

Debreceni Egyetem
Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
Növényvédelmi Intézet

Intézetvezető:
Dr. Kövics György

**MAGYARORSZÁGI *BOTRYTIS CINEREA* GOMBA SZABADFÖLDI
IZOLÁTUMAINAK AZOXYSTROBIN REZISZTENCIA VIZSGÁLATA**

Készítette:
Dr. Bérczesné Szojka Anikó, II. Biomérnök MSc-s hallgató

Konzulensek:
Dr. Karaffa Erzsébet
egyetemi docens
és
Mojtaba Asadollahi
PhD hallgató

Debrecen 2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
BEVEZETÉS.....	3
1. TÉMAFELVETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A <i>Botrytis cinerea</i> taxonómiája.....	6
2.2. Patogenitás.....	7
2.3. Heteroplazmia.....	8
2.4. A QoI fungicidek felfedezése és hatásmechanizmusa.....	8
2.5. A QoI rezisztencia mechanizmusai.....	10
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	13
3.1. Izolátumok és ezek fenntartása, tárolása.....	13
3.2. Azoxystrobin rezisztencia indukálása.....	13
3.3. DNS izolálása, felszaporítása, tisztítása és koncentrációjának meghatározása.....	14
3.4. A CYTB gén pontmutációjának vizsgálata restrikciós analízis segítségével.....	16
3.5. A CYTB gén pontmutációjának detektálása valós idejű (real-time) PCR technika segítségével.....	16
3.6. Real-time PCR adatelemzés.....	18
3.6.1. Mennyiségi elemzés.....	18
3.6.2. Minőségi elemzés.....	20
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE.....	22
4.1. A növekvő azoxystrobin koncentráció hatása a törzsekre.....	23
4.2. A CYTB gén pontmutációjának (G143A) detektálása PCR-RFLP vizsgálat segítségével.....	25
4.3. A CYTB gén pontmutációjának (G143A) vizsgálata valós idejű (real-time) QPCR technika segítségével.....	28
4.3.1. A QPCR reakciókörülményeinek optimalizálása.....	28
4.3.2. Heteroplazmia szintjének meghatározása QPCR segítségével.....	32
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	35
ÖSSZEFOGLALÁS.....	37
IRODALOMJEGYZÉK.....	38
Függelék.....	42

BEVEZETÉS

Már a mezőgazdasági társadalmak kialakulása óta a növényi kórokozó gombáknak fontos gazdasági és szociális hatása volt az emberre (STAKMAN, 1959). Az ókori rómaiak *Robigus* istent félték, aki a gabonaüszög nevű katasztrofális hatású gabonabetegséget testesítette meg, hozzá imádkoztak gabonatermésük megmentéséért. A *Phytophthora infestans* nevű gomba okozta ír burgonyavész másfél millió halálos áldozatot követelt a XIX. században (1849). Eredményeként nagyarányú kivándorlás történt Észak-Amerikába. 1970-ben a kukorica levélfoltosságának kórokozója, a *Cochliobolus heterostophus* pusztított az Egyesült Államokban, tönkretéve a termés körülbelül 15%-át, több mint egy billió dollár veszteséget okozva. Felmérések szerint a fejlett ipari országokban a gombás betegségek miatt bekövetkező átlagos évi termésvesztés 5-10%-ra tehető (JAMES, 1974).

A *Botrytis* nemzetséget Micheli állította fel 1729-ben, a nemzetség közismerten fitopatogén és gazdaságilag igen jelentős kórokozó fonalas gombák csoportját tartalmazza. Ez a megállapítás helytálló a genus tagjaira együttesen, valamint a *Botrytis cinerea* esetében önmagában is. A *Botrytis* nemzetség előfordulása nagyobb részt a mérsékelt övre korlátozódik, és eddig bizonyítottan 235 gazdanövény fajt képes megtámadni, és rajtuk a szürkerothadás nevű megbetegedést kiváltani (JARVIS, 1977). A termesztett növények számos fontos csoportja veszélyeztetett, ide tartoznak a szántóföldi és üvegházi kultúrák, bogyós gyümölcsök, szőlő, dísnövények és facsemeték. Hidegtűrő képességük miatt jelentős károkat okozhatnak raktározás és szállítmányozás során is.

A *Botrytis* nemzetség okozta betegségek megelőzése és kezelése nem egyszerű feladat. A nehézségek gyakran a gomba életciklusából erednek, mivel a spóracsírázás, a fertőzés, a micélium növekedése és a sporuláció gyorsan történik, valamint a gomba különböző populációi eltérő módon tolerálják a különböző kemikáliákat. Előfordulhat, hogy a fertőzés az érési idő előtt vagy közben történik, lehetetlenné téve a vegyszeres védekezést.

A megfelelő gazdálkodási gyakorlat, beleértve a vetésforgó alkalmazását rezisztens kultúrákkal, képes csökkenteni a fertőzések veszélyét, de a fungicidek alkalmazása jelenti a leghatásosabb módját a gombák okozta megbetegedések megelőzésének. Azonban a fungicid-

rezisztencia napjainkban a gyakorlati növényvédelem hatékonyságát veszélyeztető egyik legfontosabb probléma. A gombaölő szerekkel szemben, a hosszú ideig tartó egyoldalú szerhasználat miatt, a növénypatogén gombák rezisztens populációi alakulnak ki. Különösen igaz ez azokra a fajokra, melyek minden évben megjelenve, járványszerűen pusztítanak. Ezek közé tartozik a *Botrytis cinerea* is. Általában a rezisztencia kialakulásának veszélye magasabb az egy-hatóhelyű fungicidek esetében, míg a több hatóhelyet célzó kemikáliákkal szemben ritkábban és lassabban jönnek létre ellenálló törzsek. A quinol oxidáz inhibitorok (QoI) családjába tartozó fungicideknek jelentős szerepe van a *Botrytis* nemzetség által okozott megbetegedések megelőzésében és növényvédelmi kezelésében. A QoI-fungicidek valószínűleg a leghatékonyabb mezőgazdaságban alkalmazott fungicidek. Hatásmechanizmusuk azonban egyoldalú, a sejtlégzést gátolják és ellenük egyetlen aminosav szubsztitúciója a mitokondriális citokróm b (CYTB) génben magasfokú rezisztenciát képes okozni.

1. TÉMAFELVETÉS

A *Botrytis cinerea* (teleomorf: *Botryotinia fuckeliana*) gombafaj a szürkerothadás kórokozója, számos növénykultúra rendszeres és jelentős károsítója. A gomba mind fenotípusában, mind genotípusában nagy változékonyságot mutat. Az ellene való küzdelem hagyományosan kemikáliákkal történik. A QoI-fungicidek hatásosan alkalmazhatók számos, gomba okozta növényi betegséggel, így a szürkerothadással szemben. A védelem megvalósítása azonban nem egyszerű feladat, mivel a gomba rendkívüli genetikai változékonysága miatt nagyon hamar kialakulhatnak a rezisztens törzsek, például egyetlen aminosav szubsztitúciója a gomba mitokondriális CYTB génben magasfokú rezisztenciát képes okozni. A rezisztencia szintje függ a mutáns és „vad” típusú mitokondriumok arányától, tehát a heteroplazmia mértékétől. Ezen túlmenően a kezeléseknek komoly anyagi, környezetterhelési illetve élelmiszerbiztonsági vonatkozásai vannak. Mindezek miatt a korszerű növényvédelmi stratégiák kialakításához egyre inkább szükséges a *B. cinerea* genotípusok és populációs struktúrák vizsgálata.

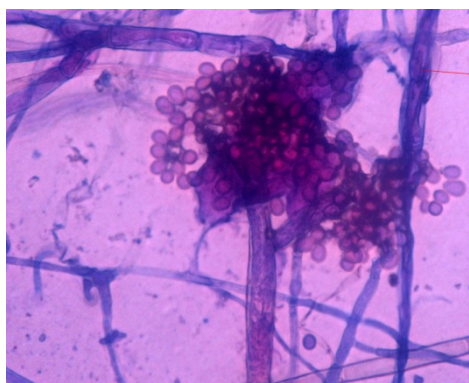
Munkánk során Magyarországon gyűjtött, szabadföldi *Botrytis cinerea* egyspórás izolátumokat vizsgáltunk, melyek szürkerothadásos szamóca- és málnaszemekről, levélről, illetve repceszárról származtak. Célunk volt, hogy kifejlesszünk egy, a heteroplazmia követésére alkalmas módszert valós idejű (real-time) PCR segítségével, valamint kerestük a választ a következő kérdésekre:

- Létezik-e egyértelmű összefüggés a QoI rezisztencia és a CYTB-ben leírt mutáció között a magyarországi *Botrytis cinerea* populációkban?
- A heteroplazmia mértéke hogyan befolyásolja a rezisztencia szintjét?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Botrytis cinerea* taxonómiája

A *Botrytis* P. Mich. ex Pers. („fürtöspenész”) nemzetséget (nevét alakjáról kapta: βοτρυς, bótrys, gör.: szőlőfürt, 1. ábra) P.A. Micheli írta le 1729-ben, és C. H. Persoon validálta 1794-ben („1801”, tévesen idézve COLEY-SMITH et al., 1980). Típusfaja a *Botrytis cinerea*, melyet Persoon 1821-ben írt le és E.M. Fries 1832-ben megerősített (COLEY-SMITH et al., 1980).



1. ábra: *Botrytis cinerea* konídiumtartójának fénymikroszkópos képe (laktófenol- gyapotkék festés (Dr. Karaffa Erzsébet felvétele.)

Teleomorf alakját A. de Bary 1869-ben először *Peziza fuckeliana* néven közölte, majd *Sclerotinia fuckeliana* de Bary ex de Bary (1884)-ként módosította, melyet később H. H. Whetzel legitimálva (1945) a *Botryotinia* genusba tett át *Botryotinia fuckeliana* néven (1. táblázat).

1. táblázat: A *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr. *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz) aszexuális és szexuális klasszifikációja

	Aszexuális klasszifikáció	Szexuális klasszifikáció
Ország	Fungi	Fungi
Divízió	Deuteromycota	Ascomycota
Osztály	Hyphomycetes	Discomycetes
Rend	Moniliales	Helotiales
Család	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Génusz	<i>Botrytis</i>	<i>Botryotinia</i>
Faj	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

A több mint 20 fajt magába foglaló *Botrytis* nemzetség esetében nemzetségről csak általánosságban beszélhetünk, mivel a fajok gazdanövény specializáltságának leírása meglehetősen hiányos és besorolásuk körül is vannak problémák (pl. a *Scelrotinia* nemzetségbe tartozó *S. veratri* inkább a *Botrytinia* nemzetségbe sorolható (KHON, 1979). Legutóbbi, molekuláris markereket is magába foglaló elemzésüket STAATS et al. (2005) végezte el. A gombák rendszerezésénél három fajkonceptió van használatban (i) a megjelenésen alapuló morfológiai fajkonceptió a legszélesebb körben alkalmazott; (ii) a kereszteződésen alapuló biológiai fajkonceptió, mely csak az ivarosán szaporodni képes gombáknál használható; és (iii) a genetikai markerek segítségével meghatározható közös leszármazáson alapuló filogenetikai koncepció. A növényi patogén gombák esetében a gazda specifitás szintén fontos elkülönítési szempont.

2.2. Patogenitás

A növénypatogén gombák populációi számára a fennmaradásukhoz szükséges életkörülményeket a növények felületén és azok szervezetében találják meg (2. ábra). Az életközösségek evolúciója során alakult ki a gombák növényeken vagy növényekben való élősködése. Melynek lényege, hogy a patogén gomba a növény bizonyos részein, illetve szervezetében megtelepszik, felhasználja annak anyagait életműködései biztosításához. A fertőzés során a növény fiziológiai állapota megváltozik, a szervezet károsodik, vagy elpusztul. A növényi epidermisz sejtjei fizikai és kémiai gátat képviselnek a behatoló mikroorganizmusokkal szemben. A behatolás e felületek sérülésein, természetes nyílásain vagy az ép szöveten keresztül következik be (VAJNA-JAKUCS, 2003).



2. ábra: Szürkerothadásos kórképek szőlőn (Váczy Kálmán felvétele)

A *B. cinerea* képes fennmaradni élő és elhalt szövetekben is. A fertőzés elindítói leggyakrabban a beteg, elhalt növényrészekben képződő szkleróciumokból fejlődő konídiumok. Esetenként a gomba ép bőrszöveten keresztül is behatol, de a sebek, sérüléseken keresztüli fertőzés a legjelentősebb. A fertőzés kialakulásához a szőlő esetében legalább 15 óra 18-21°C-os hőmérséklet, magas relatív páratartalom és a csapadékos időjárás teremt kedvező feltételeket (LÁZÁR et al., 2004).

2.3. Heteroplazmia

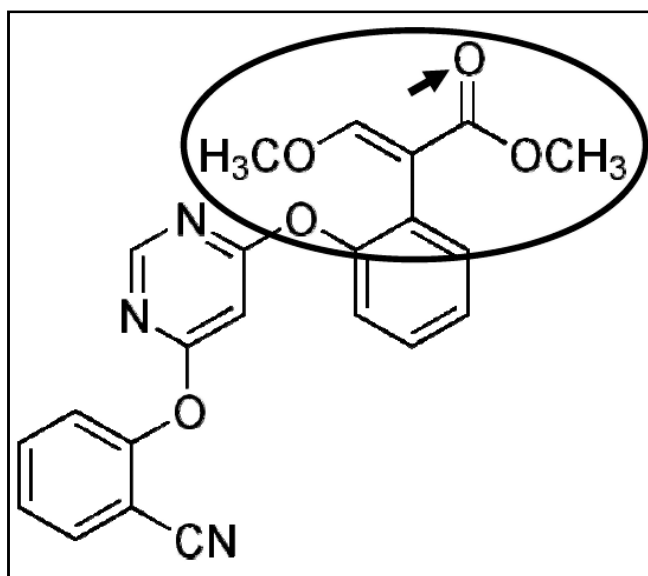
A mitokondriumok az eukarióták energiatermelő sejtszervecskéi. Endoszimbionta eredetűek, vagyis egy korábban önálló baktérium bekebelezésével váltak az eukarióta sejt részévé. Saját, bakteriális jellegű örökítőanyaggal (mtDNS – mitokondriális DNS) rendelkeznek. Egy-egy sejtben általában több mitokondrium van. A mitokondrium, mint endoszimbionta sejtorganelum az első endoszimbiózisok óta eltelt évmilliárdok alatt fokozatosan elvesztette önállóságát, és léte a gazdasejttől vált függővé. Genomjának jelentős hányada a gazdasejt magi DNS-ébe került, vagyis a sejtszervecske életét a saját és a gazda genomja együttesen szabályozzák, tehát egyszerre áll eukarióta és prokarióta jellegű genetikai kontroll alatt. A gazdasejt DNS-ébe épült genetikai mutációk mendeli öröklődésmentet mutatnak, míg a saját DNS-ét a prokarióta jellegből adódóan a magas mutációs ráta jellemzi. Homoplazmiáról beszélünk, ha a sejtben lévő összes mitokondrium genomja azonos. Amennyiben a mitokondriumok egy sejtben belül nem egyformák, fennáll a heteroplazmia jelensége. Az, hogy a mitokondriumban kialakult mutáció okoz-e fenotípusos változást dózis-függő, azaz azon múlik, hogy az adott sejtben mekkora százalékban fordulnak elő a megváltozott mitokondriumok (II).

2.4. A QoI fungicidek felfedezése és hatásmechanizmusa

A QoI fungicidek felfedezését egy csoport természetes fungicid, a β -methoxyacryl savak inspirálták, ilyenek a strobilurin A és oudemansin A, melyeket bazídiumosgombák termelnek (*Strobilurus*, *Mycena*, *Oudemansiella*) (KRAICZY et al., 1996). A strobilurin A volt az első QoI molekula, melyet 1977-ben *Strobilurus tenacellus* folyékony kultúrájából

nyertek ki (ANKE et al., 1977). Ennek a csoportnak a hatásmechanizmusát 1981-ben tisztázták.

A QoI fungicidek gombaölő képessége azon alapszik, hogy gátolják a mitokondriális légzést, kötődve a citokróm bc_1 enzim komplex Qo helyéhez (külső quinon oxidációs hely). Ez a gátlás blokkolja az elektron transzfert a citokróm b és citokróm c_1 között, ami energiahányhoz vezet a gomba sejtekben azáltal, hogy leállítja az ATP képződést. A strukturális hasonlóságok alapján a QoI inhibitorok nyolc kémiai osztályát különböztetik meg (BALBA, 2007). A közös bennük az a hatásmechanizmus, mellyel a citokróm bc_1 enzim komplexhez kötődnek, és egymással általában keresztrezisztenciát mutatnak különböző vizsgálatok során, mint a spóracsírázás, micéliális növekedés és sejtmentes enzim tesztek, valamint a mesterséges mutánsokkal végzett kísérletek, habár a mesterséges mutánsok biológiai aktivitása egészen különbözik a szabadföldi izolátumoktól (HEANEY et al., 2000). Manapság tíz QoI tartalmú aktív összetevő van kereskedelmi forgalomban beleértve az azoxystrobint, mely a leggyakrabban alkalmazott fungicid világszerte (BALBA, 2007). A vegyületek azon részében, mely a hatásért felelős (toxophore) közös, hogy hordoznak egy karbonil oxigént. Feltételezhetően ez felelős a citokróm bc_1 enzim komplexhez való kötődésért (BARTLETT et al., 2002) (3. ábra). A témával kapcsolatos bővebb leírás megtalálható Fernández-Ortuño és munkatársai által készített tanulmányban (2008).



3. ábra: Az azoxystrobin molekula kémiai struktúrája. A bekarikázott rész felelős a hatásért, a nyíllal jelölt karbonil oxigén pedig a citokróm bc_1 enzim komplexhez való kötődésért.

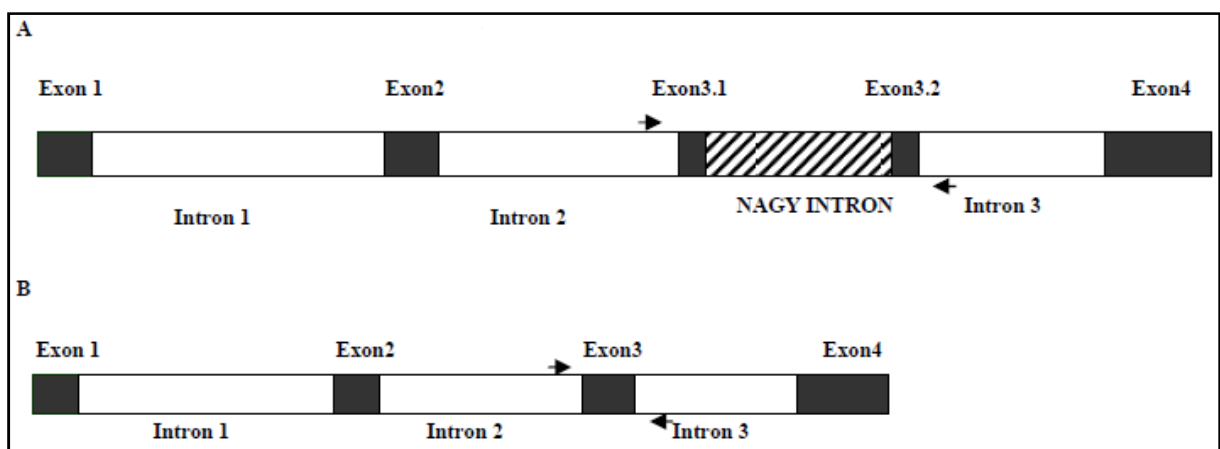
Ábra forrása: FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008

2.5. A QoI rezisztencia mechanizmusai

A terminális oxidációban szerepet játszó citokrómok hem tartalmú vas-fehérjék. Az $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ átalakulás révén a glikolízisből, a citromsavciklusból és a zsírsavak oxidációjából származó redukált kofaktorok által szállított elektronok felvételére és leadására képesek. Egyes típusaik (b , c_1 , a , a_3) fényabszorpciós tulajdonságuk alapján különböztethetők meg. A QoI target, a citokróm bc_1 enzim komplex a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő, a III. légzési komplexet alkotó integráns fehérje. Eukariótákban 10/11 polipeptid építi fel, molekulatömege körülbelül 240 kDa. Az enzim katalitikus magját a citokróm b , a citokróm c_1 és a Rieske vas-és kéntartalmú fehérje (ISP) alkotják. A QoI kötőhely az enzim komplex citokróm b alegységén belül helyezkedik el, mely a mitokondriális genomban található citokróm b gén (CYTB) által kódolt. A különböző QoI fungicidek nagyon hasonló módon illeszkednek az enzim aktív centrumába (ESSER et al., 2004).

A QoI fungicidekkel szemben kialakult rezisztencia egyik mechanizmusa a CYTB gén mutációja. Az érzékenységet befolyásoló mutációkat a CYTB gén két régiójában is megtalálták, melyek a kódolt protein 120-155 és 255-280 aminosav pozíciójának felelnek meg. Ezek a domének egymáshoz közel helyezkednek el az összehajtogatott proteinben, és szerepet játszanak a ligand kötődésében. Három fontos aminosav szubsztitúció fordul elő számos fitopatogén gombában (köztük a *Botrytis cinerea*-ban) és oomycetesben. A glicin alaninra történő cserélődése a 143-as aminosav pozícióban (G143A), egy fenilalanin megváltozása leucinra a 129-es kodonon (F129L) (GISI et al., 2002), valamint a 137-es glicin szubsztitúciója arginire (G137A) (SIEROTZKI et al., 2006). A három pontmutáció közül kettő, az (F129L) és a (G137A) mérsékelt rezisztenciát okoznak, mely kontrollálható az ajánlott QoI mennyiséggel. Ezzel ellentétben a G143A szubsztitúció magasfokú rezisztenciát eredményez, melynek következtében a QoI fungicidekkel történő kezelés sikertelen. A G143A mutációt eddig több mint húsz szenzitív fajban detektálták, köztük fitopatogén gombákban és oomycetes-ekben, ezen belül számos lisztharmatban, *Alternaria* fajokban és a főbb *Mycosphaerella* fajokban (I2). Az eddigi eredmények alapján azonban a G143A mutáció

nem volt kimutatható abban az esetben, amikor jelen volt a 143-as pozíciójú kodon után, a 3. exonba ékelődve egy I. típusú, nagy intron (BANNO et al., 2009; JIANG et al., 2009) (4. ábra). Ez az intron gyakran fordul elő a mitokondriális genom elektrontranszport rendszerét, továbbá a riboszomális RNS-t kódoló génekben (FOURY et al., 1998). Magyarországi *Botrytis cinerea* populációkat vizsgálva sem sikerült kimutatni a (G143A) mutációt nagy intronnal rendelkező mintákban (ASADOLLAHI et al., 2010). Ennek magyarázata lehet, hogy a G143 mutáció nagymértékben befolyásolná a 143. kodon után beépülő nagy intron kivágódását az mRNS érése során.



4. ábra: A *Botrytis cinerea* CYTB génjének vázlatos képe.

A: a CYTB nagy intront tartalmazó formája, B: A CYTB nagy intron nélküli formája; A nyilak a primerek bekötődési helyeit jelzik

Ábra forrása: ASADOLLAHI et al., 2010

Egy másik mechanizmus az alternatív, cianid rezisztens légzés, melyet az alternatív oxidáz (AOX) tart fenn. Ezzel a mechanizmussal a mitokondriális elektron transzfer elterelhető és a citokróm bc₁ enzim komplex megkerülhető. Szabadföldi körülmények közt azonban az alternatív légzés azon képessége, hogy ellensúlyozza a QoI fungicidek hatását két okból is korlátozott. Ezek közül az egyik, hogy ez az út a normál reakcióút energiahozadékának mindössze 40%-át szolgáltatja, mivel a III. és IV. légzési komplexet átugorja, és az AOX nem rendelkezik proton pumpa aktivitással. Így a nagy energiát igénylő és a növény kolonizációjában kritikus szerepet játszó folyamatok, mint a spóracsírázás és a gazdanövénybe való behatolás nem lehetségesek. A másik ok, hogy a növényekben a fertőzés hatására antioxidánsok szabadulnak fel, melyek megakadályozzák az alternatív légzést, kioltva a QoI fungicidek hatására keletkezett reaktív oxigén csoportokat, melyek nélkülözhetetlenek az AOX-ot kódoló gén indukálásához (WOOD et al., 2003). In vitro

körülmények között azonban a gátló tényezők nem állnak fenn, ezért a vizsgálatok sikerességének érdekében szükséges az alternatív légzés gátlása. Előző tanulmányokból kiderül, hogy a pyraclostrobin és a szalicil-hidroxám sav (SHAM) az alternatív, cianid rezisztens légzés specifikus gátlószerei (MARKOGLU et al., 2006).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Izolátumok és ezek fenntartása, tárolása

Az izolálás 2009-ban történt fertőzött, szürkerothadásos szamócaszemekről, illetve levelekről. Az egyspórás izolátumokat Fekete Éva készítette (DE TEK, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen).

A törzseket burgonya-dextróz táptalajon növesztettük (5. ábra): 24 g/l burgonya-dextróz és 20 g/l agar (PDA, Scharlau, Spektrum-3D, Debrecen). Hosszabb tároláshoz a gombát, a spóráképzést elősegítő borsós táptalajon (Baroffio et al., 2003) növesztettük: 160 g/l fagyasztott, pürésített zöldborsó, 5 g/l glükóz, 15 g/l agar desztillált vízben oldva, pH= 6.0. Ezt követően a konídiumokat összegyűjtöttük.

A konídiumok lemosásához a következő oldatot használtuk: 10 g/l glükóz, 1,50 g/l K_2HPO_4 , 2 g/l KH_2PO_4 , 1,00 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 5,00 g/l $MgSO_4$, 2,00 g/l élesztő kivonat, 0,5 g/l Tween, desztillált víz és glicerín 1: 1 arányú keverékében oldva. A spórák tárolása ebben a médiumban történt $-80^\circ C$ hőmérsékleten.

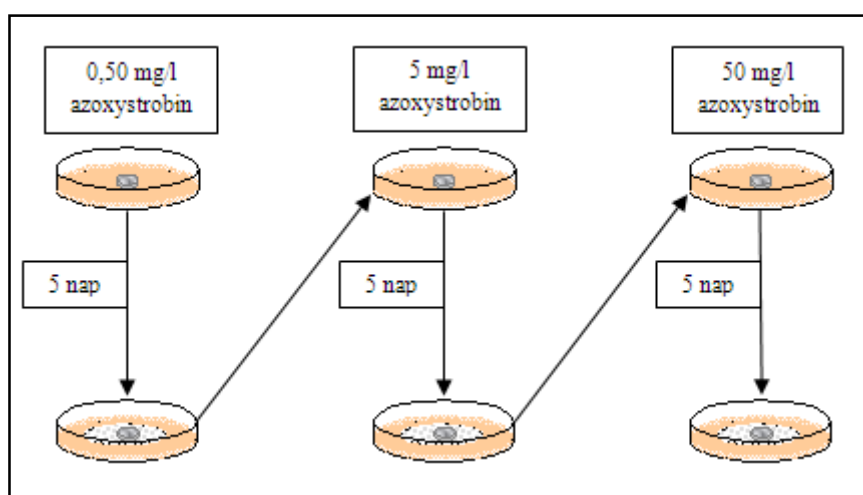


5. ábra: *B. cinerea* burgonya-dextróz táptalajon (Váczy Kálmán felvétele)

3.2. Azoxystrobin rezisztencia indukálása

A $-80^\circ C$ -on, spóramosó folyadékban elhelyezett spórákat PDA táptalajra oltottuk le. A leoltást minden izolátum esetében két másolatban végeztük el. A törzseket ezt követően 5 napon keresztül növesztettük $25^\circ C$ hőmérsékleten, fénytől elzártan.

A törzseket 3 alkalommal oltottuk át. Ennek során a tenyészetek széléről nyert 10 mm átmérőjű táptalajkorongot helyeztük az új médiumra a micéliummal benőtt oldalával lefelé fordítva. Minden átoltság előtt mértük a tenyészetek átmérőjét és az átoltságok között 5 napig inkubáltuk a tenyészeteket 25°C hőmérsékleten, fénytől elzárva. Kétféle táptalajt alkalmaztunk a kutatás során: az egyik 100 mg/l SHAM-ot (szalicil-hidroxám sav), az alternatív, cianid rezisztens légzés specifikus gátlószerét tartalmazó, a másik SHAM-ot és azoxystrobin tartalmazó PDA táptalaj volt. Az egymást követő átoltságok során növekvő azoxystrobin koncentrációt alkalmaztunk (6. ábra): 0,50 mg/l, 5 mg/l, 50 mg/l.



6. ábra: Átoltságok növekvő azoxystrobin koncentrációjú táptalajra

Kiszámítottuk az azoxystrobin által kiváltott átlagos növekedésgátlás %-os értékeit. Az azoxystrobin és SHAM tartalmú táptalajon növesztett (gátolt) tenyészetek átmérőjét viszonyítottuk a csak SHAM-ot tartalmazó táptalajon növekedett (nem gátolt) tenyészetek átmérőjéhez a következő képlet szerint:

$$\frac{\text{nem gátolt tenyészet átmérője (mm)} - \text{gátolt tenyészet átmérője (mm)}}{\text{nem gátolt tenyészet átmérője (mm)}} \times 100$$

3.3. DNS izolálása, felszaporítása, tisztítása és koncentrációjának meghatározása

A genom vizsgálatához szükséges gomba DNS Petri csészén növesztett tenyészet micéliumából származik. A kinyeréshez egy mechanikus sejtfeltáró készüléket alkalmaztunk, mely nagy teljesítményű és a feltáráshoz kisméretű kerámiagolyókat használ (Roche,

MagNaLyser). Az extrakció kereskedelmi forgalomban kapható kit-tel történt: NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL), melyet a gyártó leírása szerint alkalmaztunk. Az izoláció részletes leírását az 1. függelék tartalmazza.

A real-time PCR reakció kalibrálása céljából alkalmazott standard minták pontos DNS koncentrációját Nanodrop (Thermo) segítségével határoztuk meg 2 µl térfogatú izolált DNS-ből.

Kutatásaink során a mitokondriumban található CYTB génnel foglalkoztunk, melynek pontmutációja a fungicidekkel szemben tapasztalt magasfokú rezisztenciát okozza. Ahhoz, hogy eredményesen vizsgálhassuk ezt a DNS szakaszt, nagy mennyiségben volt rá szükségünk. Felszaporítása polimeráz láncreakció (angol nevének Polymerase Chain Reaction kezdőbetűi alapján PCR) segítségével történt. A PCR reakció elve, hogy ha a DNS-függő polimeráz reakciót két megfelelő oligonukleotid primer jelenlétében többször megismétli, így az eredeti DNS egy része megsokszorozható.

A felszaporításhoz a cytb-BcF és cytb-BcR primerpárt használtuk:
cytb-BcF: 5' – TAAAGTGGTATAACCCGACGG – 3'
cytb-BcR: 5' – CCATCTCCATCCACCATACCT – 3'
A CYTB gén szekvenciát, az exonokat és a primerek pontos elhelyezkedését a 2. függelék tartalmazza.

A gén PCR-es felszaporítását 50µl térfogatban végeztük, melyben 21 µl nukleáz mentes víz, 2 µl gomba DNS, 25 µl 2x Go Taq® Green Master Mix (Promega) és 1-1 µl forward ill. reverz primer (10pmol/µl) volt. Az egyes törzsek DNS-ének hígítása az előzetesen elvégzett agaróz gélelektroforézis során kapott kép alapján történt. A DNS-t 1,5 %-os gélben futtattuk: 1,5 g/l agaróz TAE pufferben oldva, 1 órán át, közben 80 V feszültséget biztosítva.

A következő PCR programot használtuk: 1x (első denaturáció: 95°C, 5 perc), 5x (denaturáció: 95°C, 1 perc, anelláció: 58°C, 1 perc, polimerizáció: 72°C, 1 perc 30 másodperc), 30x (denaturáció: 90°C, 1 perc, anelláció: 58°C, 1 perc, polimerizáció: 72°C, 1 perc 30 másodperc), 1x (végső polimerizáció: 72°C, 15 perc). A Go Taq Green Master Mix

magas hőmérséklet hatására hamar inaktiválódik, ezért a reakció kezdeti ciklusaiban alkalmazott 95°C denaturációs hőmérsékletet az ötödik ciklus után 90°C-ra csökkentettük. A reakció kezdetén a teljes genomi DNS szétválasztása a cél, ezért szükséges a magasabb hőmérséklet. Az első öt ciklus után rendelkezésre áll annyi termék, melyből a további szintézis lehetséges, és annak denaturálásához elegendő az alacsonyabb hőmérséklet.

A felszaporítás során alkalmazott PCR készülék: Primus (MWG Biotech, Németország).

A felszaporítás után a tisztítást Wizard[®] SV Gel and PCR clean up rendszerrel (Promega) végeztük a tisztítást a gyártó utasítása szerint (3. függelék).

3.4. A CYTB gén pontmutációjának vizsgálata restrikciós analízis segítségével

A restrikciós endonuklázok három típusa ismert, melyek közül az I. és a III. típusok molekuláris biológiai felhasználása nem jellemző, ellenben a II. típus manapság nélkülözhetetlen, mivel az ide tartozó restrikciós endonukleázok mindig azonos helyen, az adott enzimre jellemző felismerési szekvencián belül, vagy annak közelében hasítják a DNS-t. Ezek alapján a genetikai diverzitás vizsgálatának egy módja, ha egy DNS szakaszt PCR technikával történő felszaporítása után emésztjük egy megfelelő restrikciós endonukleázzal. A Kísérlet során a FastDigest[®] Fnu4HI (SaiI) restrikciós enzimet alkalmaztuk, majd agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáljuk az eredményeket.

3.5. A CYTB gén pontmutációjának detektálása valós idejű (real-time) PCR technika segítségével

A valós idejű (real-time) kvantitatív (QPCR) során a mérőműszerek fluoreszcencia jelet detektálnak, melynek intenzitása arányos a PCR termék mennyiségével. Minden egyes ciklus végén detektálják és kvantitálják a képződött PCR terméket, lehetővé téve a reakció folyamatos nyomon követését. A QPCR reakció során a keletkezett DNS termék két módon detektálható: szekvenciától függetlenül (aszpecifikusan), illetve szekvencia-specifikusan. Aspecifikus detektálás során a műszer minden kettős szálú DNS molekulát detektál. Alapja,

hogy a kettősszálu DNS-be interkalálódó festékmolekulát alkalmazunk. A komplexet képző festékmolekula (esetünkben a 2x Fast Eva Green MasterMix) 470 nm-en gerjeszhető és 510 nm-en fluoreszcens jelet bocsát ki. Ezzel szemben a szekvencia-specifikus detektáláshoz szükség van a primereken kívül, a fluorofort és quencher hordozó oligodeoxinukleotidára, melyet próbának nevezünk. A specificitást az növeli az aspecifikus detektáláshoz képest, hogy a primerek közötti DNS szakaszhoz a próbának is hibridizálnia kell. A fluoreszcens szignál keletkezési mechanizmusa alapján hidrolízis és hibridizációs próbákat különböztetünk meg. A hidrolízis próbákat TaqMan próbának is nevezik, míg a hibridizációs próbák legelterjedtebb típusai a molekuláris villogó (molecular beacon), illetve a skorpió próbák (scorpion probe) (SCHOLTZ et al., 2004).

A felszaporításhoz a BcCOX1 és BcAR primerpárokat használtuk. A BcCOX1 a mitokondriális COX1 gén detektálására alkalmas és a kísérletek során referenciaként alkalmaztuk (4. függelék), míg a BcAR primerpár a CYTB pontmutációjára specifikus. A BcAR-F (forward) a 143-as kodon pontmutációjához lett tervezve, a BcAR-R (reverse) pedig a CYTB gén utolsó intronjának egy egyedi szekvenciájához (JIANG et al., 2008) (5. függelék).

BcCOX1-F: 5' – CTTCTGGTCATCCAGAGGTC – 3'

BcCOX1-R: 5' – ACAGCAATTATTAAAGTAGCCG – 3'

BcAR-F: 5' – GGCAAATGTCACTGTGAGC – 3'

BcAR-R: 5' – ACCATCTCCATCCACCATACCT – 3'

Az összemért reakcióelegy a következőket tartalmazta:

2x Fast Eva Green MasterMix (Biotium):	5µl
Primer F (2,5 pmol/µl):	1µl
Primer R (2,5 pmol/µl):	1µl
Templát DNS:	2,5µl
<u>H₂O:</u>	<u>0,5µl</u>
Végző térfogat:	10µl

A reakciók inkubációs programját Rotor Gene 6000 (Corbett Research) real-time PCR készüléken futtattuk (7. ábra): 1x (enzim aktiválása 96°C – 2 perc), 40x (denaturálás 96°C – 5 másodperc, hibridizálás 54°C – 6 másodperc, szintézis 72°C – 25 másodperc). A kutatás során kétféle reakció térfogatot alkalmaztunk: a kezdeti kísérletek a CYTB génben található pontmutáció detektálásának optimalizálása érdekében történtek, ekkor kevesebb számú DNS mintával, nagyobb térfogatban (20 µl) zajlott a reakció. A paraméterek megfelelő beállítása után nagyszámú minta egyidejű összehasonlíthatósága érdekében kisebb méretű PCR csöveket használtunk lecsökkentve a térfogatot (10 µl) is.



7. ábra: Rotor Gene 6000 (Corbett Research) real-time PCR készülék
Kép forrása: I3

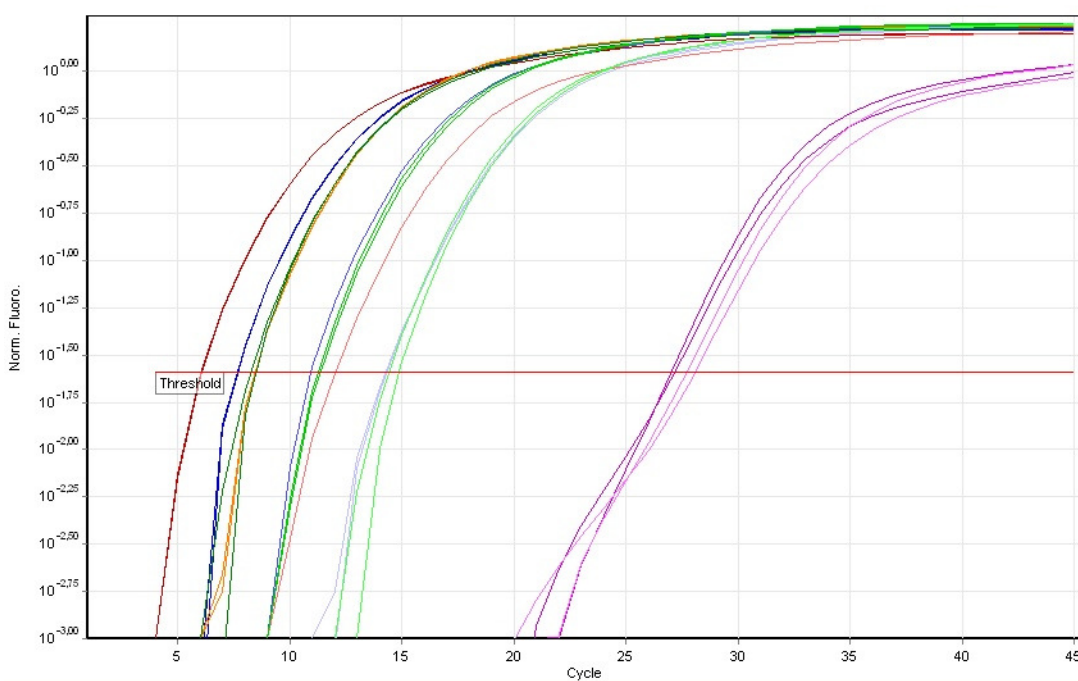
3.6. Real-time PCR adatelemzés

Az eredmények kiértékelése Rotor Gene 1.7.61 software segítségével történt.

3.6.1. Mennyiségi elemzés

A reakció korai fázisában a reakcióelegynek van egy saját fluoreszcenciája, amit háttér fluoreszcenciának neveznek. Ez a korai ciklusok során mért fluoreszcenciák átlagértéke (baseline). Ahogy egyre több PCR termék keletkezik, a reakcióelegy fluoreszcenciája magasabb lesz a háttérnél. A szignifikáns különbséget egy küszöbérték (threshold)

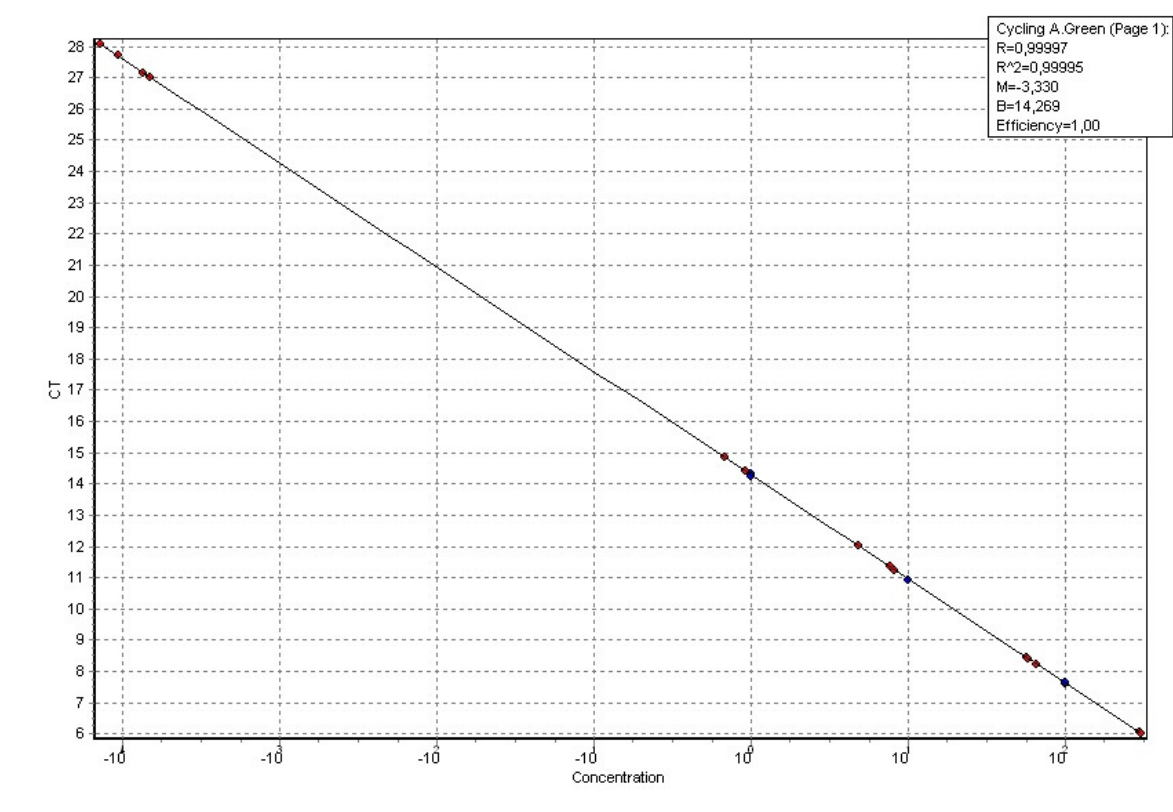
megadásával biztosítjuk (8 ábra). A templát mennyiség abból a ciklusszám értékből (C_t = threshold cycle) határozható meg, amikor a reakcióelegy fluoreszcenciája eléri, vagy meghaladja a küszöbértéket.



8. ábra: A küszöb egyenes meghúzásával megkapjuk a C_t -értékeket, ha annak az amplifikációs görbékkel való metszéspontjait a vízszintes tengelyre vetítjük.

Vízszintes tengelyen a ciklusszám (idő), a függőlegesen a fluoreszcencia intenzitása van feltüntetve.

Az adatok kiértékelésének több módja létezik. Munkánk során az abszolút kvantitálás módszerét alkalmaztuk. Ismert koncentrációjú templát DNS-ből (standard) hígítási sort készítettünk, majd minden hígításra meghatároztuk a C_t -értéket QPCR segítségével. A szoftver ezek után ábrázolta a standard minták C_t -értékeit a megadott koncentrációk függvényében és létrehozott egy kalibrációs egyenest (9. ábra). Az egyenes egyenlete alapján az ismeretlen minták koncentrációja a kapott C_t -értékekből meghatározható (standard görbe analízis). Az egyenes egyenlete: $C_t = M \cdot \log(\text{koncentráció}) + B$, ahol C_t a küszöbérték ciklusszám, M az egyenes dőlésszöge és B az egyenes y-tengellyel való metszéspontja.

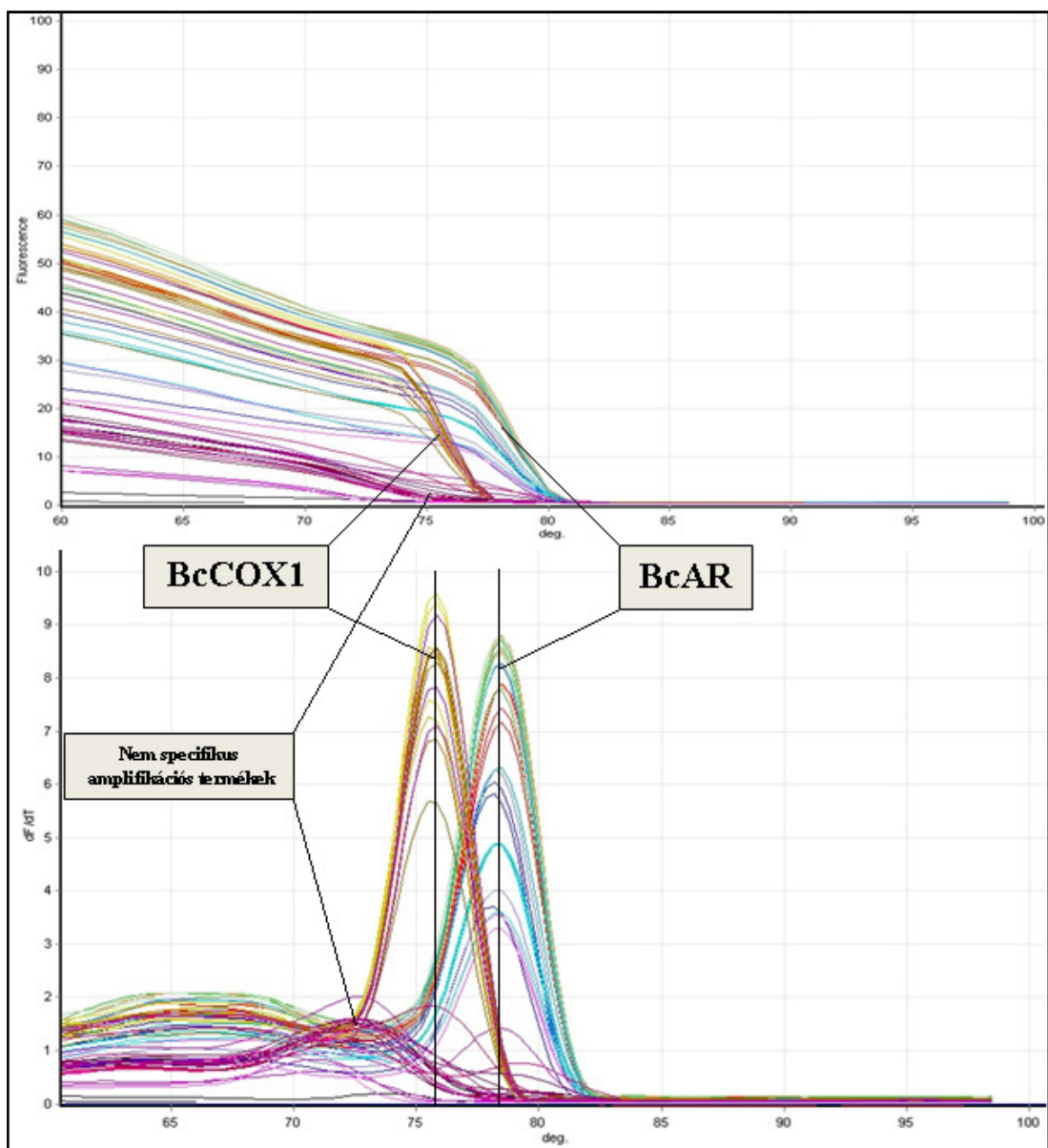


9. ábra: QPCR standard hígítási sor: a Ct-értékeket a koncentrációk függvényében ábrázolva. Ct: küszöbérték ciklusszám, Concentration: a DNS koncentrációk logaritmus, R: korrelációs együttható négyzetgyöke, R^2 : korrelációs együttható, M: az egyenes dőlésszöge, B: az egyenes y-tengellyel való metszéspontja, Efficiency: a reakció hatékonysága, Kék pontok: a görbén az általunk definiált standardokat jelölik, Piros pontok: az ismeretlen koncentrációjú mintákat jelzik.

3.6.2. Minőségi elemzés

A keletkezett termékek megkülönböztetése, genotipizálása olvadáspont analízissel történt. Minden DNS fragmentumnak jellemző olvadáspontja (T_m) van, mely az a hőmérséklet, melyen az adott DNS fragmens 50%-a egyszálú. Az olvadáspontot leginkább befolyásoló tényezők: a fragmens G-C tartalma, valamint a hossza. Amikor a hőmérséklet eléri a vizsgált fragmens T_m értékét, a fluoreszcencia emisszió hirtelen csökkenni kezd és a duplaszál specifikus, interkalálódó festék leválik az amplikonról.

Az olvadáspont analízis a nyers adatok deriváltját elemzi. A minták hőmérséklete lineárisan változik 60°C és 99°C között, közben minden minta fluoreszcenciáját méri a készülék. A program a fluoreszcencia negatív első deriváltját ábrázolja a hőmérséklet függvényében (10. ábra).



10. ábra: Olvadási görbe analízis a real-time PCR specifikusságának ellenőrzésére.
deg: a degeneráció hőmérséklete (°C), dF/dT: a fluoreszcencia intenzitásának változása a hőmérsékletváltozás függvényében.

4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

A Növényvédelmi Intézet Kutatócsoportja 2008 és 2009 között 160 szabadföldi *Botrytis cinerea* egyspórás izolátumot vizsgált, melyek szürkerothadásos számóca- és málnaszemekről, levélről, illetve repceszárról származtak és Nagyréde térségében kerültek begyűjtésre. Munkájuk során a törzseket kategorizálták a CYTB gén pontmutációjának és a nagy intron meglétének, valamint az azoxystrobinnal szembeni rezisztencia mértékének, szempontjából. Az általuk összegyűjtött adatok alapján választottuk ki a kutatásunk tárgyát képező törzseket (1. táblázat), melyek az előzetes vizsgálatok alapján szenzitívnek bizonyultak az azoxystrobinnal történő kezeléssel szemben, ugyanakkor a G143A mutáció kimutatására alkalmas BcAR primerpárral végzett PCR reakció során pozitív eredményt adtak és nem tartalmazták az 1205 bp hosszúságú nagy intront a CYTB gén 143-as kodonja után. Ezek a törzsek a következők: 9028, 9031, 9043, 9058. Negatív kontrollként a 9001-es törzset, míg pozitív kontrollként a 9022-es törzset választottuk.

1. táblázat: A vizsgált *Botrytis cinerea* törzsek jellemzői.

Törzs száma	Azoxystrobin rezisztencia mértéke*	G143A**	Nagy intron jelenléte
9001	S	-	nincs
9022	HR	+++	nincs
9028	S	++	nincs
9031	S	++	nincs
9043	S	++	nincs
9058	S	+++	nincs

*S: érzékeny, HR: magas rezisztencia

** -: a PCR reakció eredménye negatív, ++: a PCR reakció eredménye erősen pozitív, +++, PCR reakció eredménye nagyon erősen pozitív

A kontroll törzsek kiválasztása során figyelembe vettük a Kutatócsoport előzetes munkáját, valamint a real-time PCR reakció optimalizálása során kapott eredményeket, mivel a paraméterek megfelelő beállítása céljából végzett reakciók több lehetséges kontroll törzs felhasználásával zajlottak.

4.1. A növekvő azoxystrobin koncentráció hatása a törzsekre

A kísérletben négy, az előzetes vizsgálatok során szenzitívként viselkedő szabadföldi *Botrytis cinerea* izolátumot vizsgáltunk, melyekben allél specifikus PCR reakció segítségével kimutatható volt a CYTB gén pontmutációja. A törzseket egyre nagyobb koncentrációban azoxystrobint tartalmazó PDA táptalajra oltva mértük a telepek átmérőjét (2. táblázat). A kapott eredmények alapján meghatároztuk a fungicid által kiváltott átlagos növekedésgátlás értékeit (3. táblázat).

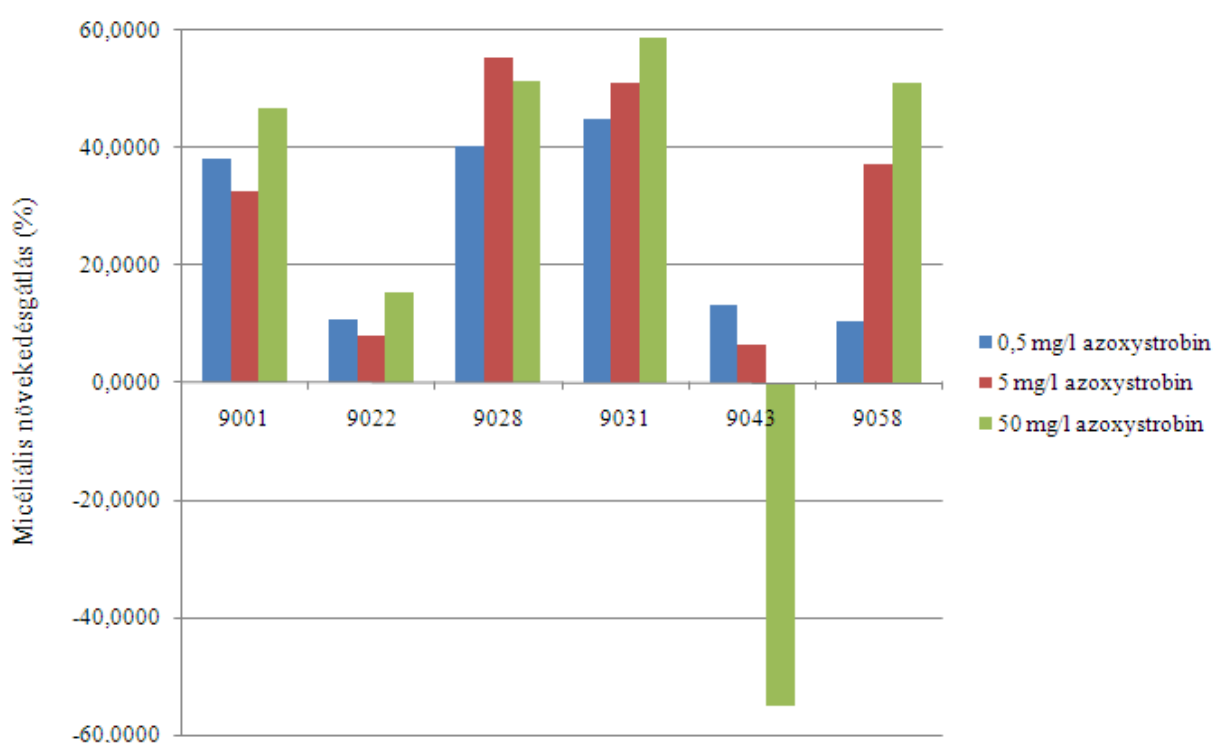
2. táblázat: A *Botrytis cinerea* törzsek növekedése különböző azoxystrobin tartalmú táptalajokon

Törzs száma	Átmérő (mm) az 1. átoltás előtt				Törzs száma	Átmérő (mm) a 2. átoltás előtt				Törzs száma	Átmérő (mm) a 3. átoltás előtt			
	SHAM 100 mg/l		Azoxystrobin 0,5 mg/l SHAM 100 mg/l			SHAM 100 mg/l		Azoxystrobin 5 mg/l SHAM 100 mg/l			SHAM 100 mg/l		Azoxystrobin 50 mg/l SHAM 100 mg/l	
	1	2	1	2		1	2	1	2		1	2	1	2
9001	60	58	35	40	9001	75	70	50	50	9001	58	57	30	31
	60	58	35	36		75	72	47	50		57	55	31	29
9022	45	50	45	43	9022	46	47	43	42	9022	53	55	50	40
	48	50	43	41		45	49	42	45		50	53	45	43
9028	65	55	38	32	9028	75	75	42	33	9028	52	50	22	28
	58	56	36	34		76	75	31	29		52	50	21	28
9031	60	60	33	30	9031	70	73	35	36	9031	55	53	20	20
	55	55	34	30		71	73	35	35		50	52	23	24
9043	45	46	40	40	9043	28	23	38	15	9043	10	10	18	15
	40	42	35	35		25	20	28	12		10	10	19	10
9058	50	50	40	44	9058	70	73	45	45	9058	52	48	25	25
	45	46	44	43		73	72	45	46		50	50	24	24

3. táblázat: A növekvő azoxystrobin koncentráció hatására kialakult átlagos növekedésgátlás értékei a különböző *Botrytis cinerea* törzsek esetén.

Törzs száma	Átlagos növekedésgátlás 0,5 mg/l azoxystrobin esetén (%)	Átlagos növekedésgátlás 5 mg/l azoxystrobin esetén (%)	Átlagos növekedésgátlás 50 mg/l azoxystrobin esetén (%)
9001	38,0747	32,4554	46,6925
9022	10,6882	7,9842	15,4576
9028	40,1890	55,1611	51,3269
9031	44,7826	50,8622	58,5714
9043	13,2687	6,3405	-55,0000
9058	10,4770	37,1522	50,9804

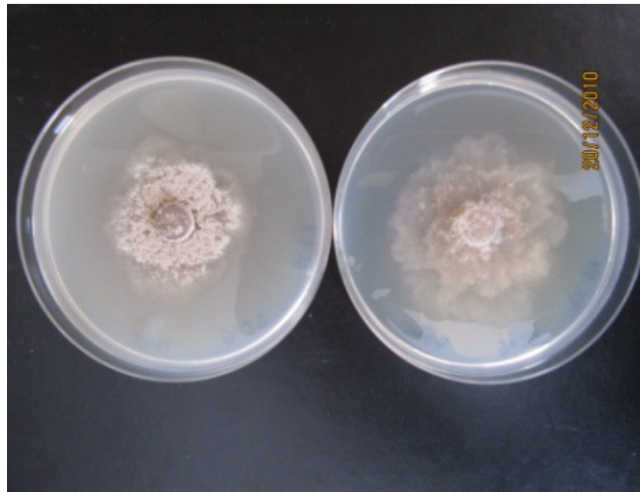
A kapott eredmények alapján a 9043-as *Botrytis cinerea* izolátum rezisztensnek mutatkozott azoxystrobinnal szemben, hiszen a harmadik átoltást követően a gomba az azoxystrobint tartalmazó táptalajon jobban nőtt, mint a kontroll, fungicid nélküli táptalajon (2. táblázat; 11. ábra). A 9028, 9031 és a 9058 izolátumok esetében az átlagos növekedésgátlás emelkedett magasabb azoxystrobin koncentráció alkalmazásának hatására, melyet az 11. ábra szemléltet. A kontroll törzsek esetében kapott eredmények alapján elmondható, hogy a 9001-es izolátum jó negatív kontroll (12. ábra), míg a 9022-es izolátum jó pozitív kontroll (13. ábra).



11. ábra: Az átlagos növekedésgátlás mértékének változása a növekvő azoxystrobin koncentráció hatására.



12. ábra: 9001 negatív kontroll törzs növekedése SHAM tartalmú táptalajon (balra) és 50 mg/l azoxystrobin tartalmú táptalajon (jobbra). (Mojtaba Asadollahi felvétele)

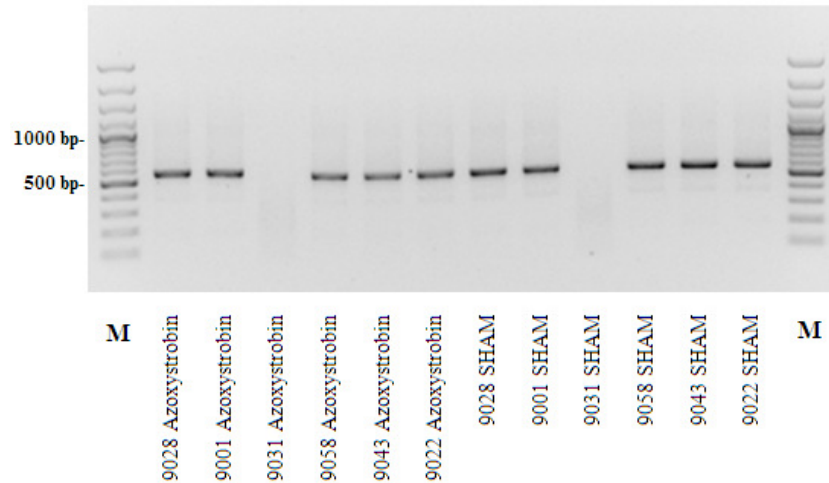


13. ábra: 9022 pozitív kontroll törzs növekedése SHAM tartalmú táptalajon (balra) és 50 mg/l azoxystrobin tartalmú táptalajon (jobbra). (Mojtaba Asadollahi felvétele)

4.2. A CYTB gén pontmutációjának (G143A) detektálása PCR-RFLP vizsgálat segítségével

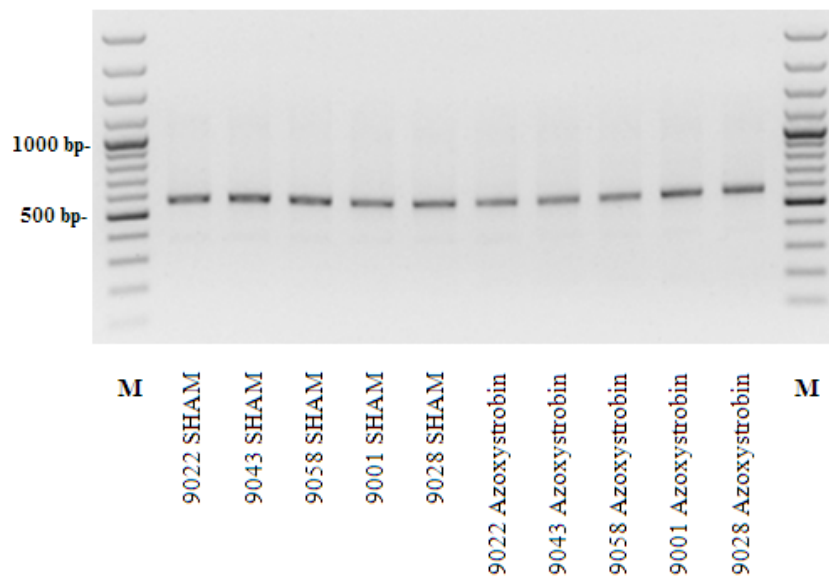
A DNS izolálása Petri csészén növesztett tenyészetek micéliumából történt NucleoSpin® Plant II protokoll (MACHEREY-NAGEL) szerint. A CYTB gén vizsgálatához szükséges, megfelelő mennyiségű genetikai anyagot PCR reakció segítségével kaptuk a CYTB génre specifikus cytb-BcF és cytb-BcR primerpár felhasználásával. A reakciót követően az eredményeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A gélkép alapján látható, hogy a 9031-es *Botrytis cinerea* minta DNS-ének felszaporítása sikertelen volt (14. ábra). A PCR termék tisztítását Wizard® SV Gel and PCR clean up rendszerrel

(Promega) végeztük (15. ábra), majd FastDigest® Fnu4HI (satI) restrikciós enzim segítségével emésztettük (16. ábra).



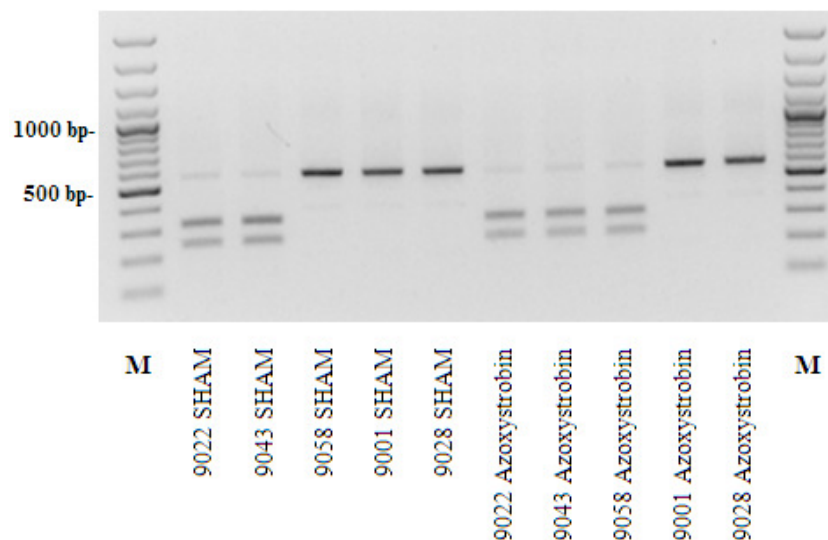
14. ábra: A CYTB gén PCR reakció segítségével történő felszaporításának eredménye agaróz géles futtatást követően (a 9031-es minta eltűnt).

M: molekulasúly marker (*O'GeneRuler*TM 100bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas)



15. ábra: PCR termék tisztítás eredménye agaróz géles futtatást követően.

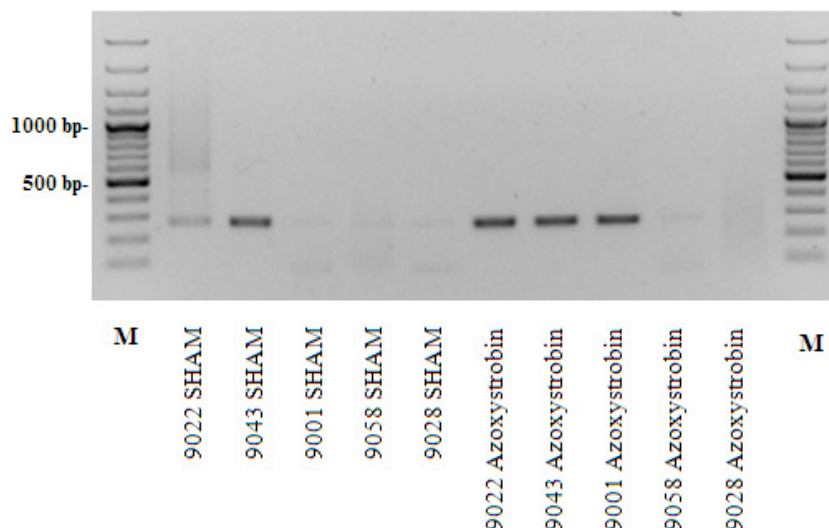
M: molekulasúly marker (*O'GeneRuler*TM 100bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas)



16. ábra: PCR termék emésztése Fnu4HI restrikciós endonukleáz segítségével (agaróz gélelektroforézist követően). Pozitív eredmény volt tapasztalható a 9022 (SHAM, azoxystrobin), 9043 (SHAM, azoxystrobin) és 9058 (azoxystrobin) izolátumok esetén.

M: molekulásúly marker (*O'GeneRuler*TM 100bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas)

A restrikciós endonukleázok mindig azonos helyen, az adott enzimre jellemző felismerési szekvencián belül, vagy annak közelében hasítják a DNS-t. Az általunk használt Fnu4HI restrikciós endonukleáz abban az esetben vágja ketté a DNS-t, amennyiben az tartalmazza a G143A pontmutációt. A várt eredményeknek megfelelően a 9022 pozitív kontroll izolátum esetében történt emésztés, tehát kimutatható volt a rezisztenciát okozó G143A pontmutáció. Az előzetes kísérletekben szenzitívként viselkedő 9043-as izolátum azoxystrobinnal szemben rezisztensnek bizonyult és a PCR-RFLP vizsgálat során pozitív eredményt adott. Meglepő módon a 9058-as törzs esetében eltérés volt megfigyelhető a csak SHAM-ot tartalmazó táptalajon és a SHAM-ot és azoxystrobint egyaránt tartalmazó táptalajon növesztett minták emészthetősége között, mely szerint a G143A pontmutáció azoxystrobinnal történő kezelés hatására vált detektálhatóvá. Az eredményeket a CYTB gén pontmutációjára specifikus BcAR primerpárral végzett allél specifikus PCR reakció is megerősítette (17. ábra).



17. ábra: Allél specifikus PCR reakció eredménye (agaróz gélelektroforézist követően): termékképződés a 9022 (SHAM, azoxystrobin), 9043 (SHAM, azoxystrobin) és 9058 (azoxystrobin) izolátumok esetén.
M: molekulásúly marker (*O'GeneRuler™* 100bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas)

4.3. A CYTB gén pontmutációjának (G143A) vizsgálata valós idejű (real-time) QPCR technika segítségével

A valós idejű (real-time) kvantitatív (QPCR) során a mérőműszerek fluoreszcencia jelet detektálnak, melynek intenzitása arányos a PCR termék mennyiségével. A QPCR reakció során a keletkezett DNS termék két módon detektálható: szekvenciától függetlenül (aspecifikusan), illetve szekvencia-specifikusan. A vizsgálatok során 2x Fast Eva Green Master Mix (Biotium) DNS polimerázt alkalmaztunk, mely interkalálódik a kettősszállú DNS-be, aspecifikus detektálást téve lehetővé. Mivel a festék a keresett szekvencia mellett detektálja a primer dimerek és nem-specifikus amplifikációs termékek képződését is, a mérés sikerének feltétele a reakció optimalizálása.

4.3.1. A QPCR reakciókörülményeinek optimalizálása

Munkánk nagyon fontos részét képezte a CYTB gén pontmutációjának detektálására használt QPCR reakció körülményeinek optimalizálása. Ezen belül a fő célunk az volt, hogy meghatározzuk az optimális templát DNS és primer koncentrációt, a megfelelő anellációs hőmérsékletet, valamint több QPCR reakciót futtattunk a vizsgálatok során negatív és pozitív kontrollként felhasznált DNS minták kiválasztásának céljából. Ezen kívül három féle,

kereskedelmi forgalomban kapható DNS polimerázt próbáltunk ki a végtermék nagyobb hatásfokú amplifikációjának érdekében.

Első lépésben megállapítottuk, hogy a BcAR primer pár alkalmas a CYTB gén pontmutációjának detektálására valós idejű (real-time) PCR rendszerben Rotorgene segítségével. Az eredményt igazolta, hogy az előzetes szenzitivitási vizsgálat, a PCR-RFLP analízis és a BcAR primerpárral történt PCR reakció során magasfokú rezisztenciát mutató (HR) és a G143A pontmutációt hordozó 9010-es DNS minta felszaporodott. Ezzel szemben a 8001-es DNS minta esetében, mely mérsékelt rezisztenciát mutatott (LR), az endonuklázos emésztés alapján nem tartalmazta a G143A mutációt és hordozta az 1205 bp hosszúságú nagy intront a CYTB génben nem keletkezett specifikus PCR termék. A kísérlet során 2x Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium) DNS polimerázt használtunk. Az inkubációs programot a gyártó utasítása szerint állítottuk be (4. táblázat), az anellációs hőmérsékletet 54°C-on állapítottuk meg. A többi paramétert, a reakcióelegyben lévő komponensek térfogatát az 5. táblázat szemlélteti.

4. táblázat: A 2x Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium) DNS polimeráz felhasználásával elvégzett QPCR reakció inkubációs programja a gyártó leírása szerint.

	Hőmérséklet	Időtartam	Ismétlések száma
Enzim aktiválása	96°C	2 min	1x
Denaturálás	96°C	5 sec	40x
Hibridizálás (anelláció)	50-60°C	6 sec	
Szintézis (amplifikáció)	72°C	25 sec	

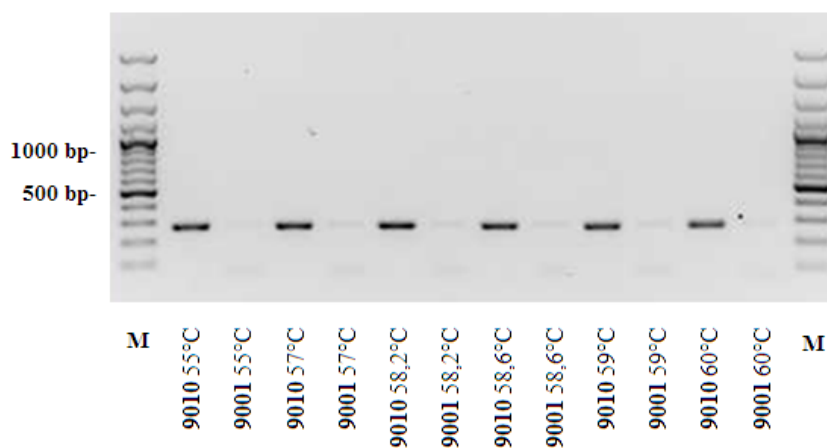
5. táblázat: A QPCR reakcióhoz szükséges komponensek és azok térfogatai.

2x Fast Eva Green Master Mix (Biotium):	10 µl
BcAR primer F (10 pmol/µl):	2 µl
BcAR primer R (10 pmol/µl):	2 µl
Templát DNS:	5 µl
H ₂ O:	1 µl
Végző térfogat:	20 µl

Meghatároztuk a kísérletek során alkalmazott megfelelő primer koncentrációt, melynek során a templát DNS-ből és a 10 pmol/µl koncentrációjú BcAR és BcCOX1

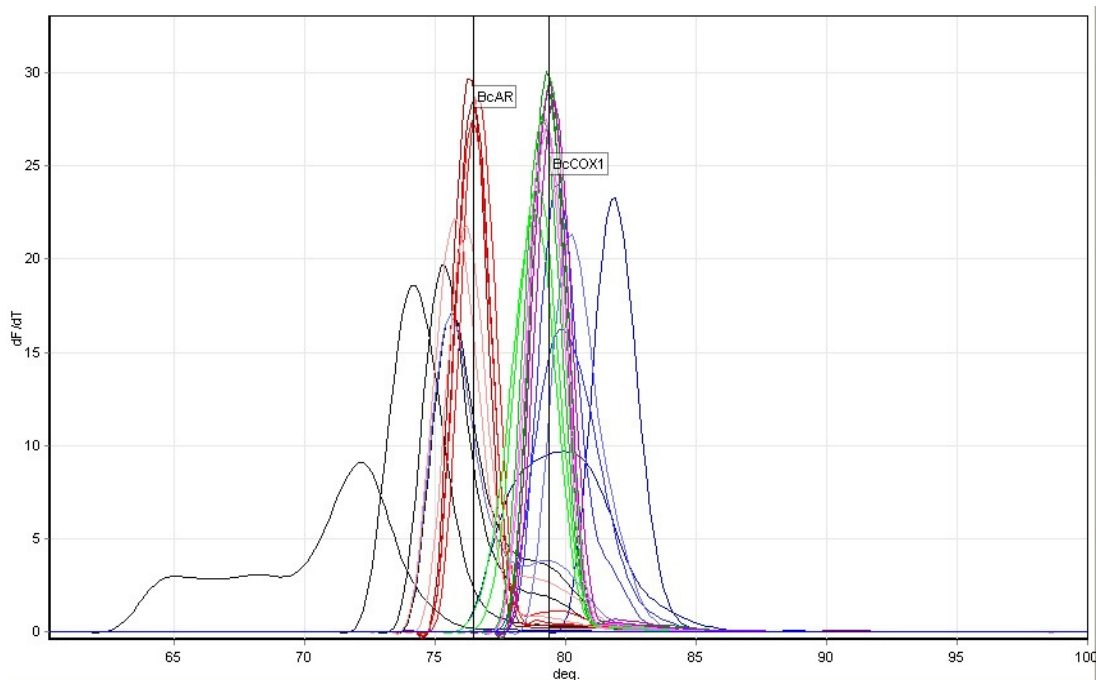
törzssoldatokból hígítási sorokat készítettünk. A primerek 10 pmol/μl, 5 pmol/μl, 2,5 pmol/μl és 1,25 pmol/μl koncentrációjú, valamint a DNS 10x, 100x és 1000x hígításaival végeztük el a reakciót. Az eredmények alapján látható volt, hogy kisebb primer koncentráció esetében nagyobb Ct értékeket kaptunk, valamint kisebb volt a primer dimerek képződésének aránya. Még 8x hígítású primerekkel is jól lehetett dolgozni, megmaradtak az arányok a DNS hígításban. A következőkben az optimális primer koncentrációt 2,5 pmol/μl értéken állapítottuk meg, és a továbbiakban így alkalmaztuk.

A specifikusabb termékképződés érdekében emeltük az anellációs hőmérsékletet 54°C-ról 60°C-ra előzetesen elvégzett gradiens PCR reakció eredményei alapján. A reakciót My Genie96 Thermal Block (Bioneer) PCR készüléken futtattunk BcAR primerpár és a következő anellációs hőmérsékletek felhasználásával: 55°C, 57°C, 58,2°C, 58,6°C, 59°C és 60°C. Annak ellenére, hogy gradiens PCR vizsgálat során BcAR primerpárral specifikus termék képződött 60°C anellációs hőmérsékleten (18. ábra), ugyanez a hőmérséklet a real-time PCR reakció során túl magasnak bizonyult, és nem specifikus termékképződéshez vezetett (19. ábra), ezért az anellációs hőmérsékletet a továbbiakban nem változtattuk.



18. ábra: Agaróz gélelektroforézissel történő futtatás után látható volt, hogy 60°C-os anellációs hőmérséklet esetén is történt termékképződés. (A 9010-es mintát pozitív kontrollként, a 9001-es mintát negatív kontrollként alkalmaztuk.)

M: molekulásúly marker (*O'GeneRuler*TM 100bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas)



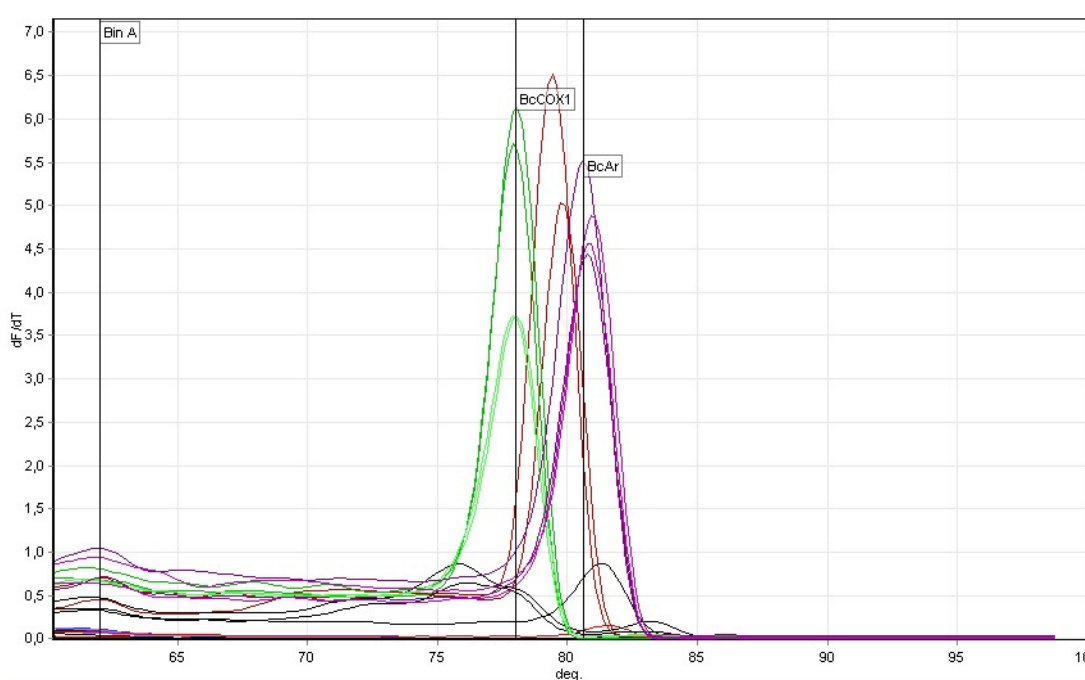
19. ábra: QPCR vizsgálat során keletkezett termékek olvadási görbe analízise 60°C-os anellációs hőmérséklet esetén: BcCOX1 primerpárral mind a pozitív (lila görbék), mind a negatív kontroll (zöld görbék) DNS minták felszaporodtak. BcAR primerpárral a pozitív kontroll DNS felszaporodott, létrejöttek specifikus és kisebb nem specifikus csúcsok egyaránt (piros és rózsaszín görbék), a negatív kontroll DNS esetében nem specifikus csúcsok képződtek (kék görbék). A templat DNS nélküli elegyben (fekete görbék-NTC) felszaporodtak kisebb, nem specifikus csúcsok.

deg: a degeneráció hőmérséklete (°C), dF/dT: a fluoreszcencia intenzitásának változása a hőmérsékletváltozás függvényében.

A 2x Fast EvaGreen[®] qPCR Master Mix (Biotium) mellett kipróbáltuk az AccuSure[™] Mix (Bioline), valamint a SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (Biorad) DNS polimerázokat is. A két polimerázt egy reakcióban teszteltük, amikor a reakciókörülményeket a Bioline gyártó cég utasítása szerint állítottuk be (6. táblázat). A kapott eredmények alapján (20. ábra) az AccuSure[™] Mix (Bioline) nem megfelelően működött, vagy nem specifikus csúcsok keletkeztek. A SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (Biorad) 72°C-on is működött, de termék keletkezett mindkét kontroll minta esetében, tehát nem specifikus. Ezek az enzimek kisebb hatékonysággal és kevésbé specifikusan dolgoztak rendszerünkben, ezért a továbbiakban is a 2x Fast EvaGreen[®] qPCR Master Mix (Biotium) DNS polimerázt használtuk.

6. táblázat: Az AccuSure™ Mix (Bioline) és a SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad) DNS polimerázokkal elvégzett QPCR reakció inkubációs programja a Bioline gyártó cég leírása szerint. A Biorad gyártó cég által megállapított optimumok: aktiválás 95°C-2 min, polimerizáció 60-65°C.

	Hőmérséklet	Időtartam	Ismétlések száma
Enzim aktiválása	95°C	7 min	1x
Denaturálás	96°C	6 sec	40x
Hibridizálás (anelláció)	54°C	6 sec	
Szintézis (amplifikáció)	72°C	60 sec	



20. ábra: QPCR vizsgálat során keletkezett termékek olvadási görbe analízise AccuSure™ Mix (Bioline) és a SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad) DNS polimerázokkal elvégzett reakció esetén: AccuSure™ Mix és BcCOX primerpár felhasználásával nem jöttek létre detektálható csúcsok, BcAR primerekkel pedig nem specifikus csúcsokat kaptunk (piros görbék). SsoFast™ EvaGreen® Supermix használatával specifikus csúcsok jöttek létre BcCOX primerekkel (zöld görbék), valamint specifikus és 62°C-nál kis, nem specifikus csúcsokat detektáltunk BcAR primerrel (lila görbék).

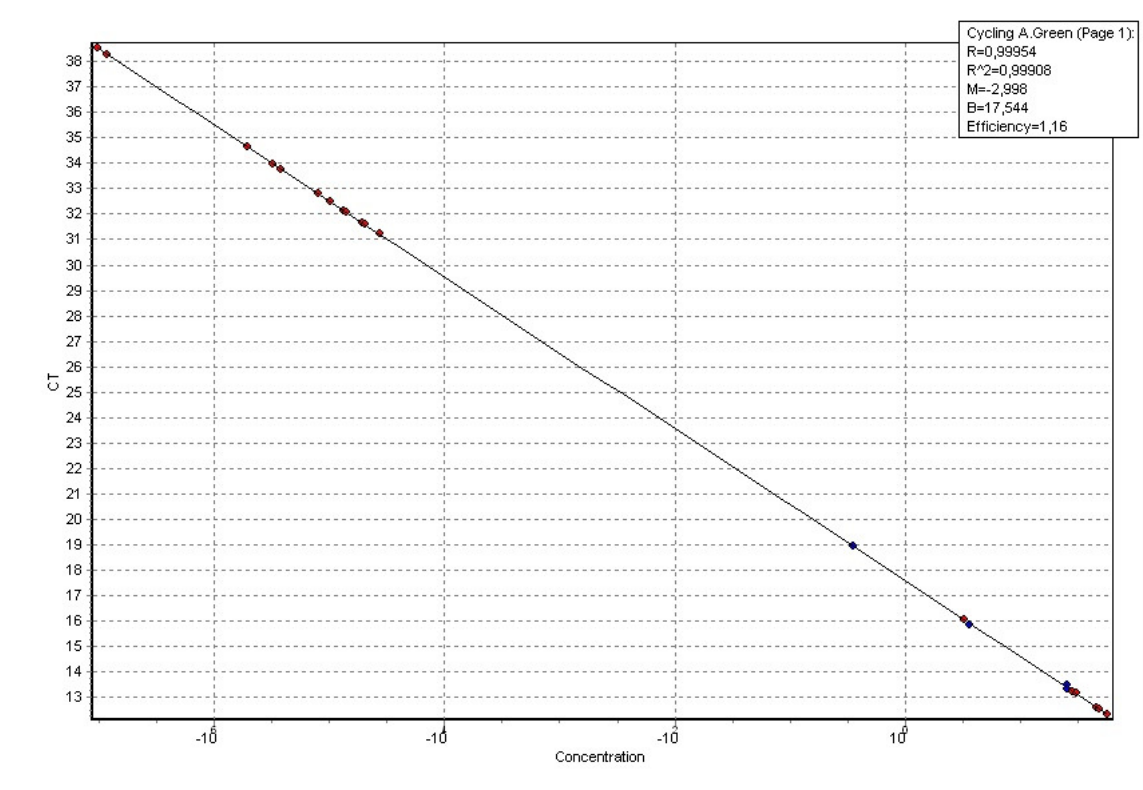
deg: a degeneráció hőmérséklete (°C), dF/dT: a fluoreszcencia intenzitásának változása a hőmérsékletváltozás függvényében.

4.3.2. Heteroplazmia szintjének meghatározása QPCR segítségével

A hagyományos PCR során képződött termék mennyiségét akkor méri, amikor a reakció már a plató fázisba került, átlagosan a 30-40. ciklus után. Ekkorra a PCR-t a késői ciklusok során gátló tényezők már fennállnak, például a szubsztrátok elhasználása (primerek, dNTP), DNS polimeráz hőinaktiválása és limitáló koncentrációja. A kiindulási templát

menyisége és a PCR termék mennyisége közötti log-lineáris összefüggés csak a PCR exponenciális fázisában áll fenn, ha PCR hatékonysága közel 100%. A kvantitatív PCR-készülékek minden egyes ciklus végén detektálják és kvantitálják a PCR terméket, lehetővé teszik a reakció folyamatos nyomon követését.

A real-time PCR vizsgálatok során a CYTB gén potmutációjának kimutatására alkalmas BcAR-F és BcAR-R primerpárral dolgoztunk. Az adatok kiértékelése az abszolút kvantitálás módszerével történt. Ismert koncentrációjú templátból (standard) hígítási sort készítettünk, a Ct-értékeket (küszöbérték ciklusszám) minden hígításra real-time PCR készülékkel határoztuk meg. A program a standard minták esetében kapott Ct-értékeket ábrázolta a megadott koncentrációk függvényében és létrehozott egy kalibrációs egyenest (21. ábra). Az egyenes egyenletéből az ismeretlen koncentrációk a Ct-értékek alapján számíthatók (7. táblázat).



21. ábra: QPCR standard hígítási sor: a Ct-értékeket a koncentrációk függvényében ábrázolva.

Ct: küszöbérték ciklusszám, Concentration: a DNS koncentrációk logaritmus, R: korrelációs együttható négyzetgyöke, R²: korrelációs együttható, M: az egyenes dőlésszöge, B: az egyenes y-tengellyel való metszéspontja, Efficiency: a reakció hatékonysága, Kék pontok: a görbén az általunk definiált standardokat jelölik, Piros pontok: az ismeretlen koncentrációjú mintákat jelzik.

7. táblázat: A koncentrációk meghatározása a Ct értékek és a standard hígítási sor segítségével

Törzsek	Standard hígítások	Ct-értékek	Standard koncentrációk (ng/μl)	Számolt koncentrációk (ng/μl)
9001 SHAM		31,87		0
9001 Azoxystrobin		34,64		0
9022 SHAM	1x	13,37	24,9	24,726
9022 SHAM	7x	15,83	3,55	3,724
9022 SHAM	70x	18,92	0,355	0,347
9022 Azoxystrobin		12,46		49,83
9028 SHAM		36,15		0
9028 Azoxystrobin		32,1		0
9058 SHAM		33,28		0
9058 Azoxystrobin		13,17		28,791

A program által meghatározott koncentráció értékek alátámasztották, hogy 9058-as minta esetében a heteroplazmia azoxystrobinnal kiváltott szelekciós nyomás hatására vált detektálhatóvá. Kiszámítottuk, hogy a 9058-as azoxystrobin jelenlétében növekedett és BcAR primerpárral felszaporított minta koncentrációja mekkora %-át képezi a 9022-es pozitív kontrolként használt minta BcAR primerpárral kapott koncentrációjának, mely szintén azoxystrobin tartalmú táptalajon volt növesztve. Az eredmények alapján a heteroplazmia szintjét 57,78%-os szinten állapítottuk meg.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A quinol oxidáz inhibitorok (QoI) valószínűleg a leghatékonyabb mezőgazdaságban alkalmazott fungicidek, melyek a sejtlégzést gátolják. Azonban a fungicid-rezisztencia napjainkban a gyakorlati növényvédelem hatékonyságát veszélyeztető egyik legfontosabb probléma. Számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre, melyekből kiderül, hogy a *Botrytis cinerea* nagyfokú genetikai diverzitást mutat mind mitokondriális DNS-ét, mind sejtmagban kódolódnó szekvenciáit tekintve. A mitokondriális DNS 10%-kal magasabb mutációs rátát mutat, mint a nukleáris DNS. Ennek több oka is van. A mitokondriumban nagy koncentrációban vannak jelen reaktív oxigén tartalmú köztitermékek (ROIs), viszont nem működik számos olyan repair folyamat, mely a nukleáris DNS hibajavítását végzi, és a mitokondrium nem rendelkezik hisztonokkal sem (TAYLOR et al., 2002; AVILA-ADAME AND KÖLLER, 2003). Az a tény, hogy a vizsgálataink tárgyát képező QoI fungicidek gátlásának célpontja, a Qo target, a mitokondriális genomban kódolódik, növeli az esélyét a rezisztencia kialakulásának. További kockázatot jelent a QoI fungicidek egyoldalú hatásmechanizmusa („single-site inhibitor”), velük szemben nagyobb eséllyel alakul ki rezisztencia, mint a több hatóhelyen ható („multi-site inhibitor”) növényvédőszerekkel szemben.

A G143A a mitokondriális CYTB gén pontmutációja, egyetlen glicin alaninra történő kicserélődése, mely nagymértékű rezisztenciához vezet a QoI fungicidekkel szemben. Azonban a gomba sejtek akár több mint 100 mitokondriumot is tartalmazhatnak, ezért bármilyen pontmutáció megjelenése egy mitokondriális DNS kópiában, elenyésző hatással van a gomba túlélésére. Még nem tisztázott, hogyan választódik ki egy mutáció a mitokondriumok egy „vad-típusú” populációjából. Több tanulmány is igazolta, hogy a G143A mutációra vonatkozó mitokondriális heteroplazmia a QoI rezisztencia különféle szintjeihez vezet (LESSEMANN et al., 2007). Ugyanakkor még nem választották meg azt a kérdést, hogy mennyi megváltozott mitokondriumra van szükség sejtenként, hogy teljesen rezisztens fenotípust eredményezzen.

Munkánk során sikerült előidéznünk a heteroplazmia szintjének változását azoxystrobinnal történő kezelés hatására. Ezzel igazolva, hogy azoxystrobin jelenlétében a

rezisztenciát hordozó mitokondriális genom aránya megnő a szenzitív hatóhelyet kódoló szekvenciával szemben. Kifejlesztettünk egy, a heteroplazmia követésére alkalmas módszert valós idejű (real-time) PCR segítségével. Melynek alkalmazásával a heteroplazmia szintje gondosan megválasztott kontroll minta felhasználásával számszerűsíthető. Léteznek PCR-re alapozott diagnosztikai eljárások, melyek célja a különböző fungicidek alkalmazása során kialakuló rezisztencia kimutatása a növénypatogén gombapopulációkban, valamint a rezisztencia kialakulásának felmérése még a vegyszeres védekezés megkezdése előtt (FRAAIJE et al., 2002; FRAAIJE et al., 2005). Az általunk alkalmazott molekuláris biológiai módszerekről, mint a PCR-RFLP analízis és a valós idejű (real-time) PCR technika, köztudott, hogy lehetővé teszik a kis gyakorisággal előforduló mutáció kimutatását is. Eredményeink alapján azonban elmondható, hogy azoxystrobin hiányában növesztett tenyészetekből izolált genomban a G143A pontmutáció kimutathatatlan volt. Ez azt jelenti, hogy a heteroplazmia szintje 0%-on állapítható meg. Ugyanazon *Botrytis cinerea* törzs esetében mindössze 15 napig tartó fungicides kezelés hatására a mutáns mitokondriumok aránya elérte a közel 58%-ot. Ez a megállapítás nehezítheti a molekuláris biológiai eljárások mezőgazdasági gyakorlatban való alkalmazását, mivel kizárja azt, hogy a gazdák teljes biztonsággal elkötelezhessék magukat valamely növényvédelmi stratégia mellett.

Vizsgálataink alap kutatás szinten állnak és még számos kérdés megválaszolása várat magára. Célravezető lenne például a továbbiakban megállapítani a heteroplazmiának azt a szintjét, mely egyértelműen fenotípusos változást okoz és azt az időt, ami ennek a szintnek az eléréséhez szükséges. Ezek az információk különösen fontosak azokban a régiókban, ahol már fennáll vagy fennállt a QoI rezisztencia jelensége. Ezeken a területeken mindenképpen kerülni kell az egyoldalú szerhasználatot, hiszen az elősegíti a rezisztens törzsek nagymértékű, gyors elszaporodását. Segíthet a megfelelő gazdálkodási gyakorlat, például a vetésforgó alkalmazása rezisztens kultúrákkal. Feltételezhető ugyanis, hogy a mutáció csökkenti a patogén fitneszt, tehát csak fungicid jelenlétében jelent szelekciós előnyt. Továbbá igazolták a lisztharmat kórokozójának strobilurin (QoI) rezisztencia vizsgálata során, hogy rezisztens törzsek ismét szenzitívvé váltak a fungicid hiányában (FRAAIJE et al., 2002). Azonban a G143A mutáció eltűnésének valószínűsége egyik évről a másikra kicsi, így számítani kell a heteroplazmikus gomba populáció jelenlétére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkánk célja volt, hogy a széles gazdanövény körű, minden évben jelentős gazdasági kárt okozó *Botrytis cinerea* gomba fungicid-rezisztenciájának in vitro tanulmányozásával új ismeretekhez jussunk. A vizsgálatainkhoz szükséges négy törzset 2008 és 2009 köztött, Nagyréde térségében szürkerothadásos szamóca- és málnaszemekről, levélről, illetve repceszárról izolált 160 *Botrytis cinerea* egyspórás izolátum közül választottuk ki. Ezek a törzsek az előzetes vizsgálatokban szenzitívnek bizonyultak az azoxystrobinnal történő kezeléssel szemben, ugyanakkor a G143A mutáció kimutatására alkalmas BcAR primerpárral végzett PCR reakció során pozitív eredményt adtak és nem tartalmazták az 1205 bp hosszúságú nagy intront a CYTB gén 143-as kodonja után.

Célunk volt, hogy kifejlesszünk egy, a heteroplazmia követésére alkalmas módszert valós idejű (real-time) PCR segítségével, valamint kerestük a választ a következő kérdésekre: Létezik-e egyértelmű összefüggés a QoI rezisztencia és a CYTB-ben leírt mutáció között a magyarországi *Botrytis cinerea* populációkban? A heteroplazmia mértéke hogyan befolyásolja a rezisztencia szintjét? Első lépésként a törzseket egyre növekvő azoxystrobin koncentrációjú táptalajokon növesztettük és meghatároztuk a micéliális növekedésgátlás értékeit. Ezt követően a fungicides kezelés hatására létrejött genetikai változásokat vizsgáltuk PCR-RFLP analízis és a valós idejű (real-time) PCR technika segítségével. Az általunk alkalmazott molekuláris biológia módszerek alkalmasak kis gyakorisággal előforduló mitokondriális mutációk kimutatására.

A valós idejű (real-time) PCR reakciókörülményeinek optimalizálásával és megfelelő kontrol minták választásával sikerült kifejlesztenünk a heteroplazmia meghatározására és számszerűsítésére alkalmas módszert. Ki tudtuk mutatni a heteroplazmia mértékének változását a fungiciddel történő kezelés hatására, tehát bebizonyítottuk, hogy azoxystrobin jelenlétében a rezisztenciát hordozó mitokondriális genom aránya megnő a szenzitív hatóhelyet kódoló szekvenciával szemben. Ugyanakkor az azoxystrobin hiányában növesztett tenyészetekből izolált genomban a G143A pontmutáció nem volt kimutatható.

IRODALOMJEGYZÉK

Anke T, Oberwinkler F, Steglich W, Schramm, G (1977) Strobilurins–New antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. J Antibiot 30:806-810

Asadollahi M., Fekete É., Fekete E., Karaffa L., Irinyi L., Sándor E. (2010): Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokróm b génjének diverzitása. Agrártudományi Közlemények, 2010/39. KÜLÖNSZÁM 18-21.

Avila-Adame C, Köller W (2003) Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qoinhibiting fungicide azoxystrobin. Curr Genet 42:332-338

Balba H (2007) Review of strobilurin fungicide chemicals. J Environ Sci Health Part B 42:441-451

Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, K., Uekusa, H., Takagaki, M., Kimura, M., Fujimura, M. (2009): Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. Plant Pathol 58:120–129.

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr- Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. Pest Manag Sci 58:649-662

Colney-Smith, J. R., Verhoeff, K., Jarvis, W. R. (1980): The biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK.

Esser L, Quinn B, Li Y-F, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu C-A, Xia D (2004) Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome *bc1* complex. J Mol Biol 341: 281-302

- Fernández-Ortuño, D. – Torés, J.A.- de Vicente, A. - Pérez-García, A. (2008): Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int Microbiol* 11: 1-9.
- Foury, F. - Roganti, T. - Lecrenier, N. – Purnelle, B. (1998): The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* 440 325–331.
- Fraaije BA, Burnett FJ, Clark WS, Motteram J, Lucas JA (2005) Resistance development to QoI inhibitors in populations of *Mycosphaerella graminicola* in the UK. In: Dehne H-W, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H (eds) *Modern fungicides and anti-fungal compounds IV*. BCPC, Alton, pp 63-71
- Fraaije BA, Butters JA, Coelho JM, Jones DR, Hollomon DW (2002) Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol* 51:45-54
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci* 58:859-867
- Heaney (2000) *Proceedings of the Brighton Conference–Pests and Diseases*, BCPC, Farnham, pp 755-762
- James, W. C. (1974) Assessment of plant diseases and losses. *Ann. Rev. Phytopathology* 12: 27-48.
- Jarvis, W. R. (1977): *Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity*. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada
- Jiang, J., Ding L., Michailides, T. J., Li, H., Maa Z. (2009): Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 72–76.

Khon, L. M. (1979) A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon 9: 365-444.

Kraiczky P, Haase V, Gencic S, Flindt S, Anke T, Brandt V, Von Jagow G (1996) The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome *bc1* complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qo inhibitors. Eur J Biochem 235:54-63

Lázár, J., Dula, B., Voigt, E., Szendrey, L., Makó, Sz. (2004): A szőlő védelme I. Növényvédelem, 40: 193-206.

Lessemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB (2007) Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome *b* gene controls the levels of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. J Plant Dis Protect 113:259-266

Markoglou AN, Malandrakis AA, Vitoratos AG, Ziogas BN (2006) Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. Eur J Plant Pathol 115:149-162

Scholtz B.: Kvantitatív PCR. In: Molekuláris biológiai módszerek (Egyetemi jegyzet) 2004. Szerk. Dombrádi V. Debrecen: Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum 65-79 p.

Sierotzki H, Frey R, Wullschleger J, Palermo S, Karlin S, Godwin J, Gisi U (2006) Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. Pest Manag Sci 63:225-233

Staats, M., van Baarlen, P., and van Kan, J. A. L. (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. Mol. Biol. Evol. 22: 333-346.

Stakman, E. C. (1959) The role of plant pathology in the scientific and social development of the world. pp. 3-13 In: Holton, C. S., Fischer, G. W., Fulton, R. W., Hart, H., McCallan, S. E.

szerk. Plant pathology: Problems and progress 1908-1958. University of Wisconsin Press, Madison.

Taylor, D. R., C. Zeyl, E. Cooke, (2002): Conflicting levels of selection in the accumulation of mitochondrial defect in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. 99, 3690-3694

Wood PM, Hollomon DW (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. Pest Manag Sci 59:499-511

Internetes hivatkozások:

I1: <http://mrns.hu/index.php?page=content/hirek.php&nid=133> 2011. 10. 02. 09.20. h

I2: FRAC: Pathogen risk list

(http://www.frac.info/frac/publication/ahang/FRAC_Pathogen_risk%20list.pdf)

I3: <http://www.sci.muni.cz/botany/systemgr/index.php?show=molekular&res=1600> 2011. 10. 08. 15.32 h

Függelék

1. NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) protokoll

Az izolálás megkezdése, a termoszhakert 65°C-ra kell beállítani.

Az elúció előtt a nukleáz mentes vizet fel kell melegíteni 70°C-ra.

Sejt lízise PL1 pufferrel

- Kerámiagyöngyöket tartalmazó csövekbe 400 µl PL1 puffert mérünk (Roche Magyarország Kft.).
- A minták homogenizálása MagNaLyser készülékben 90 sec 5.000 rpm-en .
- A homogenizátumokhoz 10 µl RNase A oldat adása, majd keverés vortexel .
- A lizátumokat 10 percig 65°C-on termoszhakerben inkubáljuk.

Homogenizátum tisztítása a Nucleospin oszlopon (lila gyűrűvel)

- NucleoSpin oszlopot gyűjtőcsőbe helyezzük és a feltárt mintákat felvisszük az oszlopra.
- Centrifugálás 2 percig 11000 x g-n. A tiszta alulúszó összegyűjtése. (A NucleoSpin oszlopot nem használjuk tovább - kidobása.)
- Az alulúszókat tiszta, 450 µl PC puffert tartalmazó eppendorf csövekbe mérjük majd vortexel összekeverjük..

DNS megkötése a Nucleospin szilika membránon (zöld gyűrűvel)

- NucleoSpin Plant II oszlopot (zöld gyűrűs) új gyűjtőcsőbe helyezzük, és a mintákat az oszlopra pipettázzuk.
- A mintákat 1 percig 11000 x g-n centrifugáljuk, majd eldobjuk az alulúszót, az oszlopot pedig visszatesszük a gyűjtőcsőbe.

A szilika membrán mosása:

- 400 µl PW1 mosó puffert pipettázunk az oszlopra.
- Centrifugálás 1 percig 11000 x g-n, majd az alulúszót eldobjuk.

A szilika membrán mosása és szárítása:

1. mosás:

- 700 µl PW2 puffert pipetázunk az oszlopra.
- Centrifugálás 1 percig 11000 x g-n, az alulúszót leöntjük.

2. mosás:

- megismételjük az előző lépést 200 µl PW2 pufferrel.
- A szilika membrán szárítása, hogy a maradék etanol elpárologjon az oszlopról.

Nagy tisztaságú DNS eluálása

- Az oszlopot egy új 1.5 ml-es centrifugacsőbe helyezzük.
- 50µl 70°C-os nukleáz mentes vizet pipetázunk az oszlopra.
- Az oszlopot 5 percig 70°C -on inkubáljuk termoshakerben.
- Centrifugálás 1 percig 11000 x g-n, (DNS eluálása).
- Az utolsó lépés megismételhető újabb 50 µl nukleáz mentes vízzel.
- DNS tárolása -20 °C-on.

2. A CYTB gén szekvenciája, az exonok és a primerek pontos elhelyezkedésével

>gil109287742|dbj|AB262969.1| Botryotinia fuckeliana mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds

```
TTTTTTTTTTTTTTATTTCTCTTTCTAGCCTAAGTTACTTCAGGTAAGTTAGCTTTTTTGTGCTGCTA
GGCAGCAAGAGTTATCTTTGTTTATTATCCTGTATGTGGTTAAGTTAACTTAGTTGTTATAAAATAAT
TGACCGAATGGTGGGATCAATATTCTAAATTTGTTTTCTACCTATTAGATGCTTATAAAAGATATATT
AATAGATCTTTTCTGTGCCCTTTCCCTGCTAAGCAGGGAAAGGGCAATACCTAAAAATTAGGGGAGAA
GTGTTATATTAGCTTAATTAAGCTAATATAACTTAAAGCCCGTTTATATAAACGAATTAATGTTTAAAG
ACTTTCACGCTTGCACAAGAAATATAGTTTAAACTACTAGAGAACTTATATATTAAATAATTTTACCC
TTTAACTTCTAGAAAAAAAATATTAATAAAATTTTAATTATAAAATGAGAATTTTTTAAAGTCATC
CCTTATTAAATTTGGTTAACTCTTATATGATCGATTACCACAACCAAGTAACCTAAGTTATTTATGA
AATTTTGGTTCTTTTATTAGCTGTTTGTGTTAGTTATACAAATAATCACAGGTGTAAGTTTAGCAATGCA
CTACAACCTAGTGTATTAGAAGCCTTTAACTCTGTAGAGCATATGGCATAATGTGCTCTTTAAATCA
GGTTAATTGCTGGAAAACCTTTGTTAAGGCAATCAGCAGGAAACCTACGGATATATTTTATACATAGT
AGGATCTTCAGAGGCTATACGCCTGACATCTGATTTAAGTTTAAATATAGATGATGATATAGTCCATC
CTCTACTGTAAAGTAGAGTAGTTTAGATTAGCTATCTATCCCCCTTTTGAGGGCATAACTTTATCATTG
TTTATTTTTGTACCGGGTTATAAAAATAAAATGGGGTTTCGTAAGTTTACAAGTTATTTAAGTAAAAA
CTCTGCGGCCTTCGGTTTCAGTAAGTGACCACTTTACAAATAAAGACTTTTTATTTTGTATTTAGTGGAT
TTACTGATGCTGAAGGTAATTTTTTAGTTACAATAGACCGTAAATATGTTAAATTAAGATTTAAAAATA
AGTTTGCATATTGACGATATAGAAGTACTTTATACCATTAAATCTAACTTAGGTTTTGGTAGAGTTGT
AGAAGAATACAACAGAAACAGCTGTTCTTTTATTGTGGAAGATTTTTTAAGTATAAGTAAGTTATGTG
ATATTTTTTAATCATTATCCACTTCATACTAGTAAAAAGTTAGACTTCATTAGTTTTTATGAGGTTTCA
CTTATAAAATCCACTAATAAAGTCTTGTCTGAGGTAGATATAAATAAAATTTGTATCTATTAAAAACAC
TATGAATTCTAAGAGAGAAGTGTTACATATGGTATTTTCGGAATCTCAAATTACAATAAACCCAAATT
GGTTTGTAGGGTTTATAGAAGGTGAAGGTACCTTCGGTATTAAACAGGGTCTTCTTTGTATTTCCAA
GTAGCACAGAAAAATACTAGTCTAGATTGTTTAAATGCTATAACAAAATTTTTGTTAGACTTGTCTAG
TAATGCTGCAATACATAAAGATCCTTATAATAAAATACTACCTATAAACGTTACAAATACGATTAATA
TAAGAAGTAGTGTAGTATCTTTAGCAATAGCTAACACAGATGCTTTATTTTATTACCTGTTACCATAT
TTAGATTCTATCTAAATTTTACTCTCGTAAAGCGATAGATTTAAATTTATGAAGAATGGCTTTATTACT
GAAGGTTTATGGGTATTACTATACAGTAGAAGGTAAGAATTTATTTTATAGATATTTTACAGAAATTTTA
ATAAAAGATATAGTACAAATTCATCTGTAAAGCGACATTAATAATGTTATTAAGAATATAACTGAAAAA
TTTAATGATATTATGCAAAAGGATTCTCCTTTTGATGTAAACTTTAACCAACGACACACAGAAAAATGT
GCGTAAGTATAGTATAGCCAATAAGTCTGATAGTTCTAAGGTTGTTTATATATATGATGGTAATAAAA
TGGTGCATGGGTCGCCTTTTGCTTCATTACAGTATGGCGCATAAAGCATTGGGGCTAAACCCTAGTAGT
AATACTTGTAATCGTTATATTGATACAAAATAGACTTTTATAAAAGTAAATATATTTTACATCTAAGCC
CATAGATAGAGCGTCTAGGGATTAGACCATAGTAGATAGCAATTTGGAATAGGCTCAGTCGAGCAGAG
TTTGATTATGCGTGATGTTAACAATGGATGATTAATACGTTACTTACACAGTAACACAGCTTCAGCTT
TTTTTTTTTATAGTATATTTACACATAGGAAGAGGTTTATATTATGGATCATACAGAGCTCCTAGAACA
TTAGTTTGAACAATAGGTGTAGTTATATTATTAATGATAGTTACAGCTTTCTTGGGTATAAACA
TAGCCCCAAATGGTTTAAATATAAATAATAAAGGAAATACAATAAAGTATAACAAAGTAAATAGTAATA
AACTGTTTAAACAAAAGTAGAGTCAAAAGGGGATATTGTACAAGTTGTGATTCAAATAGTACTAAAGTT
TCAGAAAGTTTAAAGCACAGTAATTAGTGAATTAGGTTTAAACCCCTATATATTTATATGAAAATTTAAA
CTTAGAAAATACTAGAAAACAAGTATTTAAAGACACAAGAGGTTTAAAGTGAATATATATGATAGTTA
ATAAAACAATAAAGATTATTATATAGGTTCTGCATCAACTAATAGATTTTTATGCTAGATTTTGTAAAC
CATCTTATCTATTTTAGAGGTAGCAAAATAGTTAAATTAGCCGTTAAAAAGTATGATTTAAAAAATTT
TGCTTTCCTTATACTAGATTTATATCCTAATGTTGTTACCCAAGGTAATAATAAGGAATTAATGGATT
TAGAAGATAAAATTTTTAAATTTATTAGTGCCTAATTACAATATTTTAAACCGAAGCAGGTTCTAGTTTT
GGTTACAAACACACTGAAGTAGATCGAAAATAAGATGAAAGATATTTATAGTGACGCCAGACGGGAGAG
AATTGGTAATCTAAATAAGGGTAAAAAGCTTTCACCTGAAACAATAGAAAGAATCAGGGAAAAAGCTT
TAATTAGACCAGCCATGTCTGAAGAACTAAAAGTAAAGTGATAACTAATACAAGACCTGTTGTGTTG
TATAACTTAAATAGAAGTGTTCACGAAAAATATTCGACTATTTTAGAAGCAGCTAAGGCCATAGACTG
```

TAGTGAAAAAACTATTAGAAGGGCACTACAAACAGAAAAAAATTAGTTAAAAGACAATGGATAGTAG
 AAGATTTATGTGATAAATAGGTTGGTATAAACTTCTTGTTAATAGTTGTTTCTAGACTAGATTACTTG
 TGCTTTGCTTTGCTTTGCTAGATGTAACCCAGAAAAATTTACTTTATCTTTATTATATATAAATCAT
 AGTCCCATGAGTAACAATCTTTTTGTAAATTTTTATAGAAAAAAAAGAT**TAAAGTGGTATAACCCGAC**
GGGGTTATAGAATAGTCTTTTCAGATTATTTGGCGATATTAGTGTAACGATCAAAGAAGTTTTATAAG
 CTTTATAGATCGTCGGCCATATAAAAGGTCGCGACAGACTGGGTCACATAATGGGTGTCTGAAATGATGC
 TTAATGTACAGGCGGAACTTTTAGTTAAATTAATTTAATTTAACTAATAAGATAAACAATTTAAAGT
 TATTCTAGCTTATTCTACAGATTAAATTTATAATTAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTA
TGTTCTGCCCTACGGGCAATGTCACTGTGAGGTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTAC
CATGAATTGGACAAGATATTGTTGAGTCAAACAACACAAATATATATTTAACAACAGATTGTTTAAAG
 ATGCTACCTCTAATAGGTACTGTACATAAAAAATGCCATTAATAAATTGCAAAATACTTTTAAACCAGA
 CAATAATGAATATCTTTCTATACCATCATCTTTTATAGCTTTTTTTGT**AGGTATGGTGGATGGAGATG**
GTTATATTCAAATAACCAGAACATCTAAAGGATTTATAGCTATGAAGCTAGTAATATCCTTACAGATA
 GAGGATGTTTCTACTCTAGAGTATATACATTCAGTTTTTAAAGTCGGAAAAATCAATATATACCGTGA
 TAACAGAAATCCTAGTTGTAAATTAGTCATCAATAGAAGTGAATTTACAACAAATTGTATTCCTTTAC
 TTTTATATCACAAATTTTTTTTTTTAACTGATACTAGAAAAGAACAGTTTGATTTAGCCATACACATC
 TTAGAACAAGATATAAAAAACTTTTCATGAGATAGGTAATAGGAAAGATCTGCCTTCTGTTTTTACATT
 ACCAAAAACAGCGTTAGACTACACTAATTTGTTTTTTTTTAAAAATTGATTAGTGGGGTTCACAATGG
 CTGAAGGTTCTTTTTTTATGAAAAAGAATAATGATGGTTGTTTCCAATTAAAGCAGAGAGTACATACA
 AATTTATTTGAAGCTTTTAAATTGGTATTTAATACAAC TAGAAAAATAGAAGTAGTAGAAGGATTATA
 TAATCAATTTGGAGTTAGTTCTAAGGCCGACGTACAAAGAGTTATAGATTTCTTTTCATTTTCAGGTG
 TACATCCCTTAGTTGGTTTAAAGGGTATTCAATATATGCAATGGTTAAATTTATTACGTAATAACAAT
 CGTTATAAAAAATCTTAATTTACCTGAACTGTAATATAGTTTACTTGTTTCATGTAATATATTTTTAA
 CTTAAATGTTTTAAGTTGTAGATAATTTGTGAAGGCTCCTTGAAACAGTAATGTTTCAAAGGCAAATG
 GGCTTAATTGCAAGGACATCTAATAAAATTTCTCCTGTTTATTAGATCATTGTCAGCGAAGTTTGATT
 CGGTATACATTATATTCTTAATATATATTATATATTATTAATATAAGGGAATCAAGAACGTTCAACGA
 CTAATGAGTGAGTAGTACCAACAATAAGCTCGACACGAATGCCCTACAACCAACAAGGACTTGTTTG
 GTTGAAGACATAGTCTAAACATCTAGGTAAACAGATGAAAAGGATATTAAATTATCCTTTATTAATATA
 TTG**TTTTATGAGGAGGTTTCTCTGTTAATAACGCAACTTTAAACAGATTCTTTGCTTTACACTTTGTA**
TTACCTTTTCGTTTTAGCGGCTTTAGCTTTAATGCATTTAATTGCACCTTCACGATAGTGCAGGTTCTGG
TAACCCTTTAGGTATATCAGGTAACATGATAGGTTAGCTTTTGCTCCTTATTTCTTATTTAAAGATT
TAATAACTATATTTTTATTTATAATAATATTAAGTATATTTGTATTCTTTATGCCTAACGTATTAGGA
GATAGTGATAATTATATAATGGCTAATCCAATGCAACACCACCAGCTATAGTTCCGGAATGATACCT
ACTTCCATTCTATGCTATACTAAGATCTATACCTAATAAACTATTAGGTGTTATTGCTATGTAAAGTG
CTATTTTAATACTATTAGCTATGCCTTTTACTGATTTAAGTAGAAGTAGAGGTATACAATTTAGACCT
TTAAGTAAAATAGCTTTCTATATCTTTATTGCTAACTTCTTAATATTAATGGTATTAGGAGCTAAACA
CGTTGAGTCTCCATATATAGAATTTGGACAAATAAGTACAGTTATTTATTTTGCCATTTCTTAATTA
TAGTGCCTTTTATTAGTTTACTAGAAAATAGTTTAGTAGAATTAGCAGTATTAACATAAGAAAAGCCT
AGTAGATAAAATAGATAAATTACATTTATTTTTAACTGGTTGCTAAGGAAGTTAAATAGATAAATTAT
 ATTTATTTTAAATCGGTCTTCCTATAGGTTTAAATAACTATAAACGCTACTGGTATCTCGGATTTAAATC
 TTGATTTTTTAGTATTATAGCTAATTTAATAAAAGATGGTATAAATATTACACCTGCTGTAGTTGTAA
 GAGTAATTACAGTGTTTACC

Az exonok kék színnel vannak jelölve

A primerek:

cytb-BcF: 5' – TAAAGTGGTATAACCCGACGG – 3'

cytb-BcR: 5' – CCATCTCCATCCACCATACCT – 3'

3. PCR termék tisztítása Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Rendszerrel

- A PCR termékkel megegyező mennyiségű Membrane Binding Solution-t pipettázunk a PCR csövekbe.
- Az oszlopokat gyűjtőcsövekbe helyezzük.
- A mintákat az oszlopokra pipettázzuk, majd 1 percig inkubáljuk.
- Centrifugálás 16, 000 x g-n 1 percig, majd az alulúszót eldobjuk.
- 700 µl mosó oldatot pipettázunk az oszlopokra, melyhez előzőleg etanolt adtunk a gyártó utasítása szerint. Centrifugálás 16, 000 x g-n 1 percig, majd ismét eldobjuk az alulúszót.
- Az előző lépést megismétlése 500 µl Membrane Wash Solution-nal. A centrifugálás 16, 000 x g-n 5 percig, az alulúszót eldobjuk.
- Az oszlopokat visszahelyezzük a gyűjtőcsövekbe, majd egy percig centrifugáljuk, hogy a maradék etanol elpárologjon a membránról.
- Óvatosan áthelyezzük az oszlopokat 1.5 ml-es tiszta eppendorf csövekbe, majd 40 µl nukleáz mentes vizet pipettázunk a membránra. A minták inkubálása 1 percig, majd centrifugálás (16. 000xg, 1 perc). Végezetül eldobjuk a membránt.
- A tiszta PCR terméket -20 °C-on tároljuk.

4. *B. cinerea* COX1 gene

>gil5825128|embl|AL110841.1| Botrytis cinerea strain T4 cDNA library

CTGATT**CTTCGGTCATCCAGAGGTC**TACATATTAATTATACCAGGGTTTGGTATAATAAGTA
CTGTAATATCAGCTAGTTCTAATAAGAGCGTTTTTCGGTTATCTTGGTATGGTCTACGCCATG
ATGTCGATAGGTGTATTAGGATTTGTTGTTTGAAGTCATCACATGTACACAGTTGGTTTAGA
TGTAGATAACAAGAGCATATTTTACAG**CGGCTACTTTAATAATTGCTGT**ACCTACGGGAATTA
AAATTTTCTCTTGATTGGCTACATGTTACGGAGGATCTTTACAATTAACCTCCTTCAATGTTA
TTTGCTTTAGGTTTTGTTTTTCATGTTTACAATCGGAGGGTTAAGTGGTGTGTTTTAGCGAA
CGCATCTCTTGATATTGCATTCCACGATACTTACTATGTGGTTGCTCATTTCCTACTACGTTN
TAAGTATGGGAGCAGTATTTGCATTATATAGTGCATGATACTTCTGAATACCTAAAATACTA
GGTTTAGATTATAATAAAATGTTGGGTAAAGCGCATTCTGAATTTTATTTATAGGGGTAA
TGTAACATTCTTCCCTCAACATTTCTTAGGTCTGCAAGGAATGCCACGTCGAATAAGTGATT
ACCCCGATGCATTTGC

Primerek:

BcCOX1-F: 5' - CTTCGGTCATCCAGAGGTC - 3' 19 mer

BcCOX1-R: 5' - ACAGCAATTATTAAAGTAGCCG - 3' 22 mer

Termék hossza: 228 bp

T_m BcCOX1-F: 62,4 °C

T_m BcCOX1-R: 58,9 °C

5. A CYTB gén szekvenciája, az exonok, a primerek és a pontmutáció pontos elhelyezkedésével

>gil109287742|dbj|AB262969.1| Botryotinia fuckeliana mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds

TTTTTTTTTTTTTTATTTCTCTTTCTAGCCTAAGTTACTTCAGGTAAGTTAGCTTTTTTGTGCTGCTA
GGCAGCAAGAGTTATCTTTGTTTATTATCCTGTATGTGGTTAAGTTAACTTAGTTGTTATAAAATAAT
TGACCGAATGGTGGGATCAATATTCTAAATTTGTTTTCTACCTATTAGATGCTTATAAAAGATATATT
AATAGATCTTTTCTGTGCCCTTTCCCTGCTAAGCAGGGAAAGGGCAATACCTAAAAATTAGGGGAGAA
GTGTTATATTAGCTTAATTAAGCTAATATAACTTAAAGCCCGTTTATATAAACGAATTAATGTTTAAAG
ACTTTCACGCTTGCACAAGAAATATAGTTTAAACTACTAGAGAACTTATATATTAAATAATTTTACCC
TTTAACTTCTAGAAAAAAAATATTAATAAAATTTTAATTATAAAATGAGAATTTTTTAAAAGTCATC
CCTTATTAAAAATTGGTTAACTCTTATATGATCGATTACCACAACCAAGTAACCTAAGTTATTTATGA
AATTTTGGTTCTTTATTAGCTGTTTGTGTTAGTTATACAAATAATCACAGGTGTAACCTTAGCAATGCA
CTACAACCTAGTGTATTAGAAGCCTTTAACTCTGTAGAGCATATGGCATAATGTGCTCTTTAAATCA
GGTTAATTGCTGGAAAACCTTTGTTAAGGCAATCAGCAGGAAACCTACGGATATATTTTATACATAGT
AGGATCTTCAGAGGCTATACGCCTGACATCTGATTTAAGTTTAAATATAGATGATGATATAGTCCATC
CTCTACTGTAAAGTAGAGTAGTTTAGATTAGCTATCTATCCCCTTTTGAGGGCATAACTTTATCATTG
TTTATTTTTGTACCGGGTTATAAAAATAAAATGGGGTTTCGTAACCTTACAACCTTATTTAAGTAAAAA
CTCTGCGGCCTTCGGTTTCAGTAAGTGACCCTTTACAAATAAAGACTTTTTATTTTGATTTAGTGGAT
TTACTGATGCTGAAGGTAATTTTTTAGTTACAATAGACCGTAAATATGTTAAATTAAGATTTAAAAATA
AGTTTGCATATTGACGATATAGAAGTACTTTATACCATTAAATCTAACTTAGGTTTTGGTAGAGTTGT
AGAAGAATACAACAGAAACAGCTGTTCTTTTATTGTGCAAGATTTTTTAAAGTATAAGTAAGTTATGTG
ATATTTTTTAATCATTATCCACTTCATACTAGTAAAAAGTTAGACTTCATTAGTTTTTATGAGGTTTCA
CTTATAAAATCCACTAATAAAGTCTTGTCTGAGGTAGATATAAATAAAATTGTATCTATTA AAAACAC
TATGAATTCTAAGAGAGAAGTGTTTACATATGGTATTTTCGGAATCTCAAATTACAATAAACCCAAATT
GGTTTGTAGGGTTTATAGAAGGTGAAGGTACCTTCGGTATTTAAACAGGGTCTTCTTTGTATTTCCAA
GTAGCACAGAAAAATACTAGTCTAGATTGTTTAAATGCTATAACAAAATTTTTGTTAGACTTGTCTAG
TAATGCTGCAATACATAAAGATCCTTATAATAAAATACTACCTATAAACGTTACAAATACGATTAATA
TAAGAACTAGTGTAGTATCTTTAGCAATAGCTAACACAGATGCTTTATTTTATTACCTGTTACCATAT
TTAGATTCATCTAAATTTTACTCTCGTAAAGCGATAGATTTAAAATTATGAAGAATGGCTTTATTACT
GAAGGTTTATGGGTATTACTATACAGTAGAAGGTAAGAATTTATTTTATAGATATTTTACAGAAATCTTA
ATAAAAGATATAGTACAAATTCATCTGTAAAGCGACATTAATAATGTTATTAAGAATATAACTGAAAAA
TTTAAATGATATTATGCAAAAGGATTCTCCTTTTGATGTAAACTTAAACCAACGACACACAGAAAAATGT
GCGTAAGTATAGTATAGCCAATAAGTCTGATAGTTCTAAGGTTGTTTATATATATGATGGTAATAAAAA
TGGTGCATGGGTCGCCTTTTGCTTCATTACAGTATGGCGCATAAAGCATTGGGGCTAAACCCTAGTAGT
AATACTTGTAATCGTTATATTGATACAAAAGACTTTTATAAAAGTAAATATATTTTACATCTAAGCC
CATAGATAGAGCGTCTAGGGATTAGACCATAGTAGATAGCAATTTGGAATAGGCTCAGTCGAGCAGAG
TTTGATTATGCGTGATGTTAACAATGGATGATTAATACGTTACTTACACAGTAACACAGCTTCAGCTT
TTTTTTTTTATAGTATATTTTACACATAGGAAGAGGTTTATATTATGGATCATAACAGAGCTCCTAGAACA
TTAGTTTGAACAATAGGTGTAGTTATATTTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTCTTGCGTTATAAACA
TAGCCCCAAATGGTTTAAATATAAATAATAAAGGAAATACAATAAAGTATAACAAAGTAAATAGTAATA
AACTGTTTAAACAAAGTAGAGTCAAAAGGGGATATTGTACAAGTTGTGATTCAAATAGTACTAAAGTT
TCAGAAAGTTTAAAGCACAGTAATTAGTGAATTAGGTTTAAACCCCTATATATTTATATGAAAATTTAAA
CTTAGAAAATACTAGAAAACAAGTATTAAGACACAAGAGGTTTAAAGTGAATATATATGATAGTTA
ATAAAACAATAAGATTATTATATAGGTTCTGCATCAACTAATAGATTTTATGCTAGATTTTGTAAAC
CATCTTATCTATTTTAGAGGTAGCAAAATAGTTAAATTAGCCGTTAAAAAGTATGATTTAAAAAATTT
TGCTTTCCTTATACTAGATTTATATCCTAATGTTGTTACCCAAGGTAATAATAAGGAATTAATGGATT
TAGAAGATAAAATTTTAAATTTATTAGTGCCTAATTACAATTTTTTAACCGAAGCAGGTTCTAGTTTT
GGTTACAAACACACTGAAGTAGATCGAAAATAAGATGAAAGATATTTATAGTGACGCCAGACGGGAGAG
AATTGGTAATCTAAATAAGGGTAAAAAGCTTTCACCTGAAACAATAGAAAGAATCAGGGAAGAAAGCTT
TAATTAGACCAGCCATGTCTGAAGAACTAAAAGTAAGTGTATAACTAATACAAGACCTGTTGTGTTG

TATAACTTAAATAGAACTGTTTACGGAAAAATATTCGACTATTTTAGAAGCAGCTAAGGCCATAGACTG
TAGTGAAAAAACTATTAGAAGGGCACTACAAACAGAAAAAAATTAGTTAAAAGACAATGGATAGTAG
AAGATTTATGTGATAAATAGGTTGGTATAAACTTCTTGTTAATAGTTGTTTCTAGACTAGATTACTTG
TGCTTTGCTTTGCTTTGCTAGATGTAACCCAGAAAAATTTACTTTATCTTTATTATATATAAATCAT
AGTCCCATGAGTAACAATCTTTTTGTAATTTTTATAGAAAAAAAAGATTAAAGTGGTATAACCCGAC
GGGTTATAGAATAGTCTTTTCTAGATTATTTGGCGATATTAGTGTAACGATCAAAGAAGTTTTATAAG
CTTTTAGATCGTCGGCCATATAAAAGGTCGCGACAGACTGGGTCCTAATGGGTGTCTGAAATGATGC
TTAATGTACAGGCGGAACTTTTAGTTAAATTAATTTAATTTAACTAATAGAATAAACGAATTTAAAGT
TATTCTAGCTTATTCTACAGATTAAATTTATAATTAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTA
TGTTCTGCCCTACGGGCAAATGTC**ACTGTGAGC****TGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTAC**
CATGAATTGGACAAGATATTGTTGAGTCAAACAACACAAATATATATTTAACACAGATTGTTTAAAG
ATGCTACCTCTAATAGGTACTGTACATAAAAAATGCCATTAAAAAATTGCAAAATACTTTTAAACCAGA
CAATAATGAATATCTTTCTATACCATCATCTTTTATAGCTTTTTTTGT**AGGTATGGTGGATGGAGATG**
GTTATATTCAAATAACCAGAACATCTAAAGGATTTATAGCTATGAAGCTAGTAATATCCTTACAGATA
GAGGATGTTTCTACTCTAGAGTATATACATTCAGTTTTTAAAGTCGGAAAAATCAATATATACCGTGA
TAACAGAAATCCTAGTTGTAAATTAGTCATCAATAGAAGCTGATTTACAACAAATTGTATTCCTTTAC
TTTTATATCACAAATATTTTTTTTTTAACTGATACTAGAAAAGAACAGTTTGATTTAGCCATACACATC
TTAGAACAAGATATAAAAAACTTTTCATGAGATAGGTAATAGGAAAGATCTGCCTTCTGTTTTTACATT
ACCAAAAACAGCGTTAGACTACACTAATTTGTTTTTTTTTAAAAATTGATTAGTGGGGTTCACAATGG
CTGAAGGTTCTTTTTTTATGAAAAAGAATAATGATGGTTGTTTCCAATTAAAGCAGAGAGTACATACA
AATTTATTTGAAGCTTTTAAATTGGTATTTAATACAACCTAGAAAAATAGAAGTAGTAGAAGGATTATA
TAATCAATTTGGAGTTAGTTCTAAGGCCGACGTACAAAGAGTTATAGATTTCTTTTCATTTTCAGGTG
TACATCCCTTAGTTGGTTTAAAGGGTATTCAATATATGCAATGGTTAAATTTATTACGTAATAACAAT
CGTTATAAAAAATCTTAATTTACCTGAACTGTAATATAGTTTACTTGTTTCATGTAATATATTTTTTAA
CTTAAATGTTTTAAGTTGTAGATAATTTGTGAAGGCTCCTTGAAACAGTAATGTTTCAAAGGCAAATG
GGCTTAATTGCAAGGACATCTAATAAAATTTCTCCTGTTTATTAGATCATTGTCAGCGAAGTTTGATT
CGGTATACATTATATTCTTAATATATATTATATATTATTAATATAAGGGAATCAAGAACGTTCAACGA
CTAATGAGTGAGTAGTACCAACAATAAGCTCGACACGAATGCCCTACAACCAACAAGGACTTGTTTG
GTTGAAGACATAGTCTAAACATCTAGGTAAACAGATGAAAAGGATATTAAATTATCCTTTATTAATATA
TTG**TTTTATGAGGAGGTTTCTCTGTTAATAACGCAACTTTAAACAGATTCTTTGCTTTACACTTTGTA**
TTACCTTTTCGTTTTAGCGGCTTTAGCTTTAATGCATTTAATTGCACCTTCACGATAGTGCAGGTTCTGG
TAACCCTTTAGGTATATCAGGTAACCTATGATAGGTTAGCTTTTGCTCCTTATTTCTTATTTAAAGATT
TAATAACTATATTTTTATTTATAATAATATTAAGTATATTTGTATTCTTTATGCCTAACGTATTAGGA
GATAGTGATAATTATATAATGGCTAATCCAATGCAACACCACCAGCTATAGTTCCGGAATGATACCT
ACTTCCATTCTATGCTATACTAAGATCTATACCTAATAAACTATTAGGTGTTATTGCTATGTTAAGTG
CTATTTTAATACTATTAGCTATGCCTTTTACTGATTTAAGTAGAAGTAGAGGTATACAATTTAGACCT
TTAAGTAAAATAGCTTTCTATATCTTTATTGCTAACTTCTTAATATTAATGGTATTAGGAGCTAAACA
CGTTGAGTCTCCATATATAGAATTTGGACAAATAAGTACAGTTATTTATTTTGCCATTTCTTAATTA
TAGTGCCTTTTATTAGTTTACTAGAAAATAGTTTAGTAGAATTAGCAGTATTAACATAAGAAAAGCCT
AGTAGATAAAAATAGATAAATTACATTTATTTTTAACTGGTTGCTAAGGAAGTTAAATAGATAAATTAT
ATTTATTTTAAATCGGTCTTCTCTATAGGTTTAAATACTATAAACGCTACTGGTATCTCGGATTTAAATC
TTGATTTTTTAGTATTATAGCTAATTTAATAAAAGATGGTATAAATATTACACCTGCTGTAGTTGTAA
GAGTAATTACAGTGTTTACC

Az exonok kék színnel vannak jelölve.

Primerek:

BcAR-F: 5' – GGCAAATGTC**ACTGTGAGC** – 3'

BcAR-R: 5' – ACCATCTCCATCCACCATACCT – 3'

A kiemelt nukleotid mutatja a pontmutáció helyét: gunanin helyett citozin