: breeding perspectives. *Front Plant Sci*, 6: 443.
- 21) Bielenberg, D.G., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G.L.R., Scorza, R., Abbott, A.G. (2008): Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet Genomes* 4: 495–507.

- 22) Bliss, F. A., Arulsekhar, S., Foolad, M. R., Becerra, V., Gillen, A. M., Warburton, M. L., Dandekar, A. M., Kocsisne, G. M., Mydin, K. K. (2002): An expanded genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between almond and peach. *Genome*, 45: 520-529.
- 23) Bookout, A. L., Magnelsdorf, D. J. (2003): Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 1: nrs-01012. DOI: 10.1621/nrs.01012
- 24) Brecht, J. K., Kader, A. A., Ramming, D. W. (1984): Description and postharvest physiology of some slow-ripening nectarine genotypes. *J Am Soc Hortic Sci*, 109: 596–600.
- 25) Brown, D.S., Kotob, F.A. (1957): Growth of flower buds of apricot, peach, and pear durin the rest period. *Proc Am Soc Hortic Sci* 69:158–164.
- 26) Campoy, J. A., Ruiz, D., Cook, N., Allderman, L., Egea, J. (2011): Clinal variation of dormancy progression in apricot. *S Afr J Bot*, 77: 618-630.
- 27) Campoy, J. A., Le Dantec, L., Barreneche, T., Dirlewanger, E., Quero-García, J. (2015): New insights into fruit firmness and weight control in sweet cherry. *Plant Mol Biol Rep*, 33: 783-796.
- 28) Carlow, C.E., Faultless, J.T., Lee, C., Siddiqua, M., Edge, A., Nassuth, A. (2017): Nuclear localization and transactivation by *Vitis* CBF transcription factors are regulated by combinations of conserved amino acid domains. *Plant Physiol Biochem*, 118: 306-319.
- 29) Castède, S., Campoy, J. A., García, J. Q., Le Dantec, L., Lafargue, M., Barreneche, T., Wenden, B., Dirlewanger, E. (2014): Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytol*, 202: 703-715.
- 30) Cline, M. G., Deppong, D.O. (1999): The role of apical dominance in paradormancy of temperate woody plants: A reappraisal. *J Plant Physiol* 155: 350–356.
- 31) Dirlewanger, E., Moing, A., Rothan, C., Svanella, L., Pronier, V., Guye, A., Plomion, C., Monet, R (1999): Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theor Appl Genet*, 98: 18-31.
- 32) Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W., Arús, P. (2004): Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *P Natl A Sci USA*, 101: 9891-9896.

- 33) Dirlewanger, E., Cosson, P., Boudehri, K., Renaud, C., Capdeville, G., Tauzin, Y., Laigret, F., Moing, A. (2006): Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit. *Tree Genet Genomes*, 3: 1-13.
- 34) Dirlewanger, E., Quero-García, J., Le Dantec, L., Lambert, P., Ruiz, D., Dondini, L., Illa, E., Quilot-Turion, B., Audergon, M., Tartarini, S., Letourmy, P., Arús, P. (2012): Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity*, 109: 280–292.
- 35) Dondini, L., Lain, O., Geuna, F., Banfi, R., Gaiotti, F., Tartarini, S., Bassi, D., Testolin, R. (2007): Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* map. *Tree Genet Genomes*, 3: 239–249.
- 36) Eduardo, I., Pacheco, I., Chietera, G., Bassi, D., Pozzi, C., Vecchietti, A., Rossini, L. (2011): QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect. *Tree Genet Genomes*, 7: 323-335.
- 37) Eduardo, I., Picañol, R., Rojas, E., Batlle, I., Howad, W., Aranzana, M. J., Arús, P. (2015): Mapping of a major gene for the slow ripening character in peach: co-location with the maturity date gene and development of a candidate gene-based diagnostic marker for its selection. *Euphytica*, 205: 627-636.
- 38) Egea, J., Ortega, E., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F. (2003): Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environ Exp Bot*, 50: 79-85.
- 39) Elo, A., Lemmetyinen, J., Turunen, M.-L., Tikka, L., Sopanen, T. (2001): Three MADS-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*). *Physiol Plantarum* 112: 95–103
- 40) Erez, A. (2000): Bud dormancy; phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. In: Erez, A. (Ed.), *Temperate Fruit Crops in Warm Climates*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 17–48.
- 41) Erez, A., Fishman, S. (1997): The dynamic model for chilling evaluation in peach buds. In *IV International Peach Symposium* 465: 507–510.
- 42) Faust, M., Erez, A., Rowland, L.J., Wang, S.Y. Norman, H.A. (1997): Bud dormancy in perennial fruit trees: physiological basis for dormancy induction, maintenance, and release. *HortScience*, 32: 623-629.
- 43) Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

- 44) Fennell, A. (1999). Systems and approaches to studying dormancy: Introduction to the workshop. *HortScience*, 34: 1172–1173.
- 45) Fishman, S., Erez, A., Couvillon, G. A. (1987): The temperature dependence of dormancy breaking in plants: mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *J Theor Biol*, 124: 473–483.
- 46) Galiba, G., Vágújfalvi, A., Li, C. X., Soltész, A., Dubcovsky, J. (2009): Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Sci*, 176: 12–19.
- 47) Gamboa, M.C., Rasmussen-Poblete, S. Venezuela, P.D.T., Krauskopf, E. (2007): Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globulus*. *Plant Physiol Biochem*, 45: 1–5.
- 48) Gao, Z., Zhuang, W., Wang, L., Shao, J., Luo, X., Cai, B., Zhang, Z. (2012): Evaluation of chilling and heat requirements in Japanese apricot with three models. *HortScience*, 47: 1826–1831.
- 49) Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., Thomashow, M. F. (1998): Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J*, 16: 433–442.
- 50) Giovannoni, J. J. (2004): Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16: S170–S180.
- 51) Gregis, V., Sessa, A., Dorca-Fornell, C., Kater, M. M. (2009): The Arabidopsis floral meristem identity genes AP1, AGL24 and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes. *Plant J*, 60: 626–637.
- 52) Guo, C., Zhang, J.Q., Peng, T., Bao, M.Z., Zhang, J.W. (2014): Structural and expression analyses of three *PmCBFs* from *Prunus mume*. *Biol Plantarum*, 58: 247–255.
- 53) Hajnal V., Németh S. Z., Szalay L., Vécsei A. (2013): Frost hardiness of overwintering organs of some promising foreign apricot cultivars in Hungary. *Acta Hort*, 981: 587–590
- 54) 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: 220–231.
- 55) Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S*, 41: 95–98.

- 56) Hanninen, H., Tanino, K. (2011): Tree seasonality in warming climate. *Trends Plant Sci*, 16: 412–416.
- 57) Harmer, S.L., Hogenesch, L.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Whang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000): Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 290: 2110–2113.
- 58) Heide, O.M. (2008): Interaction of photoperiod and temperature in the control of growth and dormancy of *Prunus* species. *Sci Hort*, 115: 309–314.
- 59) Heide, O.M., Prestrud, A.K. (2005): Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Phys*, 25: 109–114.
- 60) Hernandez, M. J. R., Micheletti, D., Bink, M., Van de Weg, E., Cantín, C., Nazzicari, N., Caprera, A., Dettori, M.T., Micali, S., Banchi, E., Campoy, J. A., Dirlewanger, E., Lambert, P., Pascal, T., Troggo, M., Bassi, D., Rossini, L., Verde, I., Quilot-Turion, B., Laurens, F., Arús, P., Aranzana, J.M. (2017). Integrated QTL detection for key breeding traits in multiple peach progenies. *BMC genomics*, 18: 404.
- 61) Hickman, R., Hill, C., Penfold, C. A., Breeze, E., Bowden, L., Moore, J. D., Zhang, P., Jackson, A., Cooke, E., Bewick-Copley, F., Mead, A. (2013): A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant J*, 75: 26–39.
- 62) Horvath, D. (2009): Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Sci*, 177: 523–531.
- 63) Horvath, D. P. (2015): *Dormancy-associated MADS-BOX* genes: a review. In: Anderson J. (eds) *Advances in Plant Dormancy* (pp. 137–146). Springer, Cham.
- 64) Horvath, D. P., Sung, S., Kim, D., Chao, W., Anderson, J. (2010): Characterization, expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX genes from leafy spurge. *Plant Mol Biol*, 73: 169–179.
- 65) Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., Xiong, L. (2008): Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 67: 169–181.
- 66) Huang, K., Louis, J. M., Donaldson, L., Lim, F. L., Sharrocks, A. D., Clore, G. M. (2000): Solution structure of the MEF2A–DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors. *Embo J*, 19: 2615–2628.
- 67) Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Halonen, M., Hohtola, A. (2001): Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol Biotechnol*, 19: 201–203.

- 68) Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T., Thomashow, M.F. (2001): Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol*, 127: 910–917.
- 69) Jedrzejuk, A. G. A. T. A., Szlachetka, W. (2005): Development of flower organs in common lilac (*Syringa vulgaris* L.) cv. Mme Florent Stepman. *Acta Biol Cracov Bot*, 47: 41–52
- 70) Jensen, M., Kjaersgaard, T., Nielsen, M., Galberg, P., Peterson, K., O'shea, C., Skriver, K. (2010): The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem. J*, 426: 183–196.
- 71) Jiménez, S., Reighard, G. L., Bielenberg, D. G. (2010): Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Mol Biol*, 73: 157-167.
- 72) Jin, J.P., Zhang, H., Kong, L., Gao, G., Luo, J.C. (2014): PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 42: D1182–D1187.
- 73) Jofuku, K. D., Den Boer, B. G., Van Montagu, M., Okamoto, J. K. (1994): Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, 6: 1211–1225.
- 74) Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput App Biosci* 8: 275–282.
- 75) Joobeur, T., Viruel, M. A., de Vicente, L. M., Jauregui, B., Ballester, J., Dettori, M. T., Quarta, R. (1998). Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond × peach F2 progeny. *Theor Appl Genet*, 97: 1034-1041.
- 76) Julian, C., Rodrigo, J., Herrero, M. (2011): Stamen development and winter dormancy in apricot (*Prunus armeniaca*). *Ann Bot-London*, 108: 617–625.
- 77) Julian, C., Herrero, M., Rodrigo, J. (2014): Anther meiosis time is related to winter cold temperatures in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Environ Exp Bot*, 100: 20–25.
- 78) Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A., Main, D. (2008): GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucleic Acid Res*, 36(suppl_1), D1034-D1040.

- 79) Kagaya, Y., Ohmiya, K., Hattori, T. (1999): RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res*, 27: 470-478.
- 80) Kalcsits, L, A. Silim, S., Tanino, K. (2009): Warm temperature accelerates short photoperiod-induced growth cessation and dormancy induction in hybrid poplar (*Populus* × spp.). *Trees* 23: 971–979.
- 81) Kaufmann, K., Melzer, R., Theißen, G. (2005): MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 347: 183-198.
- 82) Kim, H. J., Kim, Y. K., Park, J. Y., Kim, J. (2002): Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 29: 693–704.
- 83) Kim, Y. S., Sakuraba, Y., Han, S. H., Yoo, S. C., Pake, N. C. (2013): Mutation of the *Arabidopsis* NAC016 transcription factor delays leaf senescence. *Plant Cell Physiol*, 54: 1660–1672.
- 84) Kitashiba, H., Matsuda, N., Ishizaka, T., Nakano, H., Suzuki, T. (2002): Isolation of genes similar to DREB1/CBF from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J Jpn Soc Hortic Sci* 71: 651–7.
- 85) Kitashiba, H., Ishizaka, T., Isuzugwa, K., Nishimura, K., Suzuki, T. (2004): Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance. *J Plant Physiol*, 161: 1171–1176.
- 86) Lakatos, M., Szentimrey, T., Bihari, Z. (2011): Application of gridded daily data series for calculation of extreme temperature and precipitation indices in Hungary. *Időjárás*, 115: 99–109.
- 87) Lang, G.A. (1987): Dormancy: A universal terminology. *HortScience* 22: 817–920.
- 88) Latchman, D. S. (1997): Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1305–1312.
- 89) Lelievre, J. M., Lathe, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J. C. (1997): Ethylene and fruit ripening. *Physiol Plantarum*, 101: 727–739.
- 90) Lee, S., Wen, J. (2001): A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Am J Bo*, 88: 150-160.

- 91) Li, Z., Reighard, G.L., Abbott, A.G., Bielenberg, D.G. (2009): Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *J Exp Bot*, 60: 3521–3530.
- 92) Liu Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998): Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and lowtemperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391–1406.
- 93) Lloret, A., Badenes, M. L., Ríos, G. (2018): Modulation of dormancy and growth responses in reproductive buds of temperate trees. *Front Plant Sci*, 9: 1368
- 94) Lu, P. L., Chen, N. Z., An, R., Su, Z., Qi, B. S., Ren, F., Chen, J., Wang, X. C. (2007): A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 63: 289–305.
- 95) Luomajoki, A. (1982): Temperature and dates of male meiosis in trees. *Hereditas*, 97: 167–178
- 96) Manning, K., Tör, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J., Seymour, G. B. (2006): A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet*, 38: 948–952.
- 97) Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J. J. (2011): The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiol*, 157: 1568–1579.
- 98) Medina, J., Bagues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., Salinas, J. (1999): The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol*, 119: 463-470.
- 99) Medina, J, Catalá, R, Salinas, J (2011): The CBFs: Three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Sci*, 180: 3–11.
- 100) Milatovic, D., Durovic, D., Zec, G. (2013): Susceptibility of apricot cultivars to winter and late spring frosts. In: Proceedings of the 4th Conference „Innovation in fruit growing“ (ed.: Milatović, D.). Beograd, Serbia, pp. 239–248.
- 101) Mimida, N., Saito, T., Moriguchi, T., Suzuki, A., Komori, S., Wada, M. (2015). Expression of *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)*-like genes in apple. *Biol Plantarum*, 59: 237–244.

- 102) Mohácsy M. (1954): Ószibaracktermesztés. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- 103) Montgomery Sb, Goode Dl, Kvikstad E, Albers Ca, Zhang Zd, Mu X J, Ananda G, Howie B, Karczewski Kj, Smith Ks, Anaya V, Richardson R, Davis J, The 1000 Genomes Project Consortium, Macarthur Dg, Sidow A, Duret L, Gerstein M, Makova Kd, Marchini J, Mcvean G, Lunter, G. (2013): The origin, evolution, and functional impact of short insertion–deletion variants identified in 179 human genomes. *Genome Res* 23: 749–761.
- 104) Moore, S., Vrebalov, J., Payton, P., Giovannoni, J. (2002): Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J Exp Bot*, 53: 2023–2030.
- 105) Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24: 1757–1764.
- 106) Morris, K., Mackerness, S. A. H., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P., Buchanan-Wollaston, V. (2000): Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J*, 23: 677–685.
- 107) Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H. (2006): Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 140: 411–432.
- 108) Nemzeti fajtajegyzék (szőlő, gyümölcs) (2012). Nemzeti Élelmiszer-lánc Biztonsági Hivatal, Budapest, Magyarország (ISSN 1585-8308)
- 109) Niu, Q., Li, J., Cai, D., Qian, M., Jia, H., Bai, S., Houssain, S., Liu, G., Teng, Y., Zheng, X. (2015): Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud. *J Exp Bot*, 67: 239–257.
- 110) Nuñez-Lillo, G., Cifuentes-Esquivel, A., Troggio, M., Micheletti, D., Infante, R., Campos-Vargas, R., Orellana, A., Blanco-Herrea, F., Meneses, C. (2015): Identification of candidate genes associated with mealiness and maturity date in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using QTL analysis and deep sequencing. *Tree Genet Genom*, 11: 1-13.
- 111) Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. (2001): Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, 13: 1959–1968.
- 112) Okie, W., Blackburn, B. (2008): Interaction of chill and heat in peach flower bud dormancy. *HortScience*, 43: 1161-1168.

- 113) Olmstead, J.W., Sebolt, A.M., Cabrera A, Sooriyapathirana S.S, Hammar, S, Iriarte, G., Wang, D., Chen, C.Y, Van Der Knaap, E., Iezzoni, A.F (2008): Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map. *Tree Genet Genomes* 4: 897–910.
- 114) Ooka, H., Satoh, K., Doi K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., (2003): Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 10: 239–247.
- 115) Owens, C.L., Thomasow, M.F., Hancock, J.F., Iezzoni, A.F. (2002): *CBF1* orthologues in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of *CBF1* in strawberry. *J Am Soc Hort Sci*, 127: 489–494.
- 116) Peace, C. P., Crisosto, C. H., Gradziel, T. M. (2005): Endopolygalacturonase: a candidate gene for freestone and melting flesh in peach. *Mo Breeding*, 16: 21-31.
- 117) Pařenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Colombo, L., Angenent, G. C. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell*, 15: 1538–1551.
- 118) Patthy L. (2008): Protein evolution. 2nd edn, Blackwell, Oxford
- 119) Pedryc, A., Korbuly, J., Szabó, Z. (1999): Artificial frost treatment methods of stone fruits. *Acta Horti* 488: 377–380.
- 120) Perry, T.O. (1971): Dormancy of trees in winter. *Science* 171: 29–36.
- 121) Pirona, R., Eduardo, I., Pacheco, I., Linge, C.D.S., Miculan, M., Verde, I., Tartarini, S., Dondini, L., Pea, G., Bassi, D., Rossini, L. (2013): Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach. *BMC Plant Biol*, 13: 166.
- 122) Prudencio, A., Dicenta, F., Martínez-Gómez, P. (2018). Monitoring dormancy transition in almond [*Prunus dulcis* (Miller) Webb] during cold and warm Mediterranean seasons through the analysis of a *DAM* (*Dormancy-Associated MADS-Box*) gene. *Horticulturae*, 4: 41.
- 123) Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., Prasad, M. (2012): NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 17: 369-381. Puranik, S., Acajjaoui, S., Conn, S., Costa, L., Conn, V., Vial, A., Marcellin, R., Melzer, R., Brown, E., Hart, D., Theißen, G., Silva, C.S., Parcy, F., Dumas, R., Nanao, M., Zubieta, C., Theißen, G.

- (2014): Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26: 3603–3615.
- 124) Quilot, B., Wu, B. H., Kervella, J., Genard, M., Foulongne, M., Moreau, K. (2004): QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theor Appl Genet*, 109: 884–897.
- 125) Ramming, D. W. (1991): Genetic control of a slow-ripening fruit trait in nectarine. *Can J Plant Sci*, 71: 601–603.
- 126) Rapaics, R. (1940). A magyar gyümölcs. Királyi Magyar Természettudományi Társulat, Budapest.
- 127) Reichmann, J. L., Meyerowitz, E.M., 1997. MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378, 1079–1101.
- 128) Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R. And Creelman, R. (2000): *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105–2110.
- 129) Richardson, E. A. (1974): A model for estimating the completion of rest for ‘Redhaven’ and ‘Elberta’ peach trees. *HortScience*, 9: 331–332.
- 130) Rodrigo, J., Herrero, M. (2002): Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Sci Hortic-Amsterdam*, 92: 125–135.
- 131) Rohde, A., Bhalerao, R. P. (2007): Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci*, 12: 217–223.
- 132) Romeu, J. F., Monforte, A. J., Sánchez, G., Granell, A., García-Brunton, J., Badenes, M. L., Ríos, G. (2014): Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC Plant Biol*, 14: 52.
- 133) Ruiz, D., Campoy, J. A., Egea, J. (2007): Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ Exp Bot*, 61: 254–263.
- 134) de Sá, M. E. L. D., Lopes, M. J. C., Campos, M. D. A., Paiva, L. V., Amorim, R. M. S. D., Beneventi, M. A., Firmino, A. A. P., De Sá, M. F. G. D. (2012): Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*. *Genet Mol Biol*, 35: 272–282.
- 135) Sablowski, R.W., Meyerowitz, E.M., (1998): A Homolog Of No Apical Meristem Is An Immediate Target Of The Floral Homeotic Genes *Apetala3/Pistillata*. *Cell*, 92: 93–103.
- 136) Saito, T., Bai, S., Ito, A., Sakamoto, D., Saito, T., Ubi, B.E., Imai, T., Moriguchi, T. (2013): Expression and genomic structure of the *dormancy-associated MADS box* genes

- MADS13* in Japanese pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) that differ in their chilling requirement for endodormancy release. *Tree Physiol*, 33: 654–667.
- 137) Sakuma, Y., Liu, Q., Dobouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002): DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. *Biochem Bioph Res Co*, 290: 998–1009.
- 138) Salazar, J. A., Pacheco, I., Shinya, P., Zapata, P., Silva, C., Aradhya, M., Velasco, D., Ruiz, D., Martínez-Gómez, P., Infante, R. (2017): Genotyping by sequencing for SNP-based linkage analysis and identification of QTLs linked to fruit quality traits in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Front Plant Sci*, 8: 476.
- 139) Sasaki, R., Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Kitamura, Y., Akagi, T., Tao, R. (2011): Functional and expressional analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Plant Physiol*, 185: 485–497.
- 140) Saure, M. C. (1985): Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hortic Rev*, 7: 239–300.
- 141) Scorza, R., Okie, W.R (1990): Peaches (*Prunus*). In: Moore, J.N., Ballington, H.J (Eds.) Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops, International Society for Horticultural Science, Amsterdam, The Netherlands (1990), pp. 177-231.
- 142) Sedgley, M., Griffin, A. R. (1989). Sexual reproduction of tree crops. Academic Press.
- 143) Shan, W., Kuang, J. F., Chen, L., Xie, H., Peng, H. H., Xiao, Y. Y., Kuang, J. F., Fan, Z., Q., Chen, J.Y., Lu, W. J. (2012). Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening. *J Exp Bot*, 63: 5171–5187.
- 144) Shen, Z., Confolent, C., Lambert, P., Poëssel, J. L., Quilot-Turion, B., Yu, M., Pascal, T. (2013): Characterization and genetic mapping of a new blood-flesh trait controlled by the single dominant locus DBF in peach. *Tree Genet Genomes*, 9: 1435–1446.
- 145) Sherman, W. B., Beckman, T. G. (2002): Climatic adaptation in fruit crops. *XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts* 622: 411-428.
- 146) Shinwari, Z. K., Nakashima K., Miura, S., Kasuga, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998): An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Bioph Res Co*. 250: 161–170.
- 147) Shirasawa, K., Isuzugawa, K., Ikenaga, M., Saito, Y., Yamamoto, T., Hirakawa, H., & Isobe, S. (2017): The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Research*, 24: 499-508.

- 148) da Silveira Falavigna, V., Porto, D. D., Buffon, V., Margis-Pinheiro, M., Pasquali, G., Revers, L. F. (2014): Differential transcriptional profiles of dormancy-related genes in apple buds. *Plant Mol Biol Rep*, 32: 796–813.
- 149) Soltész, A., Smedley, M., Vashegyi, I., Galiba, G., Harwood, W., Vágújfalvi, A. (2013): Transgenic barley lines prove the involvement of *TaCBF14* and *TaCBF15* in the cold acclimation process and in frost tolerance. *J Exp Bot* 64: 1849–1862.
- 150) Sooriyapathirana, S. S., Khan, A., Sebolt, A. M., Wang, D., Bushakra, J. M., Lin-Wang, K., Iezzoni, A. F. (2010): QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genet Genomes*, 6: 821-832.
- 151) Souer, E., Van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., Koes, R., (1996): The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85:159–170.
- 152) Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997): *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1035–1040.
- 153) Sun, L., Huang, L., Hong, Y., Zhang, H., Song, F., Li, D. (2015): Comprehensive analysis suggests overlapping expression of rice ONAC transcription factors in abiotic and biotic stress responses. *Int J Mol Sci*, 16: 4306–4326.
- 154) Svendsen, E., Wilen, R., Stevenson, R., Liu, R., Tanino, K. K. (2007): A molecular marker associated with low-temperature induction of dormancy in red osier dogwood (*Cornus sericea*). *Tree Physiol*, 27: 385–397
- 155) Szabó, Z., Szalay, L., Papp, J. (2002): Connection between the developmental stage and the cold hardiness of peach cultivars. *Acta Horti*, 592: 549–552.
- 156) Szalay, L., Pedryc, A., Szabó, Z. (1999): Dormancy and cold hardiness of flower buds of some Hungarian apricots. *Acta Horti* 488: 315–320.
- 157) Szalay, L., Papp, J., Pedryc, A., Szabo, Z. (2006): Diversity of apricot varieties based on traits determining winter hardiness and early spring frost tolerance of floral buds. *Acta Horti*, 701: 131–134.
- 158) Szalay, L., Timon, B., Németh, S., Papp, J., Tóth, M. (2010): Hardening and dehardening of peach flower buds. *HortScience*, 45: 761–765.

- 159) Szalay, L., Ladányi, M., Hajnal, V., Pedryc, A., Tóth, M. (2016): Changing of the flower bud frost hardiness in three Hungarian apricot cultivars. *HortScience*, 43: 134–141.
- 160) Szalay, L., Froemel-Hajnal, V., Bakos, J., Ladányi, M. (2019): Changes of the microsporogenesis process and blooming time of three apricot genotypes (*Prunus armeniaca* L.) in Central Hungary based on long-term observation (1994–2018). *Sci Horticulture-Amsterdam*, 246: 279–288.
- 161) Takada S, Hibara Ki, Ishida T, Tasaka M (2001): The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128: 1127–1135.
- 162) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725–2729.
- 163) Tanino, K. K., Cherrya, K. M., Kriger, J. N., Hrycana, W., Marufu, G., Thomas, J. D., Gray, G. R. (2014): Photosynthetic responses to temperature-mediated dormancy induction in contrasting ecotypes of red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.). *Environ Exp Bot*, 106: 221–230.
- 164) Theissen, G., Saedler, H. (1995): MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Curr Opin Genet Dev*, 5: 628–639.
- 165) Thomashow, M. F. (2010): Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiol* 154: 571–577.
- 166) Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi H. (2006): Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 140: 411–32.
- 167) Tsukamoto, T., Hauck, N.R., Tao, R., Jiang, N., Iezzoni, A.F. (2006): Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*) *Plant Mol Biol* 62: 371–383.
- 168) Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S. K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Marz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lepinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Change, D.,

- Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fwacett, J.A., Proost, S., Rouze' P., Streck, L., Troppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van De Peer, Y., Salamini, F., Viola, R.. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica*). *Nat Genet* (42) 833–841.
- 169) Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M. T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L., A., Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., Policriti, A., Cipriani, G., Dondini, L., Ficklin, S., Goodstein, D. M., Xuan, P., Del Fabbro, C., Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D. S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E., Maldonado, J., Lazzari, B., Bielenberg, D., Pirona, R., Miculan, M., Barakat, A., Testolin, R., Stella, A., Tartarini, S., Tonutti, P., Arús, P., Orellana, A., Wells, C., Main, D., Vizzotto, G., Silva, H., Salamini, F., Schmutz, J., Morgante, M., Rokhsar, D., S. (2013): The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat Genet*, 45: 487.
- 170) Viti, R., Andreini, L., Ruiz, D., Egea, J., Bartolini, S., Iacona, C., Campoy, J. A. (2010). Effect of climatic conditions on the overcoming of dormancy in apricot flower buds in two Mediterranean areas: Murcia (Spain) and Tuscany (Italy). *Sci Hortic-Amsterdam*, 124: 217–224.
- 171) Viti, R., Bartolini, S., Guerriero, R. (2006): Apricot floral biology: the evolution of dormancy and the appearance of bud anomalies in several Italian genotypes. *Adv Hort Sci*, 20: 267–274.
- 172) Voitsik, A. M., Muench, S., Deising, H. B., Voll, L. M. (2013): Two recently duplicated maize NAC transcription factor paralogs are induced in response to *Colletotrichum graminicola* infection. *BMC Plant Biol*, 13: 1.
- 173) Wang, N., Zheng, Y., Xin, H., Fang, L., Li, S. (2013): Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep*, 32: 61–75.
- 174) Wareing, P. J. (1956): Photoperiodism in woody plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 7: 191-214.
- 175) Weaver, R. F., Hedrick, P. W. (1997): Genetics. Dubuque, Iowa: WM.C. Brown Publishers.
- 176) Weinbaum, S.A., Polito, V.S., Muraoka, T.T. (1989): Assessment of Rest Completion and its Relationship to Appearance of Tetrads in Anthers of “Nonpareil” Almonds. *Sci Hort*, 38:69–76.

- 177) Welling, A., Palva, E.T. (2006): Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiol Plant*, 127: 167–181.
- 178) Welling, A., Palva, E.T. (2008): Involvement of CBF Transcription Factors in Winter Hardiness in Birch. *Plant Physiol*, 147: 1119–1211.
- 179) Wen, J., Berggren, S. T., Chung-Hee, L. E. E., Ickert-Bond, S., Ting-Shuang, Y. I., Ki-Oug, Y. O. O., Xie, L., Shaw, J., Potter, D. (2008): Phylogenetic inferences in *Prunus* (Rosaceae) using chloroplast *ndhF* and nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal Sys Evol*, 46: 322-332.
- 180) Werner, D. J., Creller, M. A., Chaparro, J. X. (1998): Inheritance of the blood-flesh trait in peach. *HortScience*, 33: 1243–1246.
- 181) Wisniewski M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T., Macarisin, D. (2011): Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*, 233: 971–983.
- 182) Wu, R.M., Walton, E.F., Richardson, A.C., Wood, M., Hellens, .P., Varkonyi-Gasic, E. (2012). Conservation and divergence of four kiwifruit *SVP*-like *MADS-box* genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. *J Exp Bot*, 63: 797–807.
- 183) Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S., Nassuth, A. (2006): Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ*, 29: 1410–1421.
- 184) Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.H., (2000): Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, 14: 3024–3036.
- 185) Yamane, H., Kashiwa, Y., Ooka, T., Tao, R., Yonemori, K., (2008): Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated expression of an *SVP/AGL24*-type *MADS-box* gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *J Am Soc Hort Sci*, 133: 708–716.
- 186) Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Sasaki, R., Tao, R. (2011a): Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated *MADS-box* genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *J Exp Bot*, 62: 3481–3488.
- 187) Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Sasaki, R., Tao, R. (2011b): Expression analysis of *PpDAM5* and *PpDAM6* during flower bud development in peach (*Prunus persica*). *Sci Hortic-Amsterdam*, 129: 844–848.

- 188) Yamane, H., Tao, R., Ooka, T., Jotatsu, H., Sasaki, R., Yonemori, K. (2011c): Comparative analyses of *dormancy-associated MADS-box* genes, *PpDAM5* and *PpDAM6*, in low- and high-chill peaches (*Prunus persica* L.). *J Jpn Soc Hortic Sci*, 80: 276–283.
- 189) Yang, T., Zhang, L., Zhang, T., Zhang, H., Xu, S., An, L. (2005): Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants. *Plant Sci.*, 169: 987–995.
- 190) Zhang, Q., Chen, W., Sun, L., Zhao, F., Huang, B., Yang, W., Xing, Z. (2012). The genome of *Prunus mume*. *Nat Commun*, 3: 1318.
- 191) Zhang, J., Yang, W. R., Cheng, T. R., Pan, H. T., Zang, Q. X. (2013): Functional and evolutionary analysis of two *CBF* genes in *Prunus mume*. *Can J Plant Sci*, 93: 455–464.
- 192) Zhao, K., Zhou, Y., Li, Y., Zhuo, X., Ahmad, S., Han, Y., Yong, X., Zhang, Q. (2018): Crosstalk of *PmCBFs* and *PmDAMs* based on the changes of phytohormones under seasonal cold stress in the stem of *Prunus mume*. *Int J Mol Sci*, 19: 15.
- 193) Zhou, H., Lin-Wang, K., Wang, H., Gu, C., Dare, A.P., Espley, R.V., He, H., Allan, A.C., Han, Y. (2015): Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *Plant J*, 82:105–121.

M.2 MELLÉKLETEK

1. melléklet: A vizsgálatokhoz használt őszibarack fajták neve, eredete, legfontosabb pomológiai tulajdonságai, érési ideje és NAC-genotípusa

Fajtanév	Eredet	Legfontosabb pomológiai tulajdonságok*	Érési idő Magyarországon	Érési idő (Julián-nap)	NAC - genotípus		
					Homozigóta (192bp)	Heterozigóta (192/201bp)	Homozigóta (201bp)
Primissima Delbard	Franciaország	M, G, F, D	június 2. dekádja	165			*
Royal April	USA	M, G, S, D	június 2. dekádja	165			*
Madeleine Pouyet	Franciaország	M, G, F, D	június 2. dekádja	167			*
Spring Lady	USA	M, G, S, FM	június 2. dekádja	169		*	
Springgold	USA	M, G, S, D	június 3. dekádja	175		*	
Starcrest	Franciaország	M, G, S, D	június 3. dekádja	177			*
Redwing	USA	M, G, F, M	június 3. dekádja	179			*
Tena	Csehország	N, G, S, D	június 3. dekádja	180			*
Springtime	USA	M, G, F, D	június 2. fele - július eleje	180			*
Rubirich	USA	M, G, S, D	június 2. fele - július eleje	180			*
Big Haven	USA	N, G, S, D	június 2. fele - július eleje	181			*
Springcrest	Franciaország	M, G, S, FM	július 1. dekádja	182			*
Teska	Csehország	M, G, S, D	július 1. dekádja	183			*
Zhao Xia	Kína	M, G, F, D	július 1. dekádja	186		*	
Fenix	Csehország	M, G, S, D	július 1. dekádja	188		*	
Favorita Morettini	Olaszország	M, G, S, M	július 1. dekádja	190	*		
Gloria Red	Magyarország	M, G, S, D	július 1. dekádja	191		*	
Nikitskyi 85	Oroszország	N, G, S, FM	július 1. dekádja	191			*
Luna	Csehország	M, G, F, M	július 2. dekádja	192		*	
Tenira	Csehország	M, G, S, FM	július 2. dekádja	192		*	
June Star	USA	N, G, S, M	július 2. dekádja	193			*
Stark Early Glo	USA	M, G, S, M	július 2. dekádja	194		*	

Arany csillag	Magyarország	M, G, S, D	július 2. dekádja	195		*
Cardinal	USA	M, G, S, FM	július 2. dekádja	196		*
Dixired	USA	M, G, S, D	július 2. dekádja	196		*
Nectagrand	Olaszország	N, G, S, D	július 2. dekádja	196		*
Amsden	USA	M, G, F, D	július 2. dekádja	196	*	
Vistarich	USA	M, G, S, D	július 2. fele	196	*	
Early Red	USA	M, G, S, D	július 2. dekádja	197	*	
Early White Giant	USA	M, G, F, D	július 2. dekádja	197		*
Early White Giant	USA	M, G, F, D	július 2. dekádja	197	*	
Meigue Pantao	Kína	M, L, F, D	július 2. dekádja	197	*	
Piroska	Magyarország	M, G, F, M	július 2. dekádja	197	*	
Jerseyland	USA	M, G, S, FM	július 2. dekádja	198		*
Regina	USA	M, G, S, M	július 2. dekádja	198	*	
Earliglo	USA	N, G, S, D	július 2. dekádja	199	*	
Sunrise	USA	M, M, S, -	július 2. dekádja	199	*	
Weinberger	Olaszország	N, G, S, FM	július 2. dekádja	199		*
Albatros	Dél-Afrika	M, G, F, D	július 2. dekádja	200		*
Mariska	Magyarország	M, G, F, FM	július 2. dekádja	200		*
Tercie	Csehország	M, G, S, D	július 2. dekádja	200		*
Caldesi 2000	Olaszország	N, G, F, FM	július 2. dekádja	201		*
Sunhaven	USA	M, G, S, FM	július 3. dekádja	202	*	
Early Redhaven	USA	M, G, S, FM	július 3. dekádja	203		*
Zhao Hui	Kína	M, G, F, D	július 3. dekádja	205	*	
Redhaven Bianca	Olaszország	M, G, F, M	július 3. dekádja	206	*	
Harblese	Kanada	N, G, S, D	július 3. dekádja	207		*
Krasava	Csehország	M, G, F, D	július 3. dekádja	207	*	
Genadix 7	Franciaország	M, G, F, M	július 3. dekádja	208	*	
Pegaso	Olaszország	N, G, S, M	július 3. dekádja	210	*	
Big Top	USA	N, G, S, D	július 3. dekádja	210	*	
Redhaven	USA	M, G, S, M	július 3. dekádja	210	*	

Harco	USA	N, G, S, M	július 3. dekádja	211		*
Lapos orosz	Oroszország	M, L, F, D	július 3. dekádja	211		*
Nikitskyi flat	Oroszország	M, L, F, M	július 3. dekádja	211		*
Teresa	Csehország	M, G, S, D	július 3. dekádja	212		*
Sunbeam	USA	M, G, S, FM	július vége	212		*
Royal Summer	USA	M, G, S, M	július vége – augusztus eleje	212		*
Flamin' Fury	USA	M, G, S, M	augusztus eleje	213		*
Royal Time	USA	M, G, S, FM	augusztus 1. dekádja	213	*	
Maura	USA	M, G, F, M	augusztus 1. dekádja	215	*	
Nektár H	Magyarország	M, G, F, M	augusztus 1. dekádja	215		*
Rikakusuimitsu	Kína	M, G, F, M	augusztus 1. dekádja	216		*
Moravia	Csehország	M, G, S, M	augusztus 1. dekádja	218		*
Flamingo	Csehország	M, G, S, M	augusztus 1. dekádja	219		*
Hale Haven	USA	M, G, S, M	augusztus 1. dekádja	219		*
Kanto-5	Kína	M, G, S, D	augusztus 1. dekádja	219		*
Condor	USA	M, G, F, M	augusztus 1. dekádja	219		*
Paraszt Mariska	Magyarország	M, G, F, D	augusztus 1. dekádja	219		*
Redskin	USA	M, G, S, M	augusztus 1. dekádja	219	*	
Rubinovy 8	Oroszország	N, G, S, M	augusztus 1. dekádja	219	*	
Fairhaven	USA	M, G, S, M	augusztus 1. dekádja	220		*
Ford	USA	M, G, F, M	augusztus 1. dekádja	220		*
July Elberta	USA	M, G, S, M	augusztus 1. dekádja	220	*	
Carson	USA	M, G, S, D	augusztus 1. dekádja	222		*
Alitop	Olaszország	N, G, S, M	augusztus 2. dekádja	223		*
Krümcsangin	Oroszország	N, G, S, M	augusztus 2. dekádja	223		*
Lednická Zlutá	Csehország	M, G, S, D	augusztus 2. dekádja	224		*
Meystar	Franciaország	M, G, F, M	augusztus 2. dekádja	225		*
Flavortop	USA	N, G, S, M	augusztus 2. dekádja	226		*
63-15-33	Kína	M, G, F, D	augusztus 2. dekádja	226	*	
Incorico Pierri	Olaszország	M, G, F, M	augusztus 2. dekádja	227		*

Elvira	Franciaország*	M, G, S, M	augusztus 2. dekádja	227		*	
Harbringer	Kanada	M, G, S, D	augusztus 2. dekádja	227			*
Big Bang	Franciaország	N, G, S, D	augusztus 2. dekádja	228		*	
Suncrest	USA	M, G, S, M	augusztus 2. dekádja	228		*	
Babygold 6	USA	M, G, S, D	augusztus 2. dekádja	230		*	
Champion	USA	M, G, F, M	augusztus 2. dekádja	231		*	
Köncsőgi kopsz	Magyarország	N, G, -, -	augusztus 2. dekádja	231	*		
Kínai lapos	Kína	M, L, F, -	augusztus 2. dekádja	232	*		
Tapodi-féle	Magyarország	M, G, S, D	augusztus 2. dekádja	232	*		
Collins	USA	M, G, S, -	augusztus 3. dekádja	233	*		
Zhong Shan Zao Lu	Kína	M, G, F, M	augusztus 3. dekádja	233		*	
Stark Red Gold	USA	N, G, S, M	augusztus 3. dekádja	234		*	
Fantasia	USA	N, G, S, M	augusztus 3. dekádja	235			*
Zsoltij	Oroszország	N, G, S, M	augusztus 3. dekádja	236	*		
Cresthaven	USA	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	238		*	
Jinfeng	Kína	M, G, S, D	augusztus 3. dekádja	238	*		
Royal Pride	USA	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	238			*
Zee Lady	USA	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	238	*		
Andross	USA	M, G, S, D	augusztus 3. dekádja	240		*	
Kisapáthy 1	Magyarország	M, G, F, M	augusztus 3. dekádja	240	*		
Kisapáthy 2	Magyarország	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	240	*		
Szegedi arany	Magyarország	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	241	*		
Diana	Csehország	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	242	*		
Harry-Harry	-	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	242	*		
Klamt	USA	M, G, S, D	augusztus 3. dekádja	242		*	
Fayette	USA	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	242		*	
Elberta	USA	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	243	*		
Inka	Lengyelország	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	243		*	
Redcal	USA	M, G, S, M	augusztus 3. dekádja	243	*		
Harken	Kanada	M, G, S, M	szeptember 1. dekádja	244			*

Ruzsa	Magyarország	-, G, -, -	szeptember 1. dekádja	245		*
Vega	Csehország	N, G, S, D	szeptember 1. dekádja	245	*	
Gracia	Csehország	M, G, S, M	szeptember 1. dekádja	247	*	
Orion	Olaszország	N, G, S, M	szeptember 1. dekádja	248		*
Sudanell	Spanyolország	M, G, S, D	szeptember 1. dekádja	248	*	
Gladys	USA	M, G, F, D	szeptember 1. dekádja	250	*	
Michelini	Olaszország	M, G, F, M	szeptember 1. dekádja	251	*	
Merill Sundance	USA	M, G, S, M	szeptember 1. dekádja	252	*	
Shipley	USA	M, G, F, M	szeptember 1. dekádja	252		*
Kései bronzos Elberta	Magyarország	M, G, S, M	szeptember 2. dekádja	257	*	
Fairlane	USA	N, G, S, D	szeptember 2. dekádja	260	*	
Vérbarack 1	Magyarország	M, G, G, M	szeptember vége - október eleje	270	*	
Vérbarack 2	Magyarország	M, G, G, M	szeptember vége - október eleje	274	*	

*M – molyhos/ N – nektarin; G – gömbölyű/ L – lapos; F – fehérhúsú/ S – sárgahúsú/ V – vérbélű; M – magvaváló/ FM – félig magvaváló/ D – duránci

2. melléklet: Napi minimum hőmérsékleti értékek a 2015/16-es és 2016/17-es nyugalmi időszakban

Október	2015/16	2016/17	November	2015/16	2016/17	December	2015/16	2016/17
okt.. 1.	nincs adat	6,8	nov.. 1.	-3,2	-1,5	dec.. 1.	3,5	-4,7
okt.. 2.	nincs adat	7,1	nov.. 2.	-5,8	2,6	dec.. 2.	2,3	0,6
okt.. 3.	2,5	11,8	nov.. 3.	-5,5	-3,4	dec.. 3.	-1,3	-9,9
okt.. 4.	6,3	9,4	nov.. 4.	-4,5	-4,2	dec.. 4.	1,9	-8,5
okt.. 5.	8,1	6,1	nov.. 5.	-3,9	-7,2	dec.. 5.	2,4	-5,4
okt.. 6.	6,9	-1	nov.. 6.	-4,3	-4,4	dec.. 6.	3,9	-8,9
okt.. 7.	9	-1,3	nov.. 7.	-1,4	1,9	dec.. 7.	3,7	-11,3
okt.. 8.	10,3	-2,7	nov.. 8.	3,4	2,2	dec.. 8.	3,9	-3,7
okt.. 9.	10,2	0,2	nov.. 9.	1,9	7,5	dec.. 9.	3,4	-4,1
okt.. 10.	10,2	-1,6	nov.. 10.	8,9	4,4	dec.. 10.	-0,8	-4
okt.. 11.	5,5	6,8	nov.. 11.	9,1	4,6	dec.. 11.	-3,4	-4,4
okt.. 12.	5,3	7,1	nov.. 12.	3,9	3	dec.. 12.	-2,1	-2,9
okt.. 13.	-2,2	3,4	nov.. 13.	-0,5	1,2	dec.. 13.	-1,7	-3,1
okt.. 14.	8,5	9,2	nov.. 14.	-0,5	0,9	dec.. 14.	-5,6	-2,2
okt.. 15.	10,2	9,7	nov.. 15.	-0,9	1,9	dec.. 15.	-1	-0,8
okt.. 16.	11,3	7,3	nov.. 16.	1,4	-1,7	dec.. 16.	-3,4	3,6
okt.. 17.	4,3	2,1	nov.. 17.	-1,2	4,6	dec.. 17.	0,1	4,2
okt.. 18.	4,7	-3	nov.. 18.	5,2	-0,9	dec.. 18.	1	0,7
okt.. 19.	9,6	4,1	nov.. 19.	1,1	-5,4	dec.. 19.	2,7	-8,7
okt.. 20.	4,2	1,2	nov.. 20.	8,8	-8,9	dec.. 20.	3,1	-11,1
okt.. 21.	-0,2	-1,7	nov.. 21.	3,9	0,3	dec.. 21.	1,7	-12,7
okt.. 22.	-1,3	-0,9	nov.. 22.	2	-1	dec.. 22.	0,7	-11,9
okt.. 23.	-2,1	-0,7	nov.. 23.	-2,9	-7,5	dec.. 23.	-1	-8,5
okt.. 24.	-2	-3,6	nov.. 24.	-5,6	-10,5	dec.. 24.	0,1	-4,4
okt.. 25.	-1,8	-7,1	nov.. 25.	-7,7	-10,9	dec.. 25.	2,4	-2,6
okt.. 26.	0,2	-4	nov.. 26.	-5,9	-8,2	dec.. 26.	1,2	-4,8
okt.. 27.	1,4	7,1	nov.. 27.	-6,7	-10,5	dec.. 27.	0	-15,1
okt.. 28.	1,6	0,1	nov.. 28.	0,2	-8,1	dec.. 28.	-1,6	-19,8
okt.. 29.	2,6	0,5	nov.. 29.	-1,2	-3	dec.. 29.	-0,8	-22,9
okt.. 30.	-1,1	-5,9	nov.. 30.	4	-1,3	dec.. 30.	-6,7	-19,6
okt.. 31.	-1,6	-5,9	-	-	-	dec.. 31.	-10,6	-15,9
Átlag:	4,2	2,0	Átlag:	-0,3	-2,1	Átlag:	-0,1	-7,2

Január	2015/16	2016/17	Február	2015/16	2016/17	Március	2015/16	2016/17
jan.. 1.	-13,4	-16,4	febr.. 1.	2,8	-5,7	márc.. 1.	5,9	-0,6
jan.. 2.	-9,2	-9,7	febr.. 2.	1,2	-6,3	márc.. 2.	2,3	0,8
jan.. 3.	-15	-0,6	febr.. 3.	1,7	-6,3	márc.. 3.	1,8	-2
jan.. 4.	-16,4	-0,6	febr.. 4.	0,4	-4,2	márc.. 4.	2,1	-2
jan.. 5.	-7,7	-5,8	febr.. 5.	-4,4	-3,7	márc.. 5.	0	-3,9
jan.. 6.	-4,2	-9,8	febr.. 6.	-4,9	-2,8	márc.. 6.	-1,9	-3,2
jan.. 7.	-9,5	-4,5	febr.. 7.	-1,9	-4,5	márc.. 7.	4,7	-3
jan.. 8.	-9,4	-6,4	febr.. 8.	-0,2	-5,4	márc.. 8.	5,4	6,6
jan.. 9.	-4,3	-11,2	febr.. 9.	1,8	-3,1	márc.. 9.	-1,1	5,9
jan.. 10.	0,1	-14,7	febr.. 10.	3,1	-3	márc.. 10.	-4,4	3,9
jan.. 11.	0,1	-13,1	febr.. 11.	-3,4	-0,5	márc.. 11.	1,4	1,1
jan.. 12.	2,1	-13,6	febr.. 12.	-6,2	-1,6	márc.. 12.	8	5,9
jan.. 13.	-2,2	-10,9	febr.. 13.	1,9	5,1	márc.. 13.	5,8	8,5
jan.. 14.	-3	-12,5	febr.. 14.	-0,4	6,3	márc.. 14.	6,2	4,9
jan.. 15.	-1,1	-11,9	febr.. 15.	1,9	-3,9	márc.. 15.	-0,8	5,8
jan.. 16.	-4,7	-9,6	febr.. 16.	2,6	-5,9	márc.. 16.	-1,8	-0,9
jan.. 17.	-6,2	-9,6	febr.. 17.	2,3	-3,4	márc.. 17.	1,2	-4,1
jan.. 18.	-11,3	-9,8	febr.. 18.	4,4	7	márc.. 18.	-3,4	-2,5
jan.. 19.	-13,7	-12,7	febr.. 19.	3,1	-0,9	márc.. 19.	-4,2	0,5
jan.. 20.	-6,2	-13,8	febr.. 20.	-1,3	-4,3	márc.. 20.	0,3	6,2
jan.. 21.	-10,4	-7,4	febr.. 21.	4	-1,7	márc.. 21.	-4,5	1,5
jan.. 22.	-14,7	-0,6	febr.. 22.	2,2	0,6	márc.. 22.	-1,3	5,9
jan.. 23.	-14,9	1,1	febr.. 23.	3,5	7,5	márc.. 23.	-2,8	8,5
jan.. 24.	-4	-1,1	febr.. 24.	-3,6	-0,8	márc.. 24.	-2,2	4,9
jan.. 25.	-2,1	-1,8	febr.. 25.	-5,1	-2,2	márc.. 25.	-6,7	5,8
jan.. 26.	0,3	0,1	febr.. 26.	-4,6	1,1	márc.. 26.	2	-0,9
jan.. 27.	-0,7	1,3	febr.. 27.	-4,9	0,5	márc.. 27.	-2,2	-4,1
jan.. 28.	-1,7	0	febr.. 28.	1,2	1,1	márc.. 28.	-2,2	-2,5
jan.. 29.	-2,9	-1	febr.. 29.	5,9	-	márc.. 29.	1,1	0,5
jan.. 30.	-3,4	-1,3	-	-	-	márc.. 30.	2,9	6,2
jan.. 31.	0,7	-3,1	-	-	-	márc.. 31.	2,6	1,5
Átlag:	-6,1	-6,8	Átlag:	0,1	-1,5	Átlag:	0,5	1,8

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hegedűs Attilának, hogy lehetőséget adott számomra PhD dolgozatom elkészítésére, és mindvégig támogatta, szakmailag irányította munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Halász Júliának a rengeteg segítségért, útmutatásért és hogy bármilyen szakmai problémámmal bizalommal fordulhattam hozzá. Hálásan köszönöm Dr. Gutermuth Ádámnak a mintagyűjtés során nyújtott, nélkülözhetetlen segítségét. Köszönetemet szeretném kifejezni egykori tanszékvezetőnknek, Dr. Pedryc Andzrejnek, hogy általa betekintést nyerhettem a Genetika és Növénynevelés Tanszék munkájába és ennek köszönhetően megszerettem e tudományterületeket. Köszönöm a Genetika és Növénynevelés Tanszék minden volt- és jelenlegi dolgozójának és hallgatójának, hogy a felmerülő nehézségek ellenére egy támogató, szakmailag és emberileg is kiváló közegben dolgozhattam.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Galiba Gábornak, az MTA Agártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet Növényi Molekuláris Biológia Osztály vezetőjének, hogy lehetővé tette számunkra a realtime PCR készülék használatát. Nagyon köszönöm Dr. Bolvári-Soltész Alexandrának a génexpressziós vizsgálatok során nyújtott szakmai segítségét. Dr. Vágújfalvi Attilának szeretném megköszönni szakmai segítségét, hasznos észrevételeit.

Köszönettel tartozom Dr. Höhn Máriának, a Növénytan Tanszék vezetőjének és Dr. Erős-Honti Zsoltnak a mikroszkópos vizsgálatok során nyújtott szakmai és technikai segítségért. Köszönöm Dr. Szalay Lászlónak, a Gyümölcsstermő Növények Tanszék munkatársának, hogy adatokat szolgáltatott a dolgozatban vizsgált kajszifajták hidegigényének kiszámításához, valamint Dr. Szani Zsoltnak, a NÉBIH Mezőgazdasági Genetikai Erőforrások Igazgatóság Kertészeti Fajtakísérleti Osztály munkatársának, hogy segítséget nyújtott az őszibarack minták begyűjtésében és adatokat szolgáltatott az általunk vizsgált fajtákról.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, hogy támogattak és mindvégig mellettem álltak.