

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

**TRANSZKRIPTOMIKAI VÁLTOZÁSOK
NYOMONKÖVETÉSE MONÍLIA ELLENÁLLÓ ÉS
FOGÉKONY KAJSZIFAJTÁKON**

Geiger Ágnes

BSc. III. évfolyamos kertészmérnök hallgató

Konzulens: Gutermuth Ádám, tudományos segédmunkatárs, ágazatvezető

Budapest, 2011.

TARTALOMJEGYZÉK

FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK.....	3
1. BEVEZETÉS.....	4
2. CÉLKITŰZÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1 A kajszi jellemzése	7
3.2 A kajszi nemesítése Magyarországon	8
3.3 A kajszi monília virág- és vesszőpusztulása	10
3.4 Kajszfajták virágzáskori monília betegséggel szembeni fogékonysága	12
3.5 A kajszfajták eltérő válaszreakciója Monilinia laxa vesszőfertőzésére.....	17
3.6 Rezisztenciagének növénypatogén gomba kórokozókkal szemben	17
3.6.1 Rezisztencia gének csoportosítása szerkezetük alapján.....	17
3.6.2 Poligalakturonázt gátló fehérjék, mint a nekrotróf növénypatogén gombák ellenszere	19
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	22
4.1 Növényanyag.....	22
4.2 RNS izolálás	22
4.2 Kétszálú cDNS-szintézis	23
4.3 Első emésztés	25
4.4 Második emésztés.....	26
4.5 cDNS AFLP első PCR reakciója (preamplifikáció):.....	27
4.6 A cDNS AFLP második PCR reakciója (szelektív PCR reakció):.....	29
4.7 Gélelektroforézis	30
4.8 Reamplifikáció	32
4.9 Bioinformatikai vizsgálatok	32
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS	35
7. IRODALOMJEGYZÉK	37
8. MELLÉKLETEK	39
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	49

FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

AFLP	amplified fragment length polymorphism
ATP	adenozin-trifosztát
bp	bázispár
cDNS	kópia DNS
DNS	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxiribonukleotid-trifoszfát
DIECA	diethyldithiocarbamate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eLRR	extracellular leucin rich repeat
ISSR	Internal simple sequence
MQ	Milli-Q víz
NBS-LRR	nucleotide binding site- leucin rich repeat
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	polimeráz láncreakció
PG	polygalacturonase
PGIP	polygalacturonase inhibiting protein
PR proteinek	patogénválasz-fehérjék
PVP	polivinilpirolidin
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RGA	rezisztenciagén-analóg
R gén	rezisztenciagén
RNS	ribonukleinsav
R protein	rezisztenciafehérje
TBE	Tris-borate-EDTA

1. BEVEZETÉS

A növények termesztése során nagy problémaként merül fel a rájuk ható biotikus stressz, mely a növények életfolyamatait jelentősen befolyásolja. A biotikus stresszt kiváltó két fő tényező a növényeket károsító kártevők tevékenysége, valamint a növényen megjelenő kórokozók jelenléte. A növénytermesztők számára a kártevők elleni védekezés legfontosabb módszere a megfelelő fajtaválasztás valamint a kémiai védekezés. A növényvédelem során számos fontos szempontot figyelembe kell vennünk a hatékonyság eléréséhez. Nem elhanyagolható tényező az effajta eljárások költségessége, valamint a környezeti terhelés, aminek csökkentésére a legjobb módszer az ellenálló fajták választása. A fajtaválasztás során termesztési és gazdasági szempontokat, valamint a rezisztenciák által biztosított előnyöket is figyelembe kell vennünk. A zöldségtermesztésben a rezisztens fajták szortimentje évről-évre bővül, így a termesztők számára a rezisztenciák használata a termesztéstechnológia szerves részévé vált, a fajtaváltás évenként bekövetkezhet. Ezzel szemben a fás szárú növények esetében egy új fajta termesztésbe vonása több időt igényel, az új ismeretlen fajták kipróbálása jelentősen nagyobb rizikót hordoz, mint az egyéves zöldségfajok esetében. Emellett megemlítenéd, hogy a gyümölcsfajták esetében a rezisztens fajták szortimentje igen szűk. Ez legfőképp azzal magyarázható, hogy a gyümölcsfajoknak hosszú a generációs ideje és emiatt a rezisztencianemesítés évtizedekig is eltarthat. Ezentúl az ültetvényben történő rezisztenciák fenotipizálása az adott környezeti tényezőktől függ, így csak többéves megfigyelések alapján valószínűsíthetjük a fenotípust.

Dolgozatomban a kajszibarack (*Prunus armeniaca* L.) egyik legjelentősebb gombás betegségének, a hajtás és virágpusztulást kiváltó *Monilia laxa* ellenállóságával foglalkozom. A betegség elleni védekezést szinte minden évben szükséges elvégezni, hiszen a tünetek gyorsan kialakulnak, amely nemcsak egy adott fa, hanem az egész ültetvényünk kondícióját leronthatja.

A hazai fajták mindegyike fogékony a betegséggel szemben eltérő mértékben, ezért az ellenálló fajta előállítása célravezető feladat.

Egy adott fajta esetében a kórokozó elleni rezisztencia megnyilvánulásának legbiztosabb jele, a rezisztenciáért felelős gén jelenléte a genomban. Ezeknek a rezisztenciagéneknek meghatározására többféle lehetőség is módunkban áll.

Egyes esetekben megvizsgálhatjuk, az eltérő, monília betegségre fogékony fajták rezisztencia génjei közötti különbséget homológia, azaz a hasonlóságuk alapján. Ebben az esetben rezisztenciagén-analógokat keresünk. Az elmúlt 30 év során a növényi rezisztencia témakörben sikerült több mint 70 eltérő rezisztenciagén teljes szekvenciájának meghatározása, amelyek valamilyen lágyszárú, modell- és haszonnövényekből származtak. Az így kapott szekvenciákat különböző csoportokba sorolták homológia alapján. Ezen gének konzerváltsága miatt lehetőség volt homológ szekvenciák izolálására anélkül, hogy ismertük volna előzetesen azok szekvenciáit. Ezeket a géneket a kutatók rezisztenciagén-analógoknak (RGA) nevezték el. (Röth, 2008)

Másik módszerként említhetjük még meg a térképező populáción alapuló génizolálást (Map-based Cloning). Természetes körülmények között egy fás szárú növény populáció előállításához akár 10 év is szükséges, valamint igen nagy hely- és költségigénnyel jár. A populáció létrehozásán túl a biztos fenotípus ismeretében a génizolálás további 4-5 évig is eltarthat. A módszer sikeressége a random markerezésen (RAPD, AFLP, ISSR, stb.) alapszik, ezáltal az eltérést mutató tulajdonág genetikai determinánsa deríthető fel.

Létezik olyan technika, mely során transzkriptomikai szinten vizsgáljuk az eltéréseket a fertőzéssel szemben ellenálló és fogékony fajtákon. Az RNS szinten történő vizsgálatok legnépszerűbb típusa a cDNS chip technika, emellett a teljes transzkriptom szekvenálása és összehasonlítása, illetve az általunk választott cDNS AFLP.

Eddigi kutatások alapján még nem született eredmény arra vonatkozóan, hogy a csonthéjasokat érő virágzáskori monília fertőzéssel szemben ellenálló genotípusoknál milyen transzkriptomikai eltérések biztosíthatják az ellenállóságot. A kajszfajták fogékonysági sora alapján választhattam ki a sor két végpontjáról a vizsgálatom alanyait. Az eltérő fenotípust mutató szövetek transzkriptomikai eltéréseinek nyomonkövetésére a cDNS AFLP technikát választottam, amely egy véletlenszerű és előzetes szekvencia ismeretét nem igénylő, minőségi és mennyiségi különbségek kimutatására használható véletlenszerű markerezési technika.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkám során célom, a több éven keresztül biztos fenotípust mutató két fajtának, ('Orange Red', 'Zard') a *Monilinia laxa* (EHRENB. ex PERS.) SACC. et VOGL. által okozott virág- és vesszőpusztulásának transzkriptomikai eltéréseinek nyomonkövetése cDNS AFLP technikával:

- eltérő transzkriptomikai változást mutató szekvenciák meghatározása
- szekvenciák őszibarack genomjával és az NCBI (National Center of Biotechnology Information) adatbankkal történő összehasonlítását és a homológia alapján, a gén funkciók meghatározását.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A kajszii jellemzése

Növényrendszertani besorolás szerint a kajszii a *Rosales* rend *Rosaceae* családjához, ezen belül a *Prunoideae* alcsaládhoz tartozik. A *Prunoideae* alcsaládban a magház középső állású, egy termőlevélből kialakuló és a bennük lévő magkezdemények száma 1-2. A terméshéjra jellemző a finom szőrözöttség vagy csupaszság, a terméshéj pedig az ősökre visszaütv felrepedő. A szíromlevél színe lehet fehér vagy rózsaszínes, alakja sima vagy kanalas, de előfordulhat esetleg a fodros változat is (Soó, 1966).

A kajszii elsődleges géncentruma Kína területén található. A kajszitermesztés ezen a területen már legalább ötezer éve folyik. A faj elterjedésében és a más földrészekre történő eljuttatásában fontos szerepet játszott a nomád népek országútja, a Selyemút, amely Csangantól Bizáncig húzódott. Később még érintette Velencét, Rómát sőt egészen Lyonig is elért (Boulnois, 1972).

Éghajlati igényeit tekintve a kajszii egy fény- és melegigényes növény, amit mérsékelt égövi, kontinentális klímájú hegyvidéki származása is bizonyít. Az alkalmas termesztési területe mindkét féltekén a 30. és 48. szélességi fokok által határolt sávban található meg. Ennek megfelelően Magyarország a termesztetheőség északi határán helyezkedik el (Nyújtó és Surányi, 1981).

A hazánkban termesztett gyümölcsfajok közül elmondható, hogy a kajszii a legfagyérzékenyebb, amely nagymértékben veszélyezteteti a termésbiztonságot. A faj fagytürésében kritikus időszaknak tekinthető a téli nyugalmi időszak második fele, mely során az erőteljes hőmérséklet-ingadozások igencsak próbára teszik a kajszit. A fák fagy által leginkább veszélyeztetett részei a virág- és hajtásrügyek, ezeket követi a vessző, végül a

legellenállóbbnak tekinthetők az idősebb fás részek. A fagyűrész mértékét az öröklött genetikai tulajdonságok és annak kölcsönhatásai határozzák meg, így az egyes fajták között nagy különbségek tapasztalhatók.

Magyarországon három fontos termesztő körzetet különböztethetünk meg, melynek központjai Kecskemét, Gönc és Tolna, melyek közül a faj igényeinek legmegfelelőbb a gönci (Szalay, 2003). A termőhely kiválasztásánál fontos figyelembe vennünk annak fekvését, kitettségét és tengerszint feletti magasságát, hiszen ezek mind befolyásolják a termésbiztonságot. A kajsziról elmondható, hogy a domb-és hegyoldalakon valamint fennsíkon érdemes termesztani, a sík vidékeket nem kedveli. A legmegfelelőbb termőhelyeknek tekinthetők azok, melyeknek tengerszint feletti magassága a 200 métert meghaladja. Még a 150-200 m magasság esetében is sok jó termésbiztonságú terület található. A területek lejtését tekintve hő-és fényigény szempontjából, a déli fekvésű lejtők lennének a legjobbak, azonban ezt a tél végén korán meginduló vegetáció veszélyezteti. Így a termesztés szempontjából érdemes nyugati vagy keleti lejtők választása (Szalay, 2003).

3.2 A kajszi nemesítése Magyarországon

A világon jelenleg több mint 1800 kajszifajtát tartanak nyilván, ezek közül 600-at pedig az elmúlt negyven év alatt nemesítettek ki. Ez alapján úgy tűnhet, hogy a kajszi nemesítésében nagy fellendülés tapasztalható, ám jobban megvizsgálva átértékelendő ez a megállapítás, hiszen a világ kajszitermésének zömét mindössze 30-40 fajta adja. A kajszi honosítása jóval nehezebb feladat, mint más csonthéjasoké vagy az almáé, hiszen ökológiai adaptációs képessége korlátozott. A nemesítők körében ezért sokáig az a nézet uralkodott, hogy a kajszit csak ott érdemes nemesíteni ahol az adott fajtát használják, azonban a ma forgalomban lévő fajtahasználat ellentmond ennek, bár teljes mértékben nem vethető el, mint alapelv (Pedryc, 2003).

Hazánkban már az 1930-as években elkezdődött a kajszifajták tudatos nemesítése. Ennek első lépéseként a kajszi klónjait az Országos Pomológiai Bizottság törzskönyvezte, többek között első klónokként a 'Magyar kajszi', 'Borsi rózsabarack', 'Kései rózsza' és a 'Korai piros' fajtákat (Pedryc, 2003).

A hazai nemesítésben felmerülő problémák orvoslására és a nemesítés helyzetének javítására való igényt elsőként Magyar Gyula fogalmazta meg. Ezek közül a legszükségesebb feladatnak tartotta a fajták moníliaérzékenységi mértékének csökkentését, a Magyar kajszi télállóságának növelését valamint a Korai piros nevű fajta minőségének javítását is. Munkásságát az első nemesítési programnak is nevezhetjük, hiszen a javítandó problémakörök megjelölése mellett, azok megoldásukra alkalmas nemesítési eljárásokat is felvázolta. A javasolt eljárások közül a keresztezéses nemesítést tartotta a legfontosabbnak (Pedryc, 2003).

Magyar Gyula tervei csak jóval később, az 1950-es években kerültek megvalósításra, Maliga Pál jóvoltából. Ő volt ugyanis az, aki elsőként végzett keresztezéseket a kamaraerdei törzsgyümölcsösben. Szülöként a Magyar kajszit, a Kései rózsát, a Rakovszkyt, az Akmét és a szibériai kajszit választotta. Később Maliga munkáit a ma Érdi Gyümölcs-és Dísznövénytermesztési Kutató és Fejlesztő Kht (korábbi nevén Kertészeti Kutató Intézet) szakemberi folytatták, akik a megmaradt hibridpopulációk kiértékelését végezték. Így került be a fajtajegyzékbe a 'Pannónia' fajta (Pedryc, 2003).

Szintén az 50-es évek elején indult el a magyar kajszinemesítés eddigi legértékesebb szakasza, a táj-és klónszelekció, melyet Nyújtó, Korponay, Rozsnyai és Brózik közreműködésével és irányításával történt. Ebből a szelekciós munkából származik a mai magyar fajtaválaszték jelentős része, úgymint 'Magyar kajszi C.235', 'Gönci magyar' kajszi klónok, 'Ceglédi óriás' és 'Ligeti óriás' fajták valamint 'Kései rózsza' klónjai (Nyújtó, 1988).

Cegléden a keresztezési munkát az 1960-as évek végén kezdték meg, mely során 3500 hibridet állítottak elő. Az itt végzett munka során olyan hibridállományt hoztak létre, melynek előállításakor sok új elemet vezettek be a nemesítési folyamatok során. Nemcsak új fajták előállítása volt a cél, hanem egyes fajtákra jellemző tulajdonságok genetikai hátterének feltárása, a hibridek populációgenetikai módszerekkel való értékelésével (Banainé, 1981). A ceglédi állomáson jelentős honosítási munkákat is végeztek, így ma is számos külföldi és gazdag génforrást jelentő fajtát találunk a hazai fajtaválasztékban (Kerek, 1988).

Az egyetmünk és tanszékem jogelődjén, a Budapesti Kertészei Főiskola Növényörökléstani és Nemesítési Tanszéken, a kajszi nemesítése már az 1950-es évek közepén folyt, ahol késői virágzású, tél- és szárazságtűrő, nagy cukortartalmú fajták előállítását tűzték ki célul. A program érdekessége és sikeressége abban állt, hogy a keresztezésekben hangsúlyt fektettek a közép-ázsiai, iráni-kaukázusi és más fajták használatára, amelyek genetikailag távol álltak a magyar fajtáktól. Tamássy István, Pedryc Andrzej és Pejovics Bogdán munkásságából születtek meg a 'Budapest', 'Harmat' és 'Korai zamatos' fajták (Pedryc, 2003). Jelenleg

három fajtajelölt áll bejelentési folyamat alatt és több mint négyezer hibridmagonc vár a bonitálásra az elkövetkező években (Gutermuth Á. személyes közlés).

A magyar nemesítések során elengedhetetlen feladat volt az új fajták kiértékelése, termesztési értékeinek megállapítása. Ebben nagy szerepet vállalt a Mezőgazdasági Minősítő Intézet, amely emellett még nagy figyelmet fordított a fajták konzervipari felhasználhatóságára is (Harsányi, 1986, 1988; Fazekas és Harsányi, 1986).

3.3 A kajszi monília virág- és vesszőpusztulása

A *Monilinia laxa* (EHRENB. ex PERS.) SACC. et VOGL. kajszin előforduló biotróf kórokozó, mely virág-és vesszőpusztulást, ágrakot, valamint gyümölcsrothadást okoz. Rendszertanilag az Apotéciumos gombák közé tartozik, mely az *Ascomycota* törzs, *Ascomycetes* altörzsébe sorolható (Hawksworth, Kirk, Sutton, Pegler, 1995). Az Apotéciumos gombák ivaros képlete az apotécium, egy tál vagy tölcsér alakú termőtest, melyben aszkuszkok és aszkospórák találhatóak. A *Monilinia laxa*nak tölcsér alakú apotéciuma van, amely egy nyélből és egy kiszélesedett feji részből tevődik össze. A külső szilárdító fala az *excipulum*, nagy sejtekből álló paraplektenhíma. Belsejét a *medulla* alkotja, amely szintén paraplektenhíma, csak az keskeny, megnyúlt sejtekből áll. Az apotécium kiszélesedett részében találhatóak az aszkuszkok és aszkospórák (ivaros szaporítóképletek) valamint a *parafízisek*. Az apotécium fejlődhet *szkleróciumon* vagy *álszkleróciumon*, ahol többesével, ritkán csak magában jön létre. A *Monilinia* nemzetség esetében a tölcsér alakú apotécium többesével, *álszkleróciumon*, azaz gyümölcsmúmián jön létre. Az apotécium belsejében 8, egysejtű, ovális, színtelen aszkospóra található (Glits, 2000).

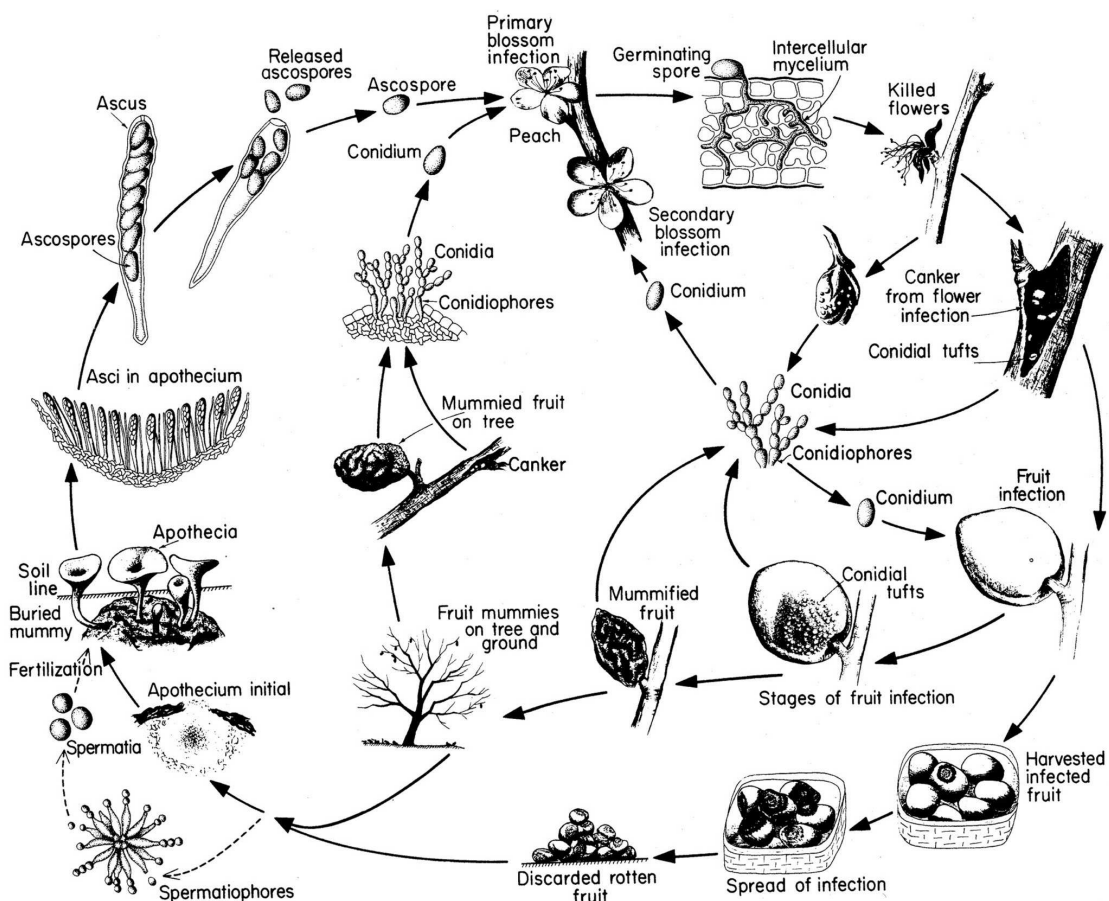
A nemzetségbe tartozó fajok közül a *Monilinia laxa* (EHRENB. ex PERS.) SACC. et VOGL. elsősorban a csonthéjasokon jellemző. Magyarországon csak ez a konídiumtartós alak fordult még elő, az apotéciumos alakja *Monilinia laxa* (ADERH. et RUHL) HONEY ex DENNIS Európában csak ritkán található meg, hazánkban eddig még egyáltalán nem ismert (Glits, 2000).

A *M. laxa* által kiváltott tünetek a virágon, a hajtáson, a vesszőn, az ágon és a gyümölcsön figyelhetőek meg. A kórokozó fertőzésekor a virág csésze- és szíromlevelei világosbarnára színeződnek, a virágkocsány elhal, és megfigyelhetőek rajta a szürke színű, apró exogén sztrómák. A termőnyársak elpusztulnak és a tövüknél mézgaecseppek jelennek meg. A hajtás alsó harmadában szabálytalan alakú, több ízközre kiterjedő barna folt

jelentkezik, amely később kifakul, felületét pedig exogén sztrómákból álló bevonat borítja. Ezek után a hajtás először lelankad, majd leszárad. Akkor is bekövetkezhet hajtáspusztulás, ha az a rothadó gyümölcs mellett található. A *vesszőn* a termőnyársak tövében ovális, sötétbarna, kissé besüppedő foltokat láthatunk. Az *ágon* rákos sebek alakulnak ki, amelyekben elszórtan szürke exogén sztrómák figyelhetők meg.

A *gyümölcsön* egyre nagyobbodó barna színű rothadás látható, amely végül az egész gyümölcsre kiterjed. Ezeken a rothadó foltokon elszórtan apró, szürke, exogén sztrómákból álló bevonatra lehetünk figyelmesek (Glits, 2000).

A *M. laxa* jelentős fertőzési forrásait a gyümölcsmúmiák alkotják. A gyümölcsmúmiákon található exogén sztrómákon az előző évben képződött konídiumok télállóak, sőt a tél folyamán újabb konídiumok is keletkeznek. Tavasszal a gyümölcsmúmiákon új exogén sztrómák fejlődnek, amelyeken láncokban konídiumok fűződnek le. A vesszőkön és az ágakon lévő rákos sebek jelenhetnek meg. Ezeken a sebekben a kórokozó micéliummal ével, és tavasszal új exogén sztrómákat hoz létre. A különböző fertőzési forrásokon létrejött konídiumok légmozgással vagy esőcseppel a virágra jutnak. A virágra került konídiumok a bibén ugyanúgy csíráznak, mint a pollen. A konídiumok csíratömlője a bibecsatornán keresztül a hajtásokba kerül. A gyümölcsbe a kórokozó a kártevő állatok által ejtett, valamint a jég ütötte sebekben, illetve az egyenetlen vízellátás miatt keletkezett repedéseken keresztül jut. Az egymással szorosan érintkező, terméscsoportban álló gyümölcsökbe ezután már az ép héjon keresztül micéliummal halad tovább a kórokozó (Glits, 2000).



1. ábra: A *Monilinia laxa* teljes fejlődési ciklusa (George N. Agrios: Plant Pathology, Fourth Edition.)

3. 4 Kajszfajták virágzáskori moniliás betegséggel szembeni fogékonysága

A Magyarországon jelenleg forgalomban lévő és államilag elismert kajszifajtákat a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal által kiadott Nemzeti Fajtajegyzék tartalmazza. A Nemzeti Fajtajegyzék a Gyümölcs-Szőlő Fajtaminősítő Bizottsága állásfoglalása alapján, minden évben a hivatal által közzétételre kerül.

Magyarországon a gyümölcs és szőlő állami elismerésének jogszabályi kereteit a növényfajták állami elismeréséről valamint a szaporítóanyagok előállításáról és forgalomba hozataláról szóló 2003 évi LII. törvény, valamint annak végrehajtására kiadott (40/2004. (IV.7.) FVM rendelet biztosítja. A gyümölcs szaporítóanyag előállítását, forgalmazását és felhasználását a 64/2004. (IV.27.) FVM, a szőlő szaporítóanyag előállítását, forgalmazását és felhasználását a 87/2006. (XII.28.) FVM rendelet szabályozza (Nemzeti Fajtajegyzék, 2011, Bevezetés).

Fajta	Származás	Monília betegség
<i>Bayoto</i>	US	-
<i>Bergeron</i>	FR	3
<i>Borsi-féle kései rózsza</i>	HU	2
<i>Budapest</i>	HU	4
<i>Ceglédi arany</i>	HU	3
<i>Ceglédi bíborkajszi</i>	HU	2
<i>Ceglédi gömbölyű</i>	HU	-
<i>Ceglédi kedves</i>	HU	-
<i>Ceglédi napsugár</i>	HU	-
<i>Ceglédi óriás</i>	HU	4
<i>Ceglédi Piroska</i>	HU	4
<i>Ceglédi szilárd</i>	HU	-
<i>Gönci magyar kajszi</i>	HU	1
<i>Harmat</i>	HU	3
<i>Harcot</i>	CA	4
<i>Korai piros</i>	HU	3
<i>Korai zamatos</i>	HU	3
<i>Larclyd</i>	HU	-
<i>Ligeti óriás</i>	HU	-
<i>Magyar kajszi C.235</i>	HU	1
<i>Mandulakajszi</i>	HU	4
<i>Nyújtó Ferenc emléke</i>	HU	-
<i>Pannónia</i>	HU	3
<i>Priboto</i>	US	-
<i>Rakovszky</i>	HU	-
<i>Roxana</i>	HU	4
<i>Rózsakajszi C.1406</i>	HU	2
<i>Szamarkandszkij rannij</i>	HU	3
<i>Toyaco</i>	CA	-
<i>Toyesi</i>	US	-
<i>Toyuda</i>	US	-

1. táblázat: A fajtajegyzékben megtalálható fajtákat származásuk és monília betegség iránti fogékonyságuk alapján táblázatba szedtem. A fogékonyság mértékét 1-5-ig tartó számozással szemléltettem, ahol 5 a legérzékenyebb, 1 pedig a legkevésbé érzékeny a betegségre. Az számozást már meglévő szakirodalomi forrásból illesztettem be a táblázatomba (Dr. Péntes Béla - Dr. Szalay László: Kajszi, 2003). Nem minden fajtáról találtam adatot, ám általánosságban elmondható, hogy a fajták közül nagyobb számban fordultak elő azok, amelyek a betegségre fogékonyabbak.

A virágzáskori monília vészőpusztulás a legjelentősebb gombás megbetegedés a magyarországi kajszi ültetvényekben. Mint azt a fent lévő táblázatban is összefoglaltam, a Magyarországon termesztett fajták különböző mértékben fogékonyak rá. Teljesen rezisztens fajtákat még nem ismerünk.

A virágzás időszaka alatt végzett különböző kémia védekezések költségesek, növelik a környezet szennyezettségét és gyakran nem hatásosak a fertőzés megállítására. 2004-ben Gönc térségében végzett kísérletek alapján, síkvidéken lévő ültetvény esetében 3, dombvidéken 2 gombaölő hatású permetezést végeztek a kórokozó által okozott sérülések, ágelhalások kialakulásának visszaszorítására, ám teljes védettséget ez sem adott (Drén et. al., 2007). A kezelés sikertelenségének oka lehet, hogy a fertőzés szisztemizálódik a fákban, vagy a kórokozó ellenálló a gombaölő szerekkel szemben.

A *M. laxa* által okozott vesszőpusztulás két módon mehet végbe. A leginkább ismert és gyakran feljegyzett fertőzési folyamat esős időben játszódik le, mégpedig a gombakórokozó által megfertőzött virágból indul ki, majd a több éves gallyakat károsítja. Ezzel szemben a másik esetben a kórokozó a gallyak szövetébe hatol be és feltehetően innen terjed tovább a fa többi részébe. A tárgyalt jelenséget először meggynél (*Prunus cerasus* L.) figyelték meg (Guido és Thomas, 2006) de később a kajszii ültetvényekben és házi gyümölcsöskertekben is elterjedt.

A vesszőpusztulás már a virágzás alatt bekövetkezik még száraz időjárás esetén is. Problémaként merülhet fel, hogy a gombaölő szerek alkalmazása csak a virágfertőzés megakadályozására javasolt.

A fák védelmét úgy tudnánk a legmegfelelőbben biztosítani, ha a kórokozóval szembeni rezisztens fajtákat állítanánk elő, így emellett még környezetvédelmi és gazdasági szempontok szerint is előnyösebben járnánk el. Ennek a feladatnak szükségességét már a 3.2 *A kajszii nemesítése Magyarországon* fejezetben tárgyalt Magyar Gyula is felismerte. Mai használatban lévő hagyományos magyar fajták közül, (pl.: 'Gönci magyarkajszii') mutatják a legnagyobb ellenállóságot a fertőzéssel szemben, a külföldi fajták pedig jelentősen fogékonyabbak. Sajnos az ellenálló fajták termései nem annyira piacképesek, mert gyümölcsminőségük kereskedelmi szempontokból nem megfelelő. Ezzel szemben a mérsékelt ellenálló vagy fogékonyabb fajták kielégítik a modern piac szükségleteit.

A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszék szigetcsépi ültetvényében a 2004-2009 években elvégeztek egy olyan átfogó fajtakiértékelési kísérletet, mely során különböző földrajzi helyekről származó kajszifajták monília vészpusztulásra való fogékonyságát vizsgálták.

A folyamatos megfigyelések és feljegyzések arra mutattak rá, hogy a *M. laxa* kórokozóval történő természetesen fertőzött fák kiértékelésére és az egyes fajták rezisztencia mértékének meghatározására nem elegendő egyetlen év, hiszen így nem kaphatunk megbízható eredményeket. A fogékonyság alapján rangsorolt fajták sorrendjének

felállításakor befolyásoló tényező lehet még az, ha az előző évi ágpusztulásokat és gyümölcsrothadást is figyelembe vesszük. Fontos leszögeznünk azt, hogy nincs semmilyen jelentős összefüggés az elsődlegesen fertőzött virágok száma és a kórokozó által károsodott ágak mennyisége között. Azokból a gallyakból, amikben a fertőzés lappang még a virágzási időszak előtt áterjed a kórokozó a virágrügyekbe és egy látens fertőzés alakul ki.

Több éven keresztül megfigyelések az időjárás által okozott évjáráthatást figyelmen kívül hagyja, így a vizsgált fajták ellenálló és fogékony tulajdonságait fedi fel. Az egyetem ültetvényében található fajták fogékonyságának mértékét a felvételezett tünetek alapján határozták meg és a fajtákat így a következő csoportokba sorolták:

0 - Teljes mértékben rezisztens: a virágok elpusztulnak, de a gombamicélium nem tudott elterjedni a háncsban.

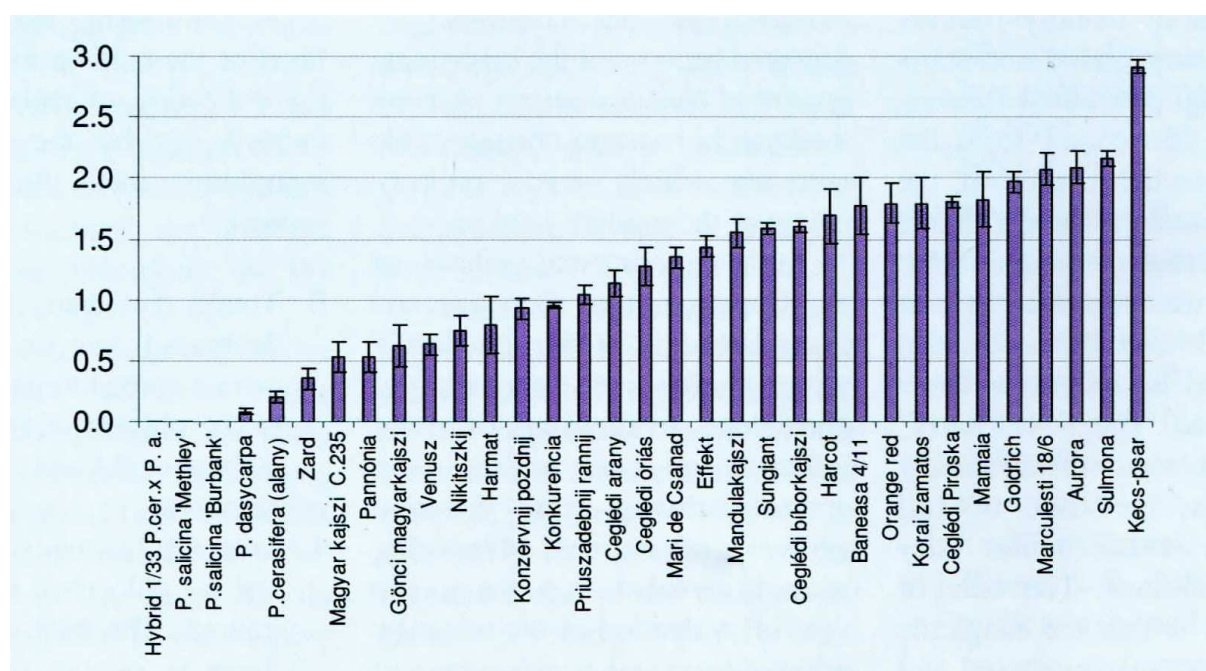
1 - Rezisztens: a virágok elpusztultak és a hajtások hánca károsodott, a kocsány körüli fertőzött szövetrészt kiterjedése kisebb mint 10 mm.

2 - Közepesen fogékony: a fertőzött termőrészek aránya kevesebb, mint 20 %. A legtöbb hibrid és az ültetvényből származó kísérleti fajta ebbe a csoportba sorolható.

3 - Fogékony: a fertőzött termőrészek aránya több, mint 20 %. Ezek a tünetek akár virágzáskori száraz időjárás esetén is megjelennek.

(0) Totally resistance	(1) Tolerant	(2) Semi sensitive	(3) Sensitive
Hybrid 1/33 (<i>P. cerasifera</i> x <i>P. armeniaca</i>)	Zard	Nikitszkij	Ceglédi óriás
<i>P. salicina</i> Methley	Pannónia	Konzervnij pozdnij	Mari de Csanad
<i>P. salicina</i> considering Burbank	Magyarkajsi C.235	Harmat	Mandulakajsi
<i>P. dasycarpa</i>	Venusz	Konkurencia	Goldrich
<i>P. cerasifera</i> 23/22	Gönci magyarkajsi	Ceglédi arany	Ceglédi bíborkajsi
			Harcot
			Orange red
			Korai zamatos
			Ceglédi Piroska

2. táblázat: A kiértékelés eredményeit láthatjuk táblázatba foglalva, ahol a fent említett 4 csoportba sorolták a vizsgált fajtákat. (Gutermuth Á., Pedryc A., 2010, után)



2. ábra : Kajszfajták rangsora a *M. laxa* kórokozóra való fogékonyságának szempontja alapján. A teljesen rezisztens fajta 0, a legfogékonyabb 3. (Szigetcsép, 2004-2009) (Gutermuth Á., Pedryc A., 2010, után)

Összehasonlítva az 1. és 2. táblázatban összefoglaltakat, elmondhatjuk, hogy a két eltérő kiértékelési kísérletből származó eredmények nagyrészt megegyeztek. Egyedül 2 fajta esetében találtunk eltérést a két táblázatban. A 'Pannónia' fajtát az egyik kutatás során közepesen fogékornak (3-as érték) találták, míg a másik esetben a rezisztens csoportba (tolerant) sorolták. A 'Ceglédi bíborkajsi' fajta vizsgálatakor a két kísérlet teljesen eltérő eredményekre jutott, az egyik esetben rezisztens, a másikban fogékornak állították a monília vészőpusztulással szemben.

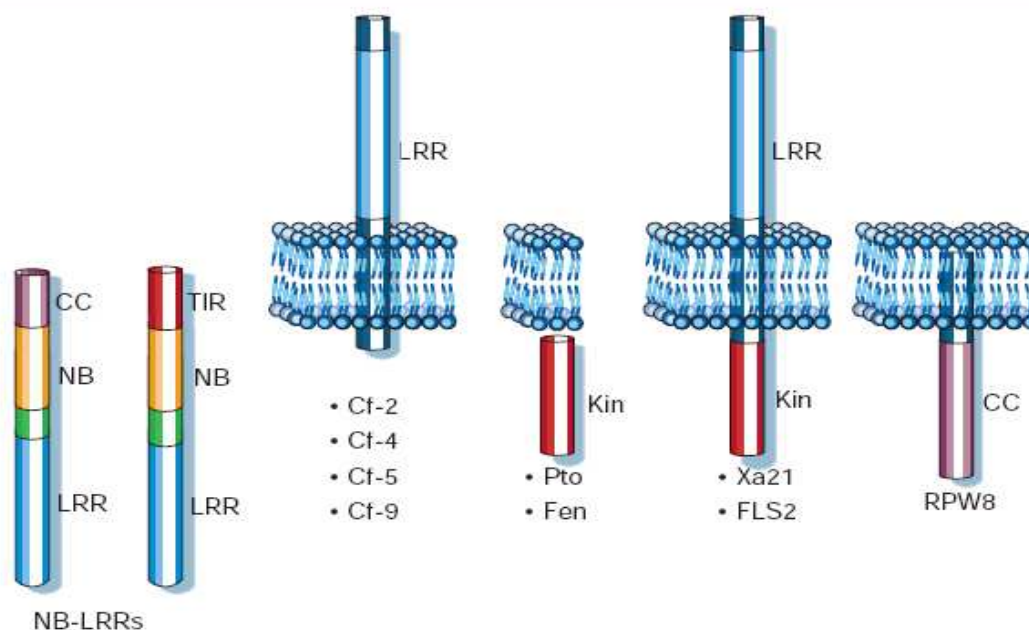
3. 5 A kajszifajták eltérő válaszreakciója *Monilinia laxa* vészőfertőzésére

'Zard' és 'Korai zamatos' fajta, mesterséges vészőfertőzésére adott válaszreakciónál Gutermuth és Pedryc (2010) megállapították, hogy az ültetvényben tapasztalt ellenállóság nem korrelál a vészőkön tapasztalható pusztult szövetek méretével. Az elpusztult és ép szövet határvonala mutatott hasonlóságot az ültetvényben tapasztalt fenotípusokkal, amíg az ellenálló 'Zard' fajta esetében ez a határvonal jól elvált, az ép szövet megvastagodott, addig a fogékony 'Korai zamatos' fajtánál ez a határvonal elmosódott, hosszan elfutó, barna szövetrészek voltak megtalálhatóak az ép szövetben is.

3.6 Rezisztenciagének növénypatogén gomba kórokozókkal szemben

3.6.1 Rezsizetncia gének csoportosítása szerkezetük alapján

A rezisztenciagének termékei receptormolekulák vagy olyan fehérjék, amelyek a fogadott jel továbbításában töltnek be kulcsfontosságú szerepet (Hornok, 2004). 2006-ig több mint 70 rezisztenciagén izolálása történt meg különböző növényfajokból (Xiao, 2006.). A rezisztenciagének öt osztályba sorolhatóak az általuk kódolt fehérjék szerkezeti felépítése és azok feltételezett működési mechanizmusa alapján (3. ábra). Az egy osztályba sorolt gének sokszor változatos kórokozó csoportok felismeréséért felelősek.



3. ábra: Az öt fő növényi rezisztencia fehérjecsoport: A legnagyobb számú R proteincsoport az NBS-LRR csoport, amely a citoplazmában helyezkedik el. Az N terminális részén különböző (CC vagy TIR) doménokat tartalmazhat. A második csoportba tartozó *Cf-x* proteinek egy transzmembrán és egy LRR doménnal rendelkeznek. A harmadikként ábrázolt csoportba tartozik például a *Pto* gén, mely egy citoplazmatikus Ser/Thr kináz domént kódol. A negyedik csoportban lévő fehérjék hordoznak egy transzmembrán, egy kináz és egy extracelluláris LRR domént. Ilyen gének például az *Xa21* és *FLS2*. A nemrégiben megismert *RPW8* gén a transzmembrán fehérje N terminálisán egy feltételezett jelfelismerő CC domént kódol (Jones et. Dangl, 2006 után).

Az első – legnagyobb számban képviselt – csoportra jellemző, hogy egy NBS-LRR (nucleotid binding site – leucine-rich repeats) régiót tartalmazó fehérjét kódolnak. Az NBS régió, azaz nukleotid kötőhely fontos szerepet játszik az ATP és GTP megkötésében. Az LRR, vagyis leucingazdag régió a rezisztenciagének specifikását biztosítja. Ezek a gének tovább csoportosíthatók annak alapján, hogy analógjaik az N terminálison hordozhatnak egy TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor) vagy egy CC (coiled-coil) típusú domént. Az egyszikű növények csak CC-NBS-LRR típusú géneket tartalmaznak, kétszikű növényekben pedig mindkét géncsalád jelen van. Növényi genomszekvenciák alapján megállapították, hogy ezek az RGA-k a genomban elszórtan, de csoportokba, ún. klaszterekbe rendeződve találhatók (Yang, 2008). Ez a fehérjecsoport alapvetően obligát biotrófok, hemibiotrófok ellen biztosít védelmet. Nekrotrof kórokozókkal szemben hatástalan, a biotróf kórokozokat hiperszenzitív

válással hatástalanítják (Jones et. Dangl, 2006). A géncsalád az ismert növényi genomok összes fehérjét kódoló génjeiknek 0,6-2% részét adják (Argout, X. és mts., 2011).

A második csoportba olyan gének sorolhatók, melyek membránon áthatoló, nagyméretű

extracelluláris leucin gazdag ismétlődést (eLRR) tartalmazó régiókkal rendelkező fehérjéket kódolnak. Az extracelluláris leucin gazdag ismétlődést tartalmazó fehérjecsoport fontos szerepet tölt be a kórokozók felismerésében mind a rasszspecifikus és az általános rezisztenciák esetében (Dangel et. Jones, 2001). Az eLRR domain változatos szerkezete lehetőséget biztosít eltérő vegyületekkel létrejövő kapcsolatokra, mint például peptidek proteinek és szteroidok. Mindannak ellenére, hogy nagy számban határoztak meg eLRR receptorok funkcióját, a felismerő képességük szerkezetük alapján nem meghatározható (Dievart et. Clark 2004).

A harmadik csoport azon gének csoportja, melyek egy citoplazmatikus Ser/Thr kináz domént tartalmazó fehérjét kódolna.

A negyedik csoportba az intracelluláris proteinkináz és transzmembrán receptorral ellátott extracelluláris LRR doménnel rendelkező rezisztenciagének tartoznak.

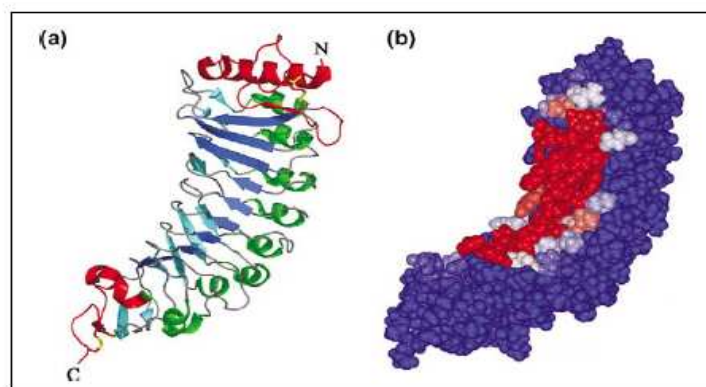
Az ötödik, utolsó csoportot olyan gének alkotják, melyek által kódolt membrán fehérjén egy coiled-coil domén található (Dangl et. Jones, 2001).

3.6.2 Poligalakturonázt gátló fehérjék, mint a nekrotróf növénypatogén gombák ellenszere

Az extracelluláris leucingazdag régiót (eLRR) tartalmazó domainekből felépülő fehérjék egy része a nekrotróf gombákkal szembeni ellenállóság kialakításában vállalnak döntő szerepet (Federici et al. 2005). Az eLRR egy tandem ismétlődését tartalmazza az alábbi:

LxxLxxLxLxxNxLt/sgxIPxxLGx 24 aminosavat tartalmazó motívummal. A központi eLRR domén jobb irányú szuperhelixként összesen a 10 ismétlésben tartalmazza a 24 aminosavból felépülő leucin gazdag részt (Kobe és Kajava, 2001). Az enzim három jól elkülöníthető részből áll: a párhuzamosan elhelyezkedő β -lemezek, ami a szolenoid konkáv részén helyezkednek el, a konvex rész három rövid α -helixből áll és a harmadik rész a két részt összekapcsoló β -lemez. Az LRR domént kétoldról ciszetein gazdag doménok határolják. Négy diszulfid híd stabilizálja – kettő az N terminálison míg kettő a C-terminálison – a

fehérje szerkezetét és biztosítja a hidrofób szolenoid két végének lezárását (4. ábra). A poligalakturonáz gátló fehérjék (PGIP), ahogy elnevezésük is mutatja, a gombák által termelt és kiválasztott poligalakturonáz enzim (PG) felismerésért és aktív gátlásáért felelősek. A poligalakturonáz enzimek a gomba kórokozók növényi kolonizálásának korai szakaszában játszanak szerepet, a homogalakturon polimereket bontják, ami a pektin legnagyobb részét alkotja, így a sejtfal szerkezete gyengül meg. Gyümölcsökben előfordulásukról Fielding (1981) számol be elsőként. Poligalakturonázokat mutattak ki *Monilia fructigena*-val fertőzött szilva és őszi gyümölcsökből izoelektromos fókuszálással, míg alig vagy egyáltalán nem volt kimutatható az enzimaktivitás a fertőzés kialakulásakor a nyers gyümölcs mintákon. Keverési kísérletek egy poligalakturonáz gátló anyagnak jelenlétét erősítették meg, ami izoelektromos fókuszálással elválasztható volt az enzimtől. A gátló anyag jellegét tekintve makromolekula, hőhatásra instabil és tripszines kezelésre gátló hatását elveszítette (Fielding, 1981). A PG-PGIP közötti kölcsönhatásként csökken a PG agresszivitásuk mellett, hogy az apoplasztban elicitor aktív oligogalakturonok halmozódnak fel. Ezen vegyületek általános elicitorai védekezési mechanizmusok beindításának, amik fitoalexinek, lignin, glükánázok, proteináz inhibitorok és reaktív oxigén gyökök (ROS) felhalmozódásaként jelentkeznek. Ezek tipikus válaszreakciói a nem specifikus rezisztencia folyamatoknak, amiket a *patogén* asszociált molekuláris mintázat (*PAMP*) felismerése vált ki (Dangl et. Jones, 2001). Japán és európai körtefajták, amik eltérő fogékonysággal rendelkeztek a *Venturia nashicola* kórokozóval szemben, nem mutattak jelentős eltérést a PGIP génjeik aminosav szekvenciájában, míg a levélen történő fertőzés következtében kizárólag az ellenálló fajtákban kezdődött el a PGIP gén expressziója (Faize M. et al., 2004). A vizsgált fajták érett gyümölcsseiben a PGIP fehérje fertőzés nélkül is folyamatosan változatlan szinten jelen volt.



4. ábra: A kristály szerkezete a bab poligalakturonáz gátló enzimének (PvPGIP2). A N- és C-terminális cisztein gazdag doménjeit pirossal jelölték. Mindkét terminálison található

diszulfid kötések sárgával jelölik, ami a központi hidrofób szolenoid részt zárják le. A központi eLRR domén tíz tandem ismétlődésből áll. Három szerkezeti részből épül fel a fehérje: a kék β -lemezek (B1) a konkáv oldalon helyezkednek el, míg a három α -helix rész a szolenoid konvex oldalát építi fel (zölddel jelölve). A nem szabályos alakú β -lemez a szolenoid két oldala közé ékelődik be.

A fehérje interakcióra képes részét pirossal jelölik a 'b' képen, ami fehérjék közötti kapcsolódásra alkalmas, míg kézzel jelölt rész interakciókra való affinitása csekély. A szolenoid konkáv oldalán nagy felület képes fehérjékkel történő összekapcsolódásra (Federici et al. 2005, után).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Növényanyag

Kutatásom alapanyagaként a Budapesti Corvinus Egyetem szigetcsépi felhagyott kajszigyűjteményéből származó *‘Zard’* és *‘Orange red’* (NJA32) fajtákat választottam. Az előző fejezetekben megállapítottak alapján, azért erre a két fajtára esett a választásom, mert a *M. Laxa* kórokozóval szembeni ellenállóság alapján ezek a két szélső határértéket mutatták, a *Zard* ellenálló, az *Orange red* fogékonynak bizonyult. Eredetüket tekintve a *Zard* a közép-ázsiai nemesítési vonalba tartozik, az *Orange red* pedig New Jersey-ből származik.

Mindkét fajta esetében a fákról 2 fertőzetlen és 3 fertőzött hajtás lett begyűjtve. A szedés időpontja 2 alkalommal történt, az első esetben teljes szíromhullást követően 5 nappal, a második esetben pedig 10 nappal. A mintákat ezüstpapírba és száraz jégbe téve szállítottam be az egyetemre.

4.2 RNS izolálás

A vesszők szövetét steril szikével lehámoztuk a fás részig, majd a fertőzés alatti ép szövetet 1 cm szélességben körbehámoztuk.

Az izolálás során forró bórsavas extrakciót (Hot Borate) alkalmaztunk. A mintákat az RNS kivonásáig fagyasztóládában, -70 °C-on tartottuk eppendorfokban.

Az RNS kivonás Hot Borate módszerrel (Wan et. Wilkins, 1994): Az RNS kivonása ezzel a módszerrel 3 napos folyamat.

Az RNS kivonó (extrakciós) puffer: 200 mM Borax (Sodium borate decahydrate) pH=9.0

(U.S. Borax Inc., Boron, USA)

30 mM EGTA (EDTA- ethylenediaminetetraacetic acid)

(Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, USA)

1 % SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

10 mM DTT (Dithiothreitol) (Promega BioScience, USA)

Kivonó pufferhez hozzáadandó: 1 % Sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2 % PVP

2 % DIECA (diethyldithiocarbamate)

0,5 % Nonidet-40 = Trixon X-100

Első nap: A lefagyasztott növényanyagot porrá dörzsöltük folyékony nitrogénben. A kivonó (extrakciós) puffert (200 mM Sodium borate decahydrate, pH =9,0) 80 °C-ra melegítettük. 0,1-0,2 g szövethez adtunk 1000 ul (1 ml) felmelegített kivonópuffert ezt 2 percig Vortexeltük. majd 10 percig állni hagytuk. Ezután a mintákhoz 5 ul Proteinkináz K-t (Fermentas International Inc., Ontario, Canada) adtunk. Ezt összekevertük, majd 42 °C-on, 100 rpm-en rázatva, 1,5 óráig inkubáltuk. Ezután 150 mM-os 36 ul KCl-ot (4,8 mol) adtunk hozzá, majd jégen 1 óráig hagytuk. Ezt követően 12000 g-n 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót leszűrtük (ezt vittük tovább), és RN-áz mentes, tiszta Eppendorf csövekbe tettük. Az RNS-t 2 M-os 250 ul (1/4 vol 10 M LiCl) LiCl-al csaptuk ki, majd jégre tettük, ott egy éjszakán át inkubáltuk.

Második nap: A mintákat 12000 g-n, 20 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. 1 ml 2 M-os 4 °C-os LiCl-al mostuk a pelletet, míg a színét el nem vesztette (3 mosás). A mosások között 12000 g-n, 4 °C-on pár percig centrifugáltuk, hogy a pellet az Eppendorf aljához tapadjon. Majd hozzáadtunk 400 ul ml 10 mM-os 4 Cos Tris-HCl-t, hogy a pelletet visszaoldjuk. Ezt a lépést úgy végeztük el, hogy a mintánk közben jéggel hűtve voltak. Ezután centrifugába tettük 10 percre, 12000 g-n, 4 °C-on. A felülúszót átvittük új, tiszta csövekbe, majd hozzáadtunk 16 ul, 5 M-os kálium-acetátot a minta kicsapása céljából. Ezután 15 percre jégre tettük. Az idő letelte után centrifugába tettük a mintákat 5 percre, 12000 g-re, 4 °C-on. A felülúszót új csőbe vittük át. Ezután hozzáadtunk 1000 ul 2,5 M-os abszolút (96 %-os) etanolt, majd -20 °C-ra betettük a mélyhűtőbe.

Harmadik nap: A mintákat 10 percig centrifugáltuk (4 °C, 12000 g). A pelletet 1000 ul 70 %-os etanollal (EtOH) átmostuk, majd 2 percig centrifugáltuk, ezután 1000 ul 96 %-os etanollal újra átmostuk. Centrifugáltuk, majd az alkoholt leszívtuk, a pelletet pedig vákumcentrifugában kiszárítottuk. A mintákat 50 ul MQ-val oldottuk vissza, a nukleinsav tartalmat NanoDroppal mértük meg.

A kivonás sikerességét NanoDroppal ellenőriztük.

4.2 Kétszálú cDNS-szintézis

A cDNS szintézisét a (Vuylsteke et. al., 2007) által leírt cikk alapján végeztük el a következőképpen:

Az első szál cDNS szintéziséhez a kivont RNS-t 100 ng/ul-re hígítottuk ki. 11 ul-nyi RNS-hez adtunk 1 ul az 5' végen biotin jelölt oligodT primert (Csertex, Budapest, Magyarország). Ahhoz, hogy az oligodT hozzátapadjon az mRNS polyA farkához az elegyet 5 percig, 65 °C-on PCR készülékben inkubáltuk. Ezután az alábbi mixet készítettük el egy mintához:

5x Reaction buffer (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	4 ul
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
10 mM dNTP mix (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	2 ul
RevertAcid M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
oligodT-vel jelölt RNS	12 ul
összesen	20 ul

A reakció készítése jégen történt. Ezt követően a mintákat 60 percig 42 °C-on inkubáltuk, majd az enzim leállítása céljából 5 percig 70 °C-on.

A kiegészítő szál elkészítéséhez a következő elegyet készítettük el mintánként:

10x Reaction Buffer for DNA Polymerase I. (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	8 ul
RNaze H (E. coli) (5 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,2 ul
DNA Polymerase I. E. coli (10 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	2,2 ul
nukleázmentes víz	69,6 ul

összesen	80 ul
----------	-------

Ezt az elegyet adtuk hozzá a 20 ul-nyi mintához, és ezután 15 °C-on inkubáltuk 2 óráig. A végtermék a kétszálú cDNS. Az RNáz H az elkészült elsődleges cDNS szárlól leemészteti az mRNS-t, de nem az összeset, bizonyos részekben megmarad rajta. Ezek lesznek az indítószekvenciái a DNS polimeráz I.-nek. E. coli ligáz a szintézis során nem használtunk. Ennek a feladata lett volna, hogy a megszintetizált cDNS részeket összekapcsolja, Ettől függetlenül a szintézis sikeres volt.

Ezután a 100 ul kétszálú cDNS végtermékhez 200 ul MQ-t adtunk, majd 300 ul fenol-1 kloroform24 izoamil-alkoholt (ez az elegy 150 ul fenol-1-et, 144 ul kloroform24-et, és 6 ul izoamil-alkoholt tartalmazott). Eztután a mintákat 12 000 rpm fordulatszámon, 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázist tiszta eppendorf csövekbe vittük át. Ezután mintánként 300 ul kloroform24 izoamil-alkoholt adtunk hozzá, majd 5 percig újra centrifugába tettük. A vizes fázist tiszta csőbe pipettáztuk át, majd hozzáadtunk 30 ul nátrium-acetátot, és 2,5x-ös térfogatú 20 °C-os, 96 %-os etanollal (750 ul) kicsaptuk. Ezután 1 óráig -20 °C-on inkubáltuk. Ezt követően 13 000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A mintákat 500 ul 70 %-os, -20 °C etanollal mostuk kétszer, majd vákuumcentrifugában a mintákat megszáritottuk. A DNS-t 30 ul MQ-val oldottuk fel. A folyamat eredményességét NanoDropal ellenőriztük.

4.3 Első emésztés

20 ul-nyi kétszálú cDNS-t 500 ng-ra hígítottuk.

A következő elegyet készítettük el mintánként:

EcoRI. (10 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
--	------

10x Reaction Buffer (Red) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	4 ul
MQ	15 ul
2 szálú cDNS (1 minta)	20 ul
összesen	40 ul

Ezt 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ahhoz, hogy a biotin-jelölt részeket kiválasszuk 25 ul Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen Corporation, California, USA) és 250 ul 2x STEX-et összepipettáztunk, majd összeráztuk, ezután még 125 ul 2x STEX-et adtunk hozzá. 40 ul-t adtunk 1-1 mintához, jól összekevertük, 30 percig, szobahőmérsékleten, óvatos rázogatós mellett inkubáltuk. Ezután a mintákat mágneses állványba helyeztük. A felülúszót óvatosan leszívtuk, majd a kitapadt vas ionos részt 100 ul-nyi 1X STEX-el mostuk, majd új, tiszta csőbe pipettáztuk át. A mosást négyszer ismételtük meg. Az utolsó mosásnál a mágnessel összegyűjtöttük a gyöngyöket, teljesen leszívtuk róluk a STEX-et, majd hozzáadtunk 30 ul T₁₀E_{0.1} puffert (Bioquote Limited, York, UK) ezt új csőbe vittük át.

4.4 Második emésztés

Mintánként a következő összetevőket adtuk:

TruI. (10 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
Red-Buffer (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	4 ul
MQ	5 ul
összesen	10 ul

Ezután 2 órán át, 65 °C-on PCR-ben inkubáltuk a mintákat. Ezt követően a mágnessel gyöngyöket összegyűjtöttük, és a felülúszót új csőbe vittük. Ehhez adtuk hozzá a ligációs mixet. A ligációs mix a következő összetevőket tartalmazta mintánként:

Adapterek ligálása

TruI. Adapter (150 pmol/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,33 ul
EcoRI. Adapter (15 pmol/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,33 ul
10x Reaction Buffer (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
T4 DNS ligáz (1 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
ATP (10 mM)	1 ul
EcoRI. Restriction enzyme (10 U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
MQ	5,34 ul
Összesen	10 ul

A ligációs mix hozzáadása után a mintákat 3 óráig, 37 °C-on inkubáltuk, ezután pedig 50 ul T₁₀E_{0.1} puffert adtunk hozzá. Ezzel az eljárással mintánként 100 ul-nyi templátot nyertünk az AFLP-hez.

4.5 cDNS AFLP első PCR reakciója (preamplifikáció):

A PCR reakcióhoz a következő elegyet állítottuk össze 1-1 mintához

EcoRI. +0 (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1,5 ul
TruI. +0 (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1,5 ul
DreamTaq (5U/ul) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,5 ul
10x Buffer (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	5 ul

MgCl ₂	5 ul
dNTP mix (10 mM) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	1 ul
MQ	30,5 ul
összesen	45 ul

A PCR elegyhez 5 ul AFLP templátot adtunk hozzá, és a következő programot állítottuk be a PCR készüléken:

Ciklus száma (cycle number)	Denaturáció (denature)	Indítószekvencia kitapadása (anneal)	Meghosszabbítás (extend)
1-25	94 °C, 30 s	56 °C, 1 min	72 °C, 1 min

Miután kivettük a PCR gépből a mintákat 5 ul-t megfuttattunk agaróz gélen. Mivel 5-500 bázispár között szmírt láttunk a kísérletet sikeresnek könyveltük el. A mintákat 600-szorosra hígítottuk T₁₀E_{0.1} puffert segítségével.

4.6 A cDNS AFLP második PCR reakciója (szelektív PCR reakció):

A szelektív PCR elkészítéséhez EcoRI +3 és MseI +3 adaptereket használtunk. Az MseI. A TruI. izoskizomerje.

A PCR elegy a következőket tartalmazta 1 mintához szükséges mennyiségek:

EcoRI: +3 10uM (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,05 ul
MseI. +3 10 uM (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,3 ul
Taq (1 U/ul) (Invitrogen Corporation, California, USA)	0,6 ul
10x Buffer (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	2 ul
MgCl ₂	2 ul
dNTP (10 mM) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,4 ul
MQ	9,65 ul
összesen	15 ul

Ehhez adtunk 5 ul hígított templátot, és az alábbi programot állítottuk be a PCR készüléken:

Ciklus száma (cycle number)	Denaturáció (denature)	Kapcsolódási lépés (anneal)	Meghosszabbítás (extend)
1-13	94 °C, 10 s	65 °C, 30 s (minden ciklus után 0,7 °C-al csökkentve)	72 °C, 1 min
14-36	94 °C, 10 s	56 °C, 30 s	72 °C, 1 min
37			72 °C, 1 min

A szelektív amplifikációval az adaptereket 3 különböző kombinációban adtuk hozzá a PCR elegyhez. Ezek a következők voltak:

Első kombináció: EcoRI: + ACC és MseI. + CTT

Második kombináció: EcoRI: + ACC és MseI. + CAG

Harmadik kombináció: EcoRI. + ACC és MseI. + 0

4.7 Gélelektroforézis

A PCR terméket agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk (1 %-os agaróz gélen, 0,5 g agar-agar, 50 ml TBE puffer Etidium-bromid festés)

Ezt követően a mintákat megfuttattuk 8 %-os akrilamid gélen is. 100 ml, 8 %-os gél a következőképpen készült: 20 ml 40 %-os akrilamidhoz hozzáadtunk 45 g Ureát (10x), majd 10 ml 10X TBE-t. Ezt 100 ml-re kiegészítettük desztillált vízzel. Az összetevőket mágneses keverővel kevertük össze. Miután az Urea teljesen feloldódott 0,1 g ammónium-peroxi-diszulfátot (APS) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada) 1000 ul desztillált vízben feloldottunk egy eppendorf csőben. Ebből 500 ul-t tettünk bele az akrilamid oldatba. Pontosan a 2 üveglap közé juttatás előtt az oldathoz hozzáadtunk 100 ul tetrametil-etiléndiamint (TEMED) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) hogy a polimerizáció meginduljon. A polimerizáció 30 perc alatt ment végbe, ezután a gél 38 °C-ra előmelegítettük. Ezt követően vittük fel a mintákat, majd 55 °C-on, 80 W-on 5 órán át futtattuk. Egy zsebbe 6 ul, 2 ul-nyi FDE festékkel megfestett (összesen 8 ul) 92 °C-on 5 percig denaturált mintát pipettáztunk.

Az akrilamid gél 2 üveg között futtattuk, így a két üveget is elő kellett készíteni. A nagyobb üveget Repel Silane-nal (Promega BioSciences, USA) áttöröltük, ez nem engedte, hogy a gél az üveghez tapadjon. Mivel azt szeretnénk volna, hogy a gél a másik üveghez tapadjon, azt Bind Silane-nal kezeltük (Promega BioSciences, USA). Először 97 %-os alkohollal lemostuk az üveget, majd ezután tettük rá a Bind Silane-t. Ez tartalmazott 5 ul Bind Silane-t, 5 ul 96 %-os ecetsavat, 5 ml 95 %-os etilalkoholt. Miután felvittük az üvegre lemostuk 95 %-os etanollal, ezután 5 percig száradni hagytuk. A készüléket csak ezután raktuk össze. Mindezt elszívó alatt végeztük.

A futtatás után a gélt fixáltuk. A fixáló oldat 300 ml ecetsavból, és 2700 ml desztillált vízből állt. Ebben 30 percig, 100 rpm rázás mellett áztattuk. Miután kivettük a gélt az oldatból kétszer átmostuk desztillált vízzel. A festés ezüst-nitráttal történt. 4,5 g ezüst-nitrátot elkevertünk 3000 ml desztillált vízzel, majd 4,5 ml formaldehidet adtunk hozzá. A gél ebben is 30 percig volt, rázogató (100 rpm) mellett. Ezt követően a gélt átmostuk kétszer 4 °C-os desztillált vízzel. A minták előhívásához a következő oldatot készítettük el: 90 g nátrium-karbonátot, 500 µl nátrium-thioszulfátot, és 3 ml formaldehidet vegyítettünk, majd az oldatot 3000 ml-re hígítottuk desztillált vízzel. Amikor kezdtek a minták jól láthatóvá válni a folyamatot a fixáló oldat újra felhasználásával leállítottuk. Miután a pezsgés megszűnt, a gélt kivettük, desztillált vízzel átmostuk, majd megszáritottuk. A száradás után a gélt lefénképeztük, majd különbségeket kerestünk az ellenálló és a fogékony kajszifajták között, ezeket a különbségeket a gélből kivágtuk, és a mintákat 100 µl $T_{10}E_{0.1}$ pufferben oldottuk fel. A mintákat a pufferben 1 órán keresztül áztattuk, majd a felülúszót tovább vittük egy tiszta eppendorfbacsóba.

4.8 Reamplifikáció

A reamplifikációhoz a következő elegyet készítettük el egy-egy mintához:

dNTP (10 mM) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,4 ul
10x Buffer (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	2 ul
DreamTaq 5U/ul (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,3 ul
MseI (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,3 ul
EcoRI. (Fermentas International Inc., Ontario, Canada)	0,01 ul
MgCl ₂	2 ul
MQ	9,99 ul
Összesen	15 ul

Ehhez az elegyhez adtunk 5 ul DNS-t, majd a következő programot állítottuk be a PCR készüléken:

Ciklus száma (cycle number)	Denaturáció (denature)	Kapcsolódási lépés (anneal)	Meghosszabbítás (extend)
1-13	94 °C, 30 s	65 °C, 30 s (minden ciklus után 0,7 °C-al csökkentve)	72 °C, 1 min
14-36	94 °C, 30 s	56 °C, 30 s	72 °C, 1 min

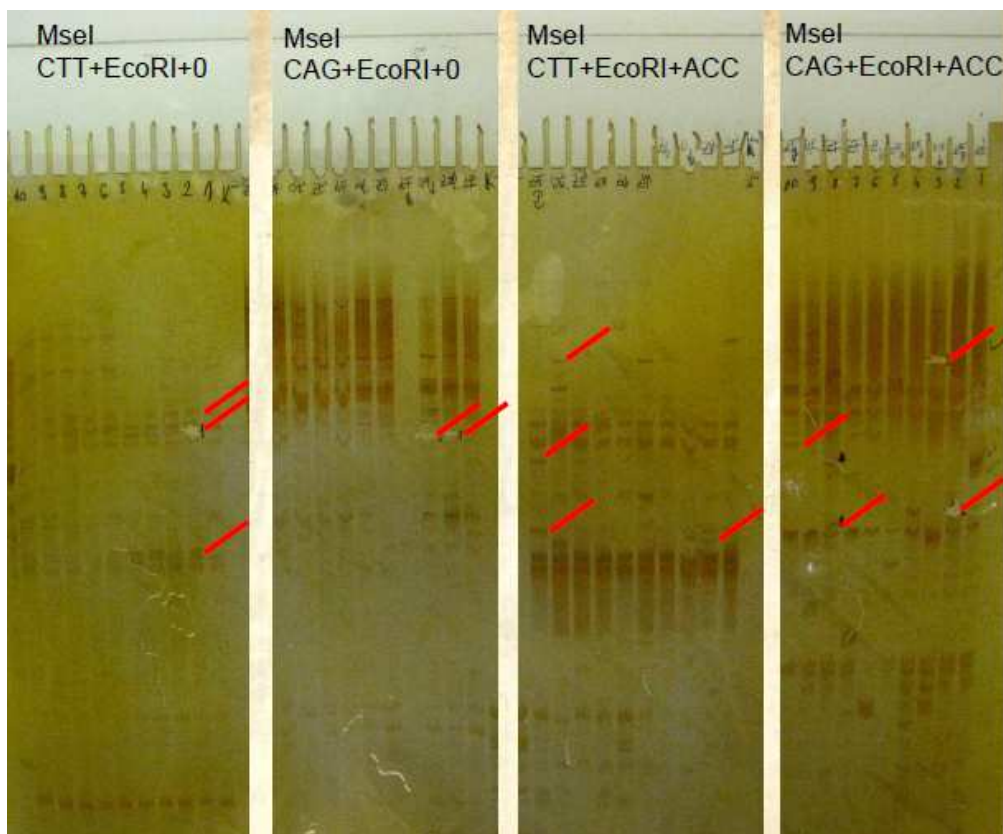
A reakció végeztével a mintákat agaróz gélen megfuttatuk, és azoknál a mintákat, ahol egy csíkot kaptunk szekvenálásra előkészítettük.

4.9 Bioinformatikai vizsgálatok

A NCBI BLAST programját (Altschul és mts., 1990) használtuk a kapott nukleotid szekvenciák homológia vizsgálatához. Az őszibarack genommal történő összehasonlítást a Genome Database of *Rosaceae* adatbázis alkalmazásával végeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A kiválasztott kajszifajták ép és fertőzött hajtásainak hánccsszövetéből sikeresen izoláltunk ép RNS-t forró bórsavas extrakcióval, amit a következő kép mutatja be:



1. kép: A 4 primerkombináció alapján készült AFLP 6 %-os denaturáló akrilamid gélen megfuttatva, ezüst-nitráttal megfestve. A piros vonalak a gélből visszaizolált fragmenteket jelzik 1-13-ig az 1. gélen.

A cDNS AFLP első bízató eredményét a nem szelektív PCR reakció agarózgélén történő elválasztásával tapasztalhattuk meg, mert a várt 100-500 bp közötti elmosódott DNS mintázottságot kaptunk. A protokollt követve 4 primerkombinációt alkalmaztunk a szelektív PCR-hez.

Ennek a PCR reakciónak a gélelektroforézisekor már határozottabb, de sok csíkot mutató mintázottságot tapasztaltunk.

A cDNS AFLP minták denaturáló akrilamid gélen történő elválasztásakor ezüst festést követően biztosan elkülöníthető mintázottságot figyeltünk meg, ami a cDNS AFLP technika sikeres alkalmazására utal.

A négy primerkombináció alkalmazásával összesen 30 eltérő mintázatot mutató fragmenst izoláltunk, amiből 18 PCR-rel történő felsokszorozítása sikerült. A PCR termékeket direkt szekvenáltattuk és a kapott szekvenciák homológia alapján történő feltételezhető funkciójuk meghatározását nemzetközi adatbázisokkal történő illesztések alapján végeztük el. A szekvenciák őszibarack genommal történő illesztése lehetőséget adott a teljes gének szekvenciájának illesztésére is. Az így kapott szekvenciaadatokat a 3. táblázatban foglaltam össze. Megállapítható, hogy a diektszekvenálás során gyakran 200 bp körüli pontatlan szekvenciák miatt az illesztés nem járt sikerrel (6. és 14. minta). Ezentúl egy esetben a *Pseudomonas flavescentis* szaprofág baktérium génjét sikerült kimutatnunk egy „Orange red” fertőzött mintából, ami a technika kifinomultságára utal. Négy minta esetében (3., 4., 16., 18.) nem találtunk lehetséges génfunkciót homológia alapján.

A 12. és 13. minták mindkét fajtából a fertőzés hatására jelentek meg és az ubikvitin fehérjelebontási útvonal aktív fehérjei.

A 15. szekvencia egy nekrotróf kórokozó gombák poligalakturonáz enzimét megkötő és gátló génhomológja.

Az őszibarackgenommal történő illesztés során kiderült, hogy két kópiában található meg a 7-es kromoszómán, egymástól néhány kilobázis távolságban.

EST adatbázisokkal történő illesztés esetén a mandula terméséből készült génkönyvtárban találtunk rá.

A Venturiás varasodással szemben ellenálló körtefajtákban a fertőzés hatására kezdődött el a PGIP gén expressziója (Faize M. et. al., 2004). Ezzel szemben a fogékony fajtákban a gén nem expresszált a kezdeti Ventúriás fertőzésre.

A monília rezisztens *„Zard”* fajta esetében a kezdeti fertőzés során szedett mindkét mintában a PGIP homológ gént meghatározó fragmens megjelent. Ez alapján feltételezhetjük, hogy ez a gén szerepet játszhat az ellenálló fenotípus kialakításáért.

Természetesen ez az eredmény további megerősítésre szorul, amit a génre tervezett primerek alkalmazásával a cDNS mintákon kívánok a továbbiakban ellenőrizni.

A teljes gén megszekvenálása genomi DNS-ekből egyaránt szükséges, illetve a génben található két intron kapcsoltságát kívánom ellenőrizni a *„Zard”* és *„Korai zamatos”* keresztezéséből származó hibridpopuláción.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során egy transzkriptomikai analízissel sikerült a moníliaellenállóság lehetséges genetikai determinánsának felderítése. A nekrotróf kórokozók ellen több esetben ellenállóságot biztosító PGIP transzkriptumát sikerült kimutatnunk az ellenálló moníliával fertőzött mintáinkból, míg a fogékony mintákban ez a fragmens nem jelent meg.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. -Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
2. -Argout X. és mts. (2011) The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics* 43:101–108
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-328
3. -Boulnois, K. (1972) A Selyemút. Kossuth Kiadó. Budapest.
4. -Dangl, J. L., Jones J. D. G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infections. *Nature* 411: 826-833.
5. -De Lorenzo G., Ferrari S. (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 5:295-299.
6. -Dievart A., Clark S. E. (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251-261.
7. -Drén, G., Szabó, Z., Soltész, M., Holb I. J. (2007): Brown rot blossom blight and fruit rot of apricot in Hungary. *Int. J. Hort. Sci.*, 13 (3), 139–141.
8. -Faize M., Sugiyama T., Faize M., Ishii H., (2004) Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from Japanese pear: possible involvement in resistance against scab. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63:319-327
9. -Fazekas I., Harsányi J. (1986) Evaluation of apricot varieties on the basis of organoleptic quality judging of canned fruits. *Acta Hort.* 192:497-506.
10. -Federici L., Matteo A. D., Fernandez-Recio J., Tsernoglou D. and Cervone F. (2006) Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *TRENDS in Plant Science*
11. -Fielding A. H. (1980) Natural Inhibitors of Fungal Polygalacturonases in Infected Fruit Tissues. *Journal of General Microbiology* 123: 377-381
12. -Glits M., Folk Gy. (2000) Kertészeti növénykórtan. 3. átdolgozott és bővített kiadás. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 582 p.
13. -Guido, A., Thomas, A. (2006) Differenzierung der beiden Erscheinungsformen der Spitzendüre (*Monilinia laxa*) an Sauerkirschen ermöglicht eine Reduktion des Fungizideinsatzes zur Blüte. *Gesunde Pflanzen, Pflanzenschutz- Verbraucherschutz- Umweltschutz*, Springer- Verlag
14. -Gutermuth, Á., Pedryc, A. (2009): The possible source of resistance against blossom blight (*Monilia laxa* Ehr.) in apricot. *Hungarian Agricultural Research* 3-4, 17-20.

15. -Harsányi J. (1986) Performance of apricot varieties and selections in a plot trial. *Acta Hort.* 192:345-352.
16. -Harsányi J. (1988) Kajszi fajták vizsgálata sík, fagyveszélyes termőhelyeken. *Kertgazdaság* 20(5): 37-43
- Hornok L. 2004. Kölcsönhatás növények és kórokozó gombák között. *Magyar Tudomány* 2004/10
17. -Kerek M. M. (1988) Külföldi kajszi barackfajták viselkedése a GYDKFV Ceglédi Állomásán. *Kertgazdaság* 20(5): 44-47.
18. -Kobe B., Kajava A. V. (2001) The leucin-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 725-735.
19. -Nyújtó F. (1988) A kajszi fagyérzékenységeinek mérséklése nemesítő munkával. *Gyümölcs-Inform* 10(1): 20-
20. -Nyújtó F., Surányi D. (1981) Kajszi barack. *Mezőgazdasági Kiadó*. Budapest. 465 p.
21. -Pedryc A. (2003) A kajszi nemesítése. In: Péntes B. és Szalay L. (szerk.). *Kajszi*. Bp. Mezőgazda Kiadó p. 53-84.
22. -Pedryc A. (2003): A kajszi nemesítése. (Apricot breeding) pp. 53–84. In: Péntes B., Szalai L. *Kajszi*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
23. –Róth Fruzsina (2008): CC-NBS-LRR típusú rezisztenciagén-analógok izolálása kajszi ből, Budapest
24. -Soó R. (1966) A magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve. *Akadémiai Kiadó*. Budapest
25. -Surányi D., (2003) A kajszi jelentősége, termesztésének története és helyzete. In: Péntes B. és Szalay L. (szerk.). *Kajszi*. Bp. Mezőgazda Kiadó p. 11-29.
26. -Szalay L. (2003) A kajszi ökológiai igényei. In: Péntes B. és Szalay L. (szerk.). *Kajszi*. Bp. Mezőgazda Kiadó p. 41-52.
27. -Xiao, S. 2006. Current Perspectives on Molecular Mechanisms of Plant Disease Resistance.. A. Jaime and T. da Silva (szerk.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Global Science Books, UK p. 317-333.
28. -Yang S., Zhang X., Jue J. W., Tian D., Chen J. Q. 2008. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species. *Mol Genet Genomics* 208:187-198.

29. -Vuylsteke M., Peleman J. D., Eijk M. JT. (2007) AFLP-based transcript profiling (cDNA – AFLP) for genome-wide expression analysis. Nature Publishing Group
30. -Wan C. Y. és Wilkins T. A. (1994) A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 223: 7-12.

8. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Mellékelem a kapott kajszi szekvenciákat:

>1

CCGTCCGTGTCGCAGTAGATTACACAAGCTGCAGCAGCCTGACCACACTGCAATG
ACAGG
GCCGATGGCGATCTTGGACACCTTCTGAGTTCCTGGGTCATAGATTGCAATTTGG
AACAG
AACAAATGCTGTCAATAAAACAGCGTGAGCTGAGAAAGCAACATCATTTACTGCT
ACAGG
GATCATCTGTCCATAGCCGTATTTCTCCCAGTACTGCTTTTGAACGGCGGAGCTGA
AGTA
GAGAGAGGCGTTGTATATGAGATAGGAAGACTGCTTTGTCAAACCTCAGCAACAC
GAAATC
GAAGCTCAATCCCACAACGCTTTTCTTGCGGAAATTCAATATGACTTGTGGGTAG
CCACC
GACGGACCAACATGCGAAACCCATCCATCCCCAAACTCTGTATGTGATTTCCAGC
TGAGG
TGAATTGTCGGGGAGGGCTTCGGGGGATAAAAC

>2

AGTAACGGAAACGGTGAAAAGGGGACTGCTTAGAGGGCGGGGTTGCATGGCCGT
AAGCAT
GACTTGCCAAGCGCGAAGCCGCGATGAGAGGACGGCTGTGCCAGCCGAGGGGGA
GGCACC
CGTCGTTCTCTTCCACCCGGTATCCTTCAGCCGAGAAAAGTGTCAGAAGCATACT
CGCCT
GCTTGAAAGCATTGGAACCCAAATGCAGAGGCCTAAACCCGGCTTGTCGCAGCC
GAGCCC
TCCACTTCCCCAACGGCTCGTGTCTCTCCACTCGAGCCGCGCCCTCACAGCACACC
ACGT
TGCATATCTCCCTCTGTATGTACATCTCCGCCAAGGCCTTCTCCGGCTGCATCGCG
CAAG
CCTCCAGCGAGTCGAACATGGTCGAGTAGTAGTACAAAGCCTCCGTGAATCGGTC
CAAGA
ACCCGGTTTTGTTGTGGTCCGCTTCCTGCTCCACAACCGTCACGATCTTCGGGTTC
AGGT
TCCGGATCCAGCCCAGCATCATCTCAATTGGGGAATTGTCAGGACTCGTCAACGG
TCA

>3

GAAGACTATGTCCACCGACAAGAACGTAGGAATTAGTGCGTGCTGCAAAAATGG
ACTTTG
ACGTTCTATTCTAAGTGAAGGGGAGGAGAAGGAATCGTGTCATCTATCTCGAGTTG
CTCCC
TTAAGCGATCTATCCCCTTGTGACGTCGAGTTTGCTCTATTCTCTTAGCTCGGGCT
CCTA

TCAAGCTTCACTTCGCGCATGATAGCGGCATTATTGGGGAAGGAAGTCGCTCGCT
 AGTGC
 ACCTTACCCAAGGTGCACGTCGCTAGGTCAATTCATGCTTCGACGCACTCCCGCC
 TCGTG
 TTTTCGACAAAGTGTTGTGCCATACTTCGAGAATGACACGGTTCGGAGGTCATTT
 ATTTG
 GGTGAAAGCTCCTTCTTCCAATCCCGTAGAGAGGCCTGGAAGAATTGATTGAGAA
 TAACA
 AGACGATTGACCCATTTTTTCATCTTAAATAAAGACATCATGCCCTAGACGCGAA
 GGTGA
 GTAAGAGACCCAGGTGAATGGGGAGGGCCTGGGGGGA

>4

CAACGGAACGAGGAAGGGAGGATATGAGGGTGGTTAATAGGGTATTTGCGGATC
 GATATA
 GGGGGGGGGTGCCGATGACATAGTGGCGACAGAGGTAATAAAAGTTGGAGGGG
 AGGGGTC
 GGACACCCCTAAATCTGGAAAGGGTCTGGGGCAGATCTTTGGAGCTGAATAATTT
 GAACC
 CCACTTGGCACTGAGGCTTGGATTATCTGATGTGGCTTGAGCGTGTTGATATAGT
 AACTA
 AGTGATGGCCCAGAGTATTCTACCTTCTGCACCGCAGGTGGGTTCTTACCTACTTG
 GAGG
 AGTATTGATGAAGCTGCAGCAACGGAGATGAGTGCAAGCCCAGCAGCGATTGCT
 GCTGTG
 TTCTCTGCTCCATTGGATGAAGACCCTGCACTTCCTGAACTTATTACACTTTCTGC
 TACA
 TAAACTGCAGGCTCAACAGAATATATGTTTGTCTGGCCAGCGGTGTCCTTCTCAA
 CATAT
 CCAGTCCAACCACGTTTGCGAGGTGGAAATGTCCCAGAACTTTTGTCTTCTCAC
 CAGCC
 AACCATTCCACGCTGACCTTTCCAACCTCTTTGTCAGGAGCGCATTCTTCTCGTAC
 TAGG
 TTGAATTACTATTGCGCACTGTCATCAGTAGGGTAAACTAACCTGTCTCACGA
 CGGTC
 TAAACCCAGCTCACGTTCCCTATTGGTGGGTGAGCAATCCAACACTTGGGGGGAT
 GGGGC
 GGGCCTCATCAA

>5

GCGTAGCCTCAATGAGGGCTGTAACATCGGGTGAATCAGCGAGGGGAAGGCATA
 ATCGCA
 CCGCCGTCGACTCGCGGCCCATTCGCGCGGGGGGATGGCGGCGGTCATCCAT
 AACCC
 GGCAGCGGTGGTCAGGCCTTTGACGTGCTGGCCCTCTTCGTCTTCTTGCCCTTGA
 GGAT
 CGTCCCTGCGCCTAGGAAACCGAGCCCCGCGATCACCCCCTGGACCACACGACTC
 ATGGC
 ATCCGCCTGATTGCCGGACATCTGCGGTACCAGCACAAACAATGCGGGCGCCCAT
 GCCAC

GAGCATATGGTTGCGCACACCGGCAGCCTTGCCCTTGTGCTCGCGCTCAAACCCG
AGGAT
GCCGCCCAACAGCGCTGCAATCAACAGGCGAACAGTGATTTGAGTGACCTGTTTC
CCGTC
ACCAACGTCGGGGGGGGTGTGTGGGGTCATCAGAGTGGGGGGATCA

>6

AATGCATTGGMAGGAGAAGATCCCTAAAGGGATAKAAARYYCAAAASMCCYRG
AWRGYCA
TTTTCTTCYTTTCTTTTCTTCKCGTATCAARTCGAATAGAAGAGATTGAGAACACA
GCAA
AGAAAATAWTGAAMGAAAWAGTGAAAGAGAWWGAGGAAAAACTAGCGACTG
AAGAGCTTC
TCTTTTGTTCGTTCGAGCGGGGAATTGWGAGGATWYCATCRGTMA

>7

GTGAACATTCTACAATAACAATGGGCGGGGGAGCGGACGAGGGAGTACGGTCGT
TCTCTT
AGTCTCGTGCGGTATGTAGTTTACCTTTTCTTTCTTCTCACGATAGTGTAAGGGAG
GGAT
CACTTTGAGAAATTAAATGGCTCTCAAGATGTGCGTATGATTGTTGTGAGGCACA
TAAGG
GACTCCTGAGACTGTAGTTAGGAAGTTACTGTTTTGACTCTGTATATTCAGCAATT
GACT
GGACCCTGCGGAAGGAGATGAGACAGGGGCAGTAGGATGATGATATGATCAATG
CAACAA
GAAAGTCTCTTTCTTGCAATGGTAAACAGAAAACAACCTGGGACGGCATCACTGAC
GCTTC
CTTTGGTAGAGCGAATAACCAACAAGTGCGGACATCAAAAATGTCCATAGTACC
GTATTG
ATTGTATGCCACCGCTCAAGTCTTCTAATCCTTGACTGCATGTCTTCGATAACCCC
TTCA
ACCGGAGAACTTCTCTAATTGGTGACGATTCAAAAGCTGAACTGCTACCCTGAG
ATTGA
ATAAATTCTACAAGTTCCTGCAACCTTGACGCTTGCTGAGGGTGAATTGTGGGGG
AAGTC
CTCAA

>8

GACGGCATATTCACCACCCTCTGATTAGGGATTTTGCGCGTATTCGATCCTACAG
AACT
TCCAAGGAGACATGGGAGTGCATCAAGATGATGTACCGAGGTGCCAAACGCGTC
AAGGAT
GCCCGTGTTCAAACCCTCATAGAAGAGCTAGACGCCTTGCGGATGAAAAGCACG
GAGTCG
GTCGACGACTTCGTAATGAAGGTGAATTGTGGGGTGCTCATCAA

>9

CCAATCATAAACGCATTAGTCATGAAGCCATGACAACAATCATAGCAATGCCGA
GCAAAA

GCCCTAGGGTCTTCATGGTCGCAGATATGCCATGATACCAGCACCGATTATAGTT
GTGTA
GAGATTGAAAACAGCTCCACTAAACCAAGCTCCGGTGAATTGTCAGACTCATCAA
AGGGG
CTACG

>10
CATTCCCATTGGTTCTACATGCAGCTAGCAAAACACTCAACTTCATTTGGCTTCGT
TGGC
ATGTTTTTCGATTACTTTCAAGGCACTTCCAACATCCCTGCACGGCTATACATATCG
GCTA
TGCACTCCGGATGCTGGACTCTCAAGGTTATTCGGTGAATTGGCGTGACTCATCA
AAG

>11
CCATCAATAACGCATTAGTCATGAAGCCATGACAACAATCATAGCAATGCCGAGC
AAAAG
CCCTAGGGTCTTCATGGTCGCAGATATGCCATGATACCAGCACCGATTATAGTTG
TGTAG
AGATTGAAAACAGCTCCACTAAACCAAGCTCCGGTGAATTGTGAGGACTCATCAA
CGG

>12
CAACAAAAAACGATTATGTACAATTTTGGGGGAAAAGAAAGGGCACAAGATTT
GGCAAA
AAAATGCTATGTAACATCCATTGTGAGGTTGGTGTTCATGGTGGTGAATTGGCATA
AGGTC
ATCAA

>13
CAACAAAAAAGATTATGTACAATTTTGGGGGAAAAGAAAGGGCACAAGATTTG
GCAAAA
AAATGCTATGTAACATCCATTGTGAGGTTGGTGTCTTGGGGGTGAATTGGGTGAA
GGCCT
CAAA

>14
TGTTGCCAAGTGAATGCAGAACGGAAGAAGAGAATGTCCAGCACCTGATTCCAA
GTACAT
GTAACCCACTGTTGTTAGCTAGACATTGAAATGGTTCAGAGGTGAATTGACTAAG
ACTCA
TCAA

>15
AAATCTATCTTGCAGCTTGGGAGTGGAGCACCGCACAGCAGCGGTTATGGAAATA
CGTCG
AGGAGTCAAAGCTCTGCAACTTCCCACCCACTGGAATCTGACCACACAACCTGTT
GTAGC
TCACGTTCAAGTACTGCAAATCATTTTGGGTAGCCCCACCGGAATACTGCCTGT
GATCT

TGTTATGGTTGAGATCCAAGGAAGTCAAGCTCTTCGAAAACCTTCACCTTTGACAG
ATCAA
ATTCCAGCAAGTTCCTCGACAGATCCACAATCTGGGTTGTCTTGTTCATCGGAA
GAGCA
TGTATGCATCACCTTCGAGCTTGTTCGGGAGAAGTCTATGGTGCTGAAGTTCAG
TTTGG
CTAATGAGGTTGGTATGGTGCCTGAGAGCTGGTTGTGAGAGAGATAGAGATCTGG
AACAC
TGCCATGGAATTGTCAGGACTCATCAACATCA

>16

GCATATATAGGTGATAACTTCGGGCTGCGCCAGAGCTTTTCCTCCCAGCACGGGC
AGTCC
CAAGGCCCACGCCCCTAGAGTTTCCCGCTTTGGGCAAGGTTTCCTTCGGGGTTTG
GCGGG
CAGCCACTGCCCACCCCGACTCCTTATTTTTCTCCACTCCCGACTATTTCCATCTT
TTC
TGAAAACACTACGCCTTTTGCTTCCACTCCTAAAACGTCTTCTTTCATGGCCCATTAT
AACA
GGGGGGGGGCAGGGGCTTCATTGGAAAAGGGGAGCAGTAGGCATAGCGC

>17

CTCCGCTGACAAGCTACGACACACAACTGCAGCGCCTGACCACACTGCAATGAC
AATTC
CGATGGCAATCTTGGACACCTTCTGAGTTCCTCGTTCATAGATTGCAATTTGGAAC
AGAA
CAAATGCTGTCAATAAAACAGCGTGAGCTGAGAAAGCAACATCATTTACTGCTAC
AGGGA
TCATCTGTCCATAGCCGTATTTCTCCAGTACTGCTTTTGAACGGCGGAGCTGAAG
TAGA
GAGAGGCGTTGTATATGAGATAGGAAGACTGCTTTGTCAAACCTCAGCAACACGA
AATCGA
AGCTCAATCCCACAACGCTTTTCTTGCGAAAATTCAATATGACTTGTGGGTAGCC
ACCGA
CGGACCAACATGCGAAACCCATCCATCCCAAACTCTGTATGTGATTTCCAGCTG
AATTG
AATTGTCAGGGACTCATCAACA

>18

AAACCTCCCACGTCGCAGGAGATCTGCAGAAGGGGAGAGGCTGTGTCATCGTTG
ATGTCA
AGTTGGCGCCCTGAGACATTTCTCCTGGGGGCGACTTCGTCCCTCAGTCCATGGA
GACCT
CGCCTCTGGTGCTCGACGACTGGCTCTGCCTCGGCCTCGTGCTTCACCACGACCTC
CGGA
GCAGTAGGTGCTTGATAGGGTCGATGTTCAATTCAGAGTCTCTTTTTGTTTGCCTC
TCGC
TGAAGGCGGCCTTGGTCTTCTGGATTCTGCAAGTATTGTCTTGTTAGGTCTCAGT
GAGT
GAACGGGCTCATCGGGGGGTGCGGG

2. melléklet: Összehasonlító táblázata az eltérő expressziót mutató fragmenseknek (3. táblázat)

A transzkriptomból származó fragmens (TDF) eredete	a visszaizolált TDF hossza (bp)	TDF mintázottsága	Legnagyobb homológiát mutató annotált gén v. gén család	A homologia alapján valószínűsíthető gének leírása	Az őszibarack genomjával történő illesztés alapján a TDF lokusza, e-értéke, pozíciója és és kromoszómája
1. Zard fertőzött I.	453	az összes fertőzött zard mintában megjelent	PQ-loop ismétlődő fehérjecsalád		ppa017921m E-value: 2e-63 scaffold_3: 21079579-21081198 Ppa021350, E-value: 2e-63 scaffold_3:21,076,300..21,089,160
2. Zard fertőzött I.	538	mindkét korai Zard mintában megjelent	Della protein	Gibberellinek növényi hormonok, amik a növekedést szabályozzák. DELLA proteinek transzkripciósz regulátorok, amelyek alulszabályozottak amikor giberellinek kötődnek a receptorukhoz. GID1 komplexet képez a Della proteinekkal és a 26S proteasomára irányítódnak. Az N	ppa003975 E-value: 1.00e-254 scaffold_7: 20910516 - 20912871

				terminálison a konzervált DELLA és VHYNP motívumokat hordoznak, amik meghatározóak a GID1 megkötéséhez és a proteolizoséhoz a DELLA proteineknek.	
3. Zard fertőzött I.	517	Csak ebben a mintában jelent meg	ismeretlen fehérje		E-value:9.4e-18 Scaffold_2:22,790,098..22,790,193
4. Orange Red fertőzött I.	733	Csak ebben a mintában jelent meg	ismeretlen fehérje	proline-gazdag gén család	Ppa011164 E-value:1.5e-124scaffold_2:3,192,907..3,195,390
5. Orange Red fertőzött I.	466	Csak ebben a mintában jelent meg	külső szennyeződés Pseudomonas fluorescens gén		
6. Zard fertőzött I.	228		rövid szekvencia homologia nélkül		ismeretlen régió
7. Zard fertőzött II.	605	Mindkét késői Zard fertőzésnél	Foszforibulokináz	P-loop protein, ami a nukleozidtrifoszfát hidrolíziséért felelős fehérje család	ppa000994m.g e-value:2.6e-133 scaffold_1:22,024,771..22,025,550
8. Orange Red Fertőzött I.	224	Csak ebben a mintában jelent meg	Transzmembrán aminosav transzporter fehérje		ppa005008m e-value: 6.6e-9 scaffold_6:11,623,135..11,623,296 e-value:3.8e-61623378
10. Zard fertőzött I.	185		ismeretlen fehérje		
11. Zard fertőzött II.	178		rövid szekvencia homologia nélkül		ismeretlen régió
12. Zard fertőzött I.	125	mindegyik korai fertőzésnél megjelent	Cink ujj fehérje C3HC4 típus	RING finger fehérjék a kulcsenzimek a ubiquitin anyagszereútnak	ppa024723m

13. Orange red fertőzött I.	124	mindegyik korai fertőzésnél megjelent	Cink ujj fehérje C3HC4 típus	RING finger fehérjék a kulcsenzimek a ubiquitin anyagcsereútnak	ppa024723m
14. Orange Red fertőzött I.	124	mindkét Orange red termékben megjelent	rövid szekvencia homológia nélkül		ismeretlen régió
15. Zard fertőzött I.	452	A korai fertőzőskor mindkét Zard mintában megjelent	Poligalakturonáz gátló fehérje	A PGIP fehérjék a növénykórokozó gombák poligalakturonáz enzimét képesek gátolni a pektin lebontás megakadályozása végett.	ppa008474m e-value: 5.5e-153 scaffold_7:10,624,791..10,625,217 ppa008479m e-value:0, scaffold_7:10,645,144..10,645,571
16. Orange Red fertőzött I.	289	Csak ebben a mintában jelent meg	ismeretlen fehérje		ppa007057me value: 1e-24
17. Zard fertőzött II.	442		PQ-loop repeat family protein		Ppa021350, E-value: 2e-63 scaffold_3:21,076,300..21,089,160
18. Zard fertőzött I.	325	mindkét korai Zard mintában megjelent	ismeretlen fehérje		

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek:

Köszönöm **Gutermuth Ádámnak** nélkülözhetetlen segítségét, türelmét és biztatását.

Köszönöm **Dr. Pedryc Andrzejnek**, a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszék vezetőjének támogatását.

Köszönöm szaktársamnak és kolléganőmnek **Falcsik Anett Saroltának** az Anyag és módszer fejezet megírásában nyújtott segítségét és együttműködést.

Ezenkívül szeretnék köszönetet mondani a Budapesti Corvinus Egyetem **Genetika és Növénynemesítés Tanszék** minden munkatársának kedvességükért és segítőkészségükért.

Külön köszönet illeti **Zaheri-A Sabouran** laboránst, **Pfeiffer Péter**, **Lendvay Bertalan** és **Szikriszt Bernadett** PhD hallgatókat.