

Doktori (Ph.D) értekezés

**A KAJSZI VIRÁGZÁSKORI MONILIÁS  
(*MONILINIA LAXA* ADERH. ET RUHL.) BETEGSÉGGEL  
SZEMBENI ELLENÁLLÓSÁGA**

**Gutermuth Ádám**

Témavezető: Dr. Pedryc Andrzej, D.Sc  
egyetemi tanár

Budapesti Corvinus Egyetem  
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest

2013

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Kertészettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok

**vezetője:** Dr. Tóth Magdolna  
egyetemi tanár, DSc  
BCE, Kertészettudományi Kar,  
Gyümölcstermő Növények Tanszék

**Témavezető:** Dr. Pedryc Andrzej  
egyetemi tanár, DSc

BCE, Kertészettudományi Kar  
Genetika és Növénynevelés Tanszék

**A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.**

.....  
Dr. Tóth Magdolna

**A doktori iskola-vezető  
jóváhagyása**

.....  
Dr. Pedryc Andrzej

**A témavezető jóváhagyása**

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2012. évi december 4.-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

Elnöke:

Tóth Magdolna, D.Sc.

Tagjai:

Palkovics László, D.Sc.

Barna Balázs, D.Sc.

Deák Tamás, Ph.D.

Höhn Mária, C.Sc.

Opponensek:

Kiss Erzsébet, C.Sc.

Korbuly János, Ph.D.

Titkár:

Deák Tamás, Ph.D.

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÉLKITŰZÉS</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>A csonthéjasok virágzáskori moniliás betegsége: a fertőzéstől a termőrész pusztulásig</b>	<b>11</b>
3.1.1	A bibe konidiumos fertőzése és a ribonukleázok gomba fejlődését gátló hatása	13
3.1.2	A megporzás hatása <i>M. laxa</i> bibefertőzésére	15
<b>3.2</b>	<b>Kajszifajták és rokon <i>Prunus</i> fajok fogékonysága a moniliás virág és vesszőfertőzésre</b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>A kajsi <i>M. laxa</i> ellenállóság növelésére irányuló nemesítési tevékenység</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>A növényi rezisztenciagének</b>	<b>21</b>
3.4.1	A növényi rezisztenciagének csoportosítása	21
3.4.2	Növényi rezisztenciagén-analógok azonosítása	23
3.4.3	Rezisztenciagén-analógok izolálása <i>Prunus</i> fajokból	26
3.4.4	RGA markerek kapcsoltsága növényi rezisztenciákkal	28
<b>3.5</b>	<b>Poligalakturonáz-gátló fehérjék</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Növényanyag</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Szabadföldi természetes fertőzés megfigyelése</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Fertőzési kísérletek</b>	<b>37</b>
4.3.1	Szabadföldi virágfertőzési és megporzási kísérletek	37
4.3.2	Mesterséges vesszőfertőzés	37
4.3.3	Laboratóriumi kísérletek	38
4.3.4	Mikroszkópos vizsgálatok	39
<b>4.4</b>	<b>Molekuláris vizsgálatok</b>	<b>40</b>
4.4.1	DNS- alapú kísérletek	40
4.4.1.1	DNS-izolálás	40
4.4.1.2	PCR-technika az NBS szekvenciák meghatározására	40
4.4.1.3	SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	41
		4

4.4.1.4	A PCR-termékek klónozása és DNS-szekvenciájuk meghatározása	41
4.4.2	RNS-alapú kísérletek	42
4.4.2.1	Génexpressziós kísérletekhez történt mintagyűjtés	42
4.4.2.2	RNS-izolálás és egyszálú cDNS szintézis	43
4.4.2.3	Kétszálú cDNS szintézis	43
4.4.2.4	cDNS AFLP	44
4.4.2.5	Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	47
4.4.3	PGIP gén szekvenciájára tervezett primerek	49
<b>4.5</b>	<b>Bioinformatikai vizsgálatok</b>	<b>49</b>
4.5.1	Az NBS RGA szekvenciák bioinformatikai vizsgálata	49
4.5.2	A cDNS AFLP szekvenciáinak bioinformatikai vizsgálata	50
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>A kajszi ellenállóságának vizsgálata <i>M. laxa</i> fertőzésre</b>	<b>51</b>
5.1.1	Az ellenállóság szabadföldi bonitálása	51
5.1.2	Virágrészek érzékenysége a kórokozóval szemben	54
5.1.2.1	A kasztrálás és megporzás hatása a virágfertőzés kialakulására	54
5.1.2.2	A bibekivonat növekedésgátló hatása az <i>M. laxa</i> micéliumfejlődésére	57
5.1.2.3	A virágszirom <i>M. laxa</i> fertőzése	58
5.1.2.4	Fajták mesterséges szírom fertőzése in vitro	60
5.1.2.5	A bibe kórokozóval szembeni ellenállóképességének in vitro vizsgálata	62
5.1.3	Ellenállóság vizsgálata a 'Zard' × 'Korai zamatos' család egyedein mesterséges vesszőfertőzés alapján	63
5.1.4	A 'Zard' és 'Orange red' fajták ellenállóságának összehasonlítása a fiatal levelek mesterséges fertőzése alapján	66
<b>5.2</b>	<b>Molekuláris vizsgálatok</b>	<b>67</b>
5.2.1	Eltérő fogékonyságú kajszi fajták összehasonlítása NBS LRR típusú rezisztenciagén-analógok SSCP vizsgálata alapján	67
5.2.2	A kajszi NBS LRR RGA-k filogenetikai vizsgálata	73
<b>5.3</b>	<b>A 'Zard' és 'Orange Red' fajták vesszőfertőzésének transzkriptomikai vizsgálata cDNS-AFLP technikával</b>	<b>74</b>
5.3.1	A TDF-ek homológia alapján történő azonosítása	78
5.3.2	PGIP gének szekvenciáinak meghatározása	80
<b>6</b>	<b>EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA</b>	<b>89</b>

<b>6.1</b>	<b>Kajszfajták és közeli rokon diploid <i>Prunus</i> fajok fogékonysága a <i>M. laxa</i> okozta termőrészpusztulásra</b>	<b>89</b>
<b>6.2</b>	<b>A virágszirom fertőzésére adott reakciók összehasonlítása különböző fajtáknál</b>	<b>91</b>
<b>6.3</b>	<b>A megporzás és virágfertőzés közti összefüggés vizsgálatának eredményei</b>	<b>92</b>
<b>6.4</b>	<b>Mesterséges termőrészfertőzés eredményei</b>	<b>93</b>
<b>6.5</b>	<b>Az ‘Orange red’ és ‘Zard’ fajta mesterséges levélfertőzésének eredményei</b>	<b>95</b>
<b>6.6</b>	<b>Az NBS-típus RGA-k és a monilia-ellenállóság kapcsoltsága</b>	<b>96</b>
<b>6.7</b>	<b>Az újonnan azonosított RGA-k molekuláris vizsgálata</b>	<b>97</b>
<b>6.8</b>	<b>A moniliára fogékony ‘Orange red’ és az ellenálló ‘Zard’ fajták között fertőzés hatására kialakuló génexpressziós eltérések</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>103</b>
	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>MELLÉKLETEK</b>	<b>106</b>
	<b>1. Irodalomjegyzék</b>	<b>106</b>
	<b>2. Melléklet</b>	<b>114</b>

## Rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
bp	bázispár
CC	'csavart csavar' (coil coiled) két $\alpha$ hélix egymás köré csavarodva
cDNS	komplementer DNS
cDNS-AFLP	cDNS amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism)
ds	duplaszálú (Double Stranded)
DEG	eltérően kifejeződő gén (differently expressed genes)
eLRR	extracelluláris leucinban gazdag régiót tartalmazó fehérje
GTP	guanozin-trifoszfát
HR	túlérzékenységi válasz (hypersensitiv response)
kb	kilobázis (1000bp)
MAS	markerekre alapozott szelekció
MQ	Milli-Q ioncserélő gyantán megszárt desztillált víz
NBS-LRR	nukleotid kötő hely – leucinban gazdag régió
PCR	polimeráz láncreakció
PDA	burgonya dextróz agar táptalaj
PG	poligalakturonáz enzim
PGIP	poligalakturonáz gátló fehérje
PPV	Plum pox potyvirus
PR proteinek	patogénválasz-fehérjék
QTL	menyiségi tulajdonságot meghatározó lókus
RGA	rezisztenciagén-analóg
RGH	rezisztenciagén-homológ
R gén	rezisztenciagén
R protein	rezisztenciafehérje
RT	reverz transzkripció
s	másodperc (secundum)
TDF	transzkriptumból származó fragmentum
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor

# 1 Bevezetés

Csonthéjas gyümölcsfajokon általánosan károsító faj a *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey kórokozó. A virág- és hajtásfertőzés elsősorban a meggyen és a kajszin tapasztalható, mint állandó növény-egészségügyi probléma. A kórokozó termőrészpusztulást okoz a virágzáskor csapadékos időjárás esetén. Kerti körülmények esetében általában nem sikeres a védekezés, de még az üzemi termesztésben is kétséges a permetezés eredményessége.

A kajszifajták fogékonysága eltérő mértékű a *M. laxa* termőrész fertőzésre, de teljesen ellenálló fajta a hazai fajták között nem ismert. A termesztésben alkalmazott fajták fogékonyságának mértékéről nem állnak rendelkezésre az összehasonlítást lehetővé tevő pontos adatok. A magyarkajszi-fajták tájszelekciója során természetes körülmények között történt a betegségekkel szembeni ellenállóságra történő szelekció, míg az azt követő kombinációs nemesítésnél a szelekció nem terjedt ki erre a tulajdonságra. A jelenleg terjedő divatos, új külföldi fajták virágzáskori monília ellenállóságról a fajtaleírások nem számolnak be, ezek további kihívásokat tartogathatnak a termesztők számára.

Magyar Gyula már az 1930-as években indított szelekció során, ami az első magyarországi kajszi nemesítési programnak is tekinthető, a téli fagytűrés és a *M. laxa* ellenállóság növelését tartotta elsődleges célnak (Pedryc, 2003).

Napjainkban a növénytermesztés sarkalatos pontjává vált a megbízhatóan egészséges és vegyszermentes termékek előállítása. Az engedélyezett növényvédőszer-hatóanyagok mennyisége évről-évre csökken, az alkalmazható szerek ára ezzel szemben folyamatosan nő. Ebben a helyzetben az integrált- és bio-növényvédelmi technológiák kidolgozása mellett, a rezisztens fajták előállítása lehet az egyik megoldás a környezettudatos termesztésre, valamint egészséges és gazdaságos kertészeti termékek előállítására. Zöldségfajok esetében, mind az intenzív, mind a szabadföldi termesztésben, a rezisztens fajták használata a termesztéstechnológia meghatározó elemévé vált. A nemesítők a termesztői körökben bevált fajtákat folyamatosan „egészítik ki” különböző kártevőkkel illetve kórokozókkal szembeni rezisztenciával, és dobják piacra az akár 7-8 különböző biotikus tényezővel szembeni ellenállóságot hordozó új fajtákat. A vad fajokból származó rezisztenciagének, már akár 5-6 visszakeresztezéssel átvihetők az új rezisztens fajtába. Az F<sub>1</sub> hibridek alkalmazása biztosítja a nemesítők munkájának megtérülését, így



ez a tevékenység jövedelmező üzletágként működik az egész világon. A nagy jelentőségű zöldségfajok esetében alig találni olyan betegséget, amellyel szemben ellenállóságot ne építették volna be a termesztett fajtákba.

Gyümölcsfajok esetében a fajtakínálat az ellenállóság tekintetében csekélyebb, a nemesítés nem tudja tartani a versenyt a kórokozókkal, kártevőkkel, így egyes fajok csak folyamatos növényvédelmi kezelésekkel termesztethők biztonságosan. A fásszárú kertészeti növények közül a szőlő és alma fajtaszortimentjében találhatunk olyan több rezisztenciát hordozó fajtákat, amelyek a termesztésben is kisebb nagyobb jelentőséggel bírnak. A keresztezés és visszakeresztezések folyamata, a rezisztenciagének hatásának tesztelése, öröklődésük meghatározása, az új fajta engedélyeztetése legalább 15-20 éves folyamat, így e fajok nemesítése hosszú távú feladat.

A nemesítés felgyorsítását a korai szelekciós módszerek szolgálhatják. A korai szelekció egyes zöldségfajok (paprika, paradicsom) rezisztencia tesztelésekor a vetéstől számított ötödik hétre meghatározható, míg a hosszú generációs idővel jellemezhető gyümölcsfajok esetében ez legtöbbször lehetetlen. A genetikai térképezésen alapuló, az ellenálló fenotípushoz kapcsolt DNS-alapú markerek létrehozása megoldást jelenthet a szelekció felgyorsítására, de a fás szárú növények esetében ez évtizedekig tartó folyamat. Ennek oka a gyümölcs fajok hosszú generációs idejéből és az ültetvényben történő fenotipizálás bizonytalanságából adódik.

A különböző növényfajok és azok kórokozóival történő kapcsolatának - fertőzésmenet, növényfajon belüli érzékenység a fertőzésre – pontos meghatározása alapul szolgálhat a nemesítés számára alkalmazható tesztelési módszerek kidolgozásához.

## 2 Célkitűzés

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. A tanszéki gyűjteményben lévő kajszifajták és hibridek fogékonyságának bonítálása, valamint érzékenységi sor felállítása a természetes moniliás vesszőfertőzés alapján.
2. A termőrészek fertőzésmenetének pontos leírása, a megporzás és a bibefertőzés közötti kapcsolat feltárása.
3. Az ellenállóság hátterének feltárása, a fertőzésre kialakuló válaszreakció leírása.
4. A monilia ellenálló hibridek azonosítására alkalmas rutin eljárás kidolgozása
5. A monilia ellenállósághoz kapcsolt rezisztenciagén analógok azonosítása homológia alapján.
6. A monilia ellenálló és fogékony kajszifajták fertőzését követő génexpressziós eltérések meghatározása a hancsszövetben.

### 3 Irodalmi áttekintés

#### 3.1 A csonthéjasok virágzáskori moniliás betegsége: a fertőzéstől a termőrész pusztulásig

A meggy és kajszi virág- és vesszőpusztulása elsősorban a *Monilinia laxa* kórokozó fertőzésének következménye. A kórokozó Európában, Ázsiában, Afrikában honos. A virágzáskor uralkodó csapadékos, párás időjárás esetén a kajszi ültetvények növényvédelmét a betegség megelőzésére irányuló kezelések határozzák meg. Az időjárásnak megfelelően a kémiai védekezések száma egy és három kezelés között változhat, ami felszívódó gombaölőszerek alkalmazásával javasolt. (Holb, 2003). A kijutatott növényvédőszer költsége egy rezes lemosópermetezéssel és három felszívódó fungicides kezeléssel 2012. évi árakon számítva hetvenezer forint körül alakult hektáronként, amihez még húszezer forint kijutatói munkadíj társul.

Az ellenállóság vizsgálatához a kórokozó fejlődés- és fertőzésmenetének ismerete alapvető fontosságú. A kórokozó a fertőzött növényi szöveteken gyors barnulást, szöveti macerációt okoz, ami a szövetek pusztulásával jár (Byrde és Willetts, 1977). A betegséget ezen tipikus tünetek alapján a szerzők csonthéjas fajok barna rothadásaként (*brown rot of stone fruits*) nevezték el. A *Monilinia* nemzetség fajai nekrotróf gombakórokozók közé sorolhatók, amelyek jellemzője, hogy a gazdaszervezetbe hatolva enzimeikkel a sejtek dezintegrációját okozzák, fitotoxinjaik közvetlen sejtelhalást váltanak ki (Honey, 1936). A nekrotrófok hifái a már elhalt sejtek közé, illetve a sejtekbe hatolnak be, bontják és felveszik azok anyagait. Bár a nekrotróf kórokozók és a szaprotrófok tápanyagaikat egyaránt az elhalt sejtekből nyerik, fontos eltérés közöttük az, hogy a sejtek elhalását csak a nekrotrófok képesek kiváltani (Jakucs és Vajna, 2003). Wood (1960). A fertőzés során a gyors szövetbarnulást a fenolos vegyületek oxidációjával magyarázták, ami a kórokozó és a növényi polifenoloxidázok működésének eredménye. Az elpusztított szövetek a vízvesztés következtében összeszáradnak, a gyümölcsfertőzés esetében a fán fennmaradva gyümölcsmúmiákat hoznak létre. A gyümölcsmúmiák és a fertőzött vesszők biztosítják a kórokozó túlélő képleteinek fennmaradását. A kórokozó életciklusait a **1. ábra** szemlélteti.

A kórokozó fertőzési folyamatát Glits (2000) foglalta össze. Az *M. laxa* által kiváltott tünetek a virágon, a hajtáson, a vesszőn, az ágon és a gyümölcsön figyelhetők meg. A kórokozó fertőzésekor a virág csésze- és szíromlevelei világosbarnára színeződnek, a virágkocsány elhal, és megfigyelhetők rajta a szürke színű, apró exogén sztrómák. A

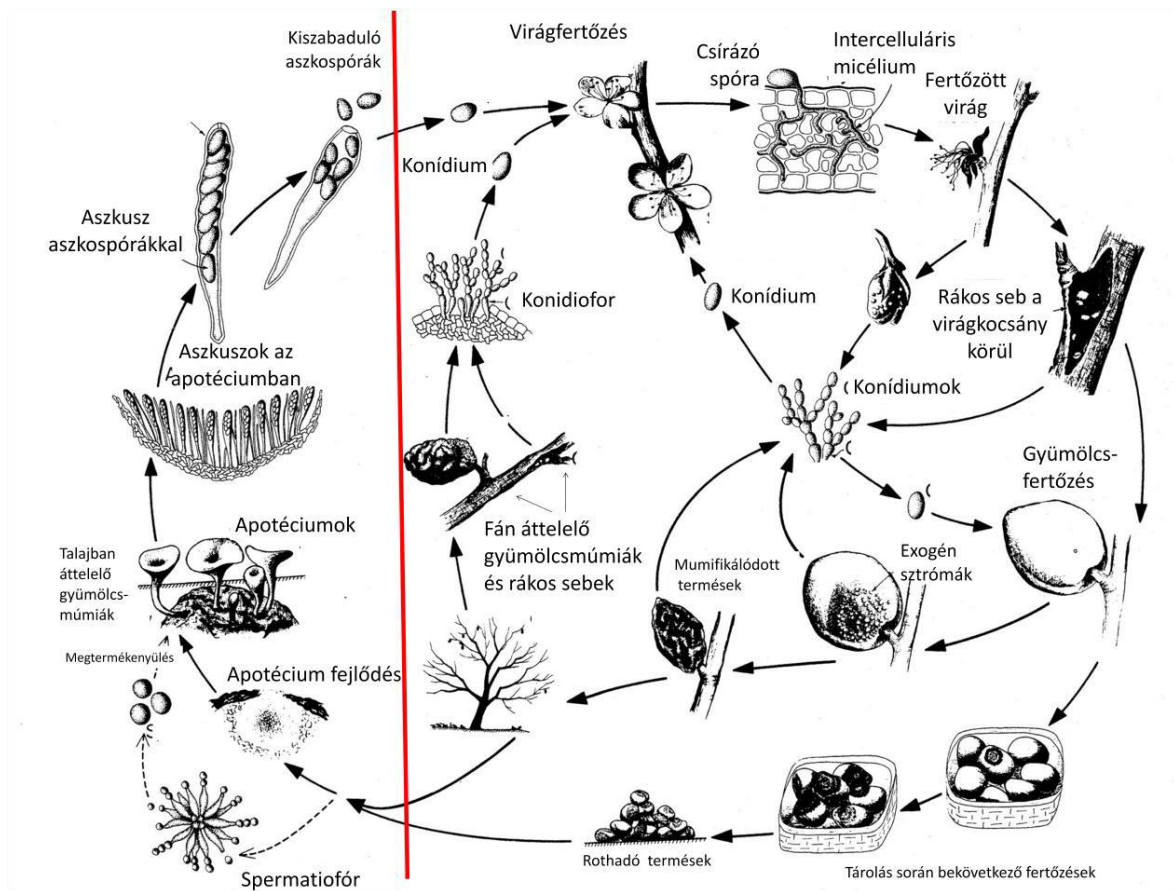
termőnyársak elpusztulnak és a tövüknél mézgcacseppek jelennek meg. A hajtás alsó harmadában szabálytalan alakú, több ízközre kiterjedő barna folt jelentkezik, amely később kifakul, felületét pedig exogén sztrómákból álló bevonat borítja. Ezek után a hajtás először meglankad, majd leszárad. Akkor is bekövetkezhethet hajtáspusztulás, ha az a rothadó gyümölcs mellett található. A vesszőn és a termőnyársak tövében ovális, sötétbarna, kissé besüppedő foltokat láthatunk. Ezekből az ágakon rákos sebek alakulnak ki, amelyekben elszórtan szürke exogén sztrómák figyelhetők meg. A gyümölcsök esetében egyre nagyobbodó barna színű rothadás látható, amely végül az egész gyümölcsre kiterjed. Ezeken a rothadó foltokon elszórtan apró, szürke, exogén sztrómákból álló bevonat alakul ki (Glits, 2000).

A *M. laxa* jelentős fertőzési forrásai a gyümölcsmúmiák. A gyümölcsmúmiákon található exogén sztrómákon az előző évben képződött konídiumok télállóak, sőt a tél folyamán újabb konídiumok is keletkeznek. A *M. laxa* esetében 5-10 C hőmérsékleten maximális a konídiumok sporulációja, míg 25 C-on a sporuláció századára csökken a PDA táptalajon nevelt tenyészetek esetében (Harada és mts. 2004.). A *Monilinia* nemzetséget leíró Honey (1936) szerint az *M. laxa* faj esetében az ivaros (anamorph) apotéciumok és azokon képződő askospórák nagyon ritkán figyelhetők meg, ezzel szemben az észak-amerikai elterjedésű *M. fructicola* tavaszi csonthéjas gyümölcsfajok virágfertőzésénél mind az ivaros, mind az ivartalan alak fertőzése jellemző. Tavasszal a gyümölcsmúmiákon új exogén sztrómák fejlődnek, amelyek láncokban konídiumokat fűznek le. Tavasszal 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 (Glits, 2000).

Ezzel szemben Byrde és Willetts (1977) szerint az összes virágrész szolgálhat infekciós pontként. A fertőzés kezdődhet a szirmon, a porzón és bibén is. A kórokozó 48 óra alatt képes a fertőzött virágrészek teljes kolonizációjára, és a csészén majd virágkocsányon keresztül a termőrészek háncsszövetébe jut (Weaver, 1950).

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 fertőzhet tovább a kórokozó (Glits, 2000).

A betegség elnevezése a károsított növényfaj és az okozott tünet alapján alakult ki. A magyar elnevezés esetén a dolgozatban Kövics (2000) által készített rendszertani alapon álló, fitopatogén gombanév összeállítását vettem alapul, miszerint a betegség neve: a kajszi moniliás betegsége. A betegséget kiváltó kórokozó esetében a tudományos név használatakor a dolgozatban a melbourni XVIII. International Botanical Congress Nomenclature Section állásfoglalása (McNeill és Turland, 2011) - egy gomba egy név – alapján faj ivaros alakjának a nemzetközi irodalomban is használt nevét -*Monilinia laxa*-használtam, habár a fajt leíró művében Honey (1936) az apotéciumos (teleomorf) alak pontos leírását nem közli és az általam feldolgozott irodalmakban sem találtam erről leírást.



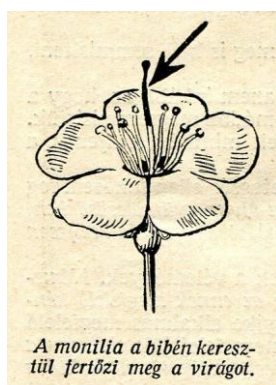
**1. ábra** Csonthéjas gyümölcsfajok moniliás fertőzésmenete. Az európai elterjedésű *Monilinia laxa* fertőzésmenetében nincs jelentősége az ivaros fejlődési alaknak, ami a kép bal oldalán látható (Agrios, 1997).

### 3.1.1 A bibe konídiumos fertőzése és a ribonukleázok gomba fejlődését gátló hatása

A pollentömlő fejlődése a gombakonídiumok csírázásával több szempontból is nagy hasonlóságot mutat. A gyors, polarizált sejtnövekedés és a tömlőszerű fejlődés

feltűnően hasonló. A virágos növények megtermékenyülése és a gombák fertőzése között azonos receptorfehérjék közreműködését bizonyították Kessler és mts. (2010). A XIX. században a kutatók a pollentömlőt növényi gombakórokozónak gondolták, aminek továbbfejlesztése szerint a virágfertőző gombák a pollennel azonos mód fertőzik a meg a virág termőjét (Govers és Angenent, 2010).

A meggy és kajszi moniliás virágfertőzés jelentőségéről már 1930-ban Kerekes beszámol a Növényvédelem folyóiratban. A virágfertőzés elképzelése szerint a bibén keresztül történik a pollentömlő fejlődéséhez hasonló mód (2. ábra).



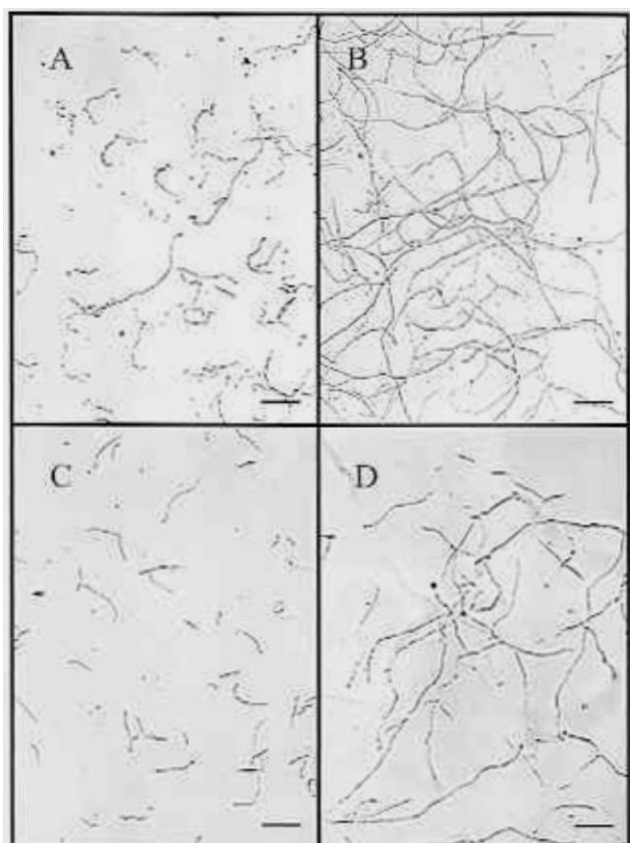
**2. ábra** A meggy moniliás bibefertőzése. A kórokozó bibecsatornán keresztül a pollennel azonos módon fertőzi meg a virágot (Kerekes, 1930).

Ngugi és Sherm (2004) az észak-amerikai kék áfonya (*Vaccinium corymbosum* L.) *Monilinia vaccinii-corymbosi* okozta virágfertőzésekor a konídium bibén történő csírázását és az ovárium fertőzését vizsgálták. A konídium és a pollen hasonló mód szelektíven tapad meg a bibére jellemző felületen más felületekhez képest, ami bizonyítja a pollen és a konídium közötti mimikri jelenségét. A kék áfonyát természetes körülmények között károsító *M. vaccinii-corymbosi* összehasonlítva az észak-amerikai elterjedésű *Monilinia fructicola* csonthéjas fajok kórokozójával, leírták, hogy a *M. vaccinii-corymbosi* elágazás nélküli, egyszálas hifákat fejlesztett a bibeszövetben a pollen fejlődésével hasonló mód, míg a *M. fructicola* sűrűn elágazó az egész bibeszövetet kolonizáló hifákat fejlesztett.

A tápanyagokban gazdag bibe és a transzmissziós szövete kórokozó gombák és baktériumok célpontja. A bibe patogén gombák és baktériumok fertőzése elkerülésében RN-áz enzimeinek szerepét feltételezte Schrauwen és Linskens (1972). A virágokban szekretálódó nektár nagy mennyiségben tartalmaz cukrokat lipideket, fehérjéket. A dohány esetében antiszeptikus hatását a megporzásért felelős szervezetek csalogatásáért felelős nektárnak a magas hidrogénperoxid koncentrációjával magyarázta Carter és Thornburg

(2004). Hilwig és mts. (2010) petúnia nektárban a növényvilágban elsőként mutattak ki *S*-RN-ázzal nagy hasonlóságot mutató két RN-áz fehérjét, az RNase Phy3 és RNase Phy4 -et. Feltételezik, hogy ezek a fehérjék a nektár patogénekkal szembeni védelmében játszanak szerepet.

Hugot és mts. (2002) bizonyították, hogy dohány „*S*-like RNase” enzim *in vitro* körülmények között gátolja a *Fusarium oxysporum* és a *Phytophthora parasitica* fejlődését (3. ábra).



**3. ábra** Az RN-áz NE (*S*-like RNase) enzim gombamicélium-növekedésének gátlása. A *Phytophthora parasitica* zoosporák és *Fusarium oxysporum* konídiumok 48 órás folyékony táptalajban nevelt micéliumai ('B' és 'D' kép) és RN-áz NE enzimet (50 µg/ml) tartalmazó táptalajban gátolt növekedésű gombamicéliumok ('A' és 'C' kép). A *Phytophthora parasitica* 50 %-kal, míg a *Fusarium oxysporum* több mint 90 %-kal rövidebb micéliumokat fejlesztett a RN-áz NE enzimet tartalmazó táptalajban (Hugot és mts., 2002).

### 3.1.2 A megporzás hatása *M. laxa* bibefertőzésére

A kajszi esetben a *M. laxa* általi virágfertőzés menetét a megporzással összefüggésben Tzoneva és Tzonev (1999) vizsgálta. Kérdésük az volt, vajon a

megporozatlan és megporzott bibe azonos módon képes-e a fertőzés nyílt kapujaként szolgálni. Öt eltérő kezelést végeztek négy vegetációs időszakon keresztül kajszi-virágokon. A virágzás után 5 héttel felvételezték a természetes körülmények között fertőzött virágok számát. Eredményeiket az **1. táblázat** foglalja össze. A kézzel megtermékenyített és kasztrált virágokon keresztül nem volt képes a kórokozó megfertőzni a fákat ('B' és 'D' kezelés), míg a megporzott, de nem kasztrált ('E' kezelés) kezelés során a virágok 12 %-ának fertőzése következett be. Feltételezéseik szerint a fertőzés sikertelenségét a megtermékenyítés hatására a bibében keletkező, a gomba fejlődését gátló vegyület okozza. A kísérleteik során használt fajtákról és ezek termékenyülési viszonyairól nem számoltak be.

**1. táblázat.** Öt eltérő virágzáskori kezelés hatása a kajszi virágzáskori moniliás fertőzöttségére (Tzoneva és Tzonev,1999).

Vizsgálat éve	Kezelés	Összes virágszám	Fertőzött virágok aránya (%)
1991	A	4230	86
	B	17447	0
	C1	4738	95
1993	A	2818	77
	B	9159	0
1995	A	2940	77
	C2	1468	75
	D	7210	0
1997	A	2333	68
	D	5871	0
	E	1200	12

A: szabad elvirágzású (kezeletlen pozitív kontroll). B: kasztrált, megporzott, és papírsákkal izolált, C1: nem kasztrált, vászonzsákkal izolált C2: nem kasztrált, papírsákkal izolált, D: kasztrált és megporzott, E: megporzott, nem kasztrált és nem izolált.



### 3.2 Kajszfajták és rokon *Prunus* fajok fogékonysága a moniliás virág és vesszőfertőzésre

Hazánkban Benedek és mts. (1990) 6 éven keresztül vizsgálták 8 kajszifajta vesszőfertőzöttségét egy kecskeméti ültetvényben. A fajták termőrész pusztulását az **2. táblázat** ismerteti.

**2. táblázat.** Nyolc magyar kajszifajta moniliás vesszőfertőzöttsége százalékos mértékben Benedek és mts. (1990) után.

Fajta név	Vesszőfertőzöttség (%)	
	I. ismételés	II. ismételés
Borsi-féle kései rózsza	9	11
Kécskei rózsza	16	7
Mandulakajszi	12	14
Gönci magyarkajszi	11	28
Szegedi mamut	12	-
Ceglédi óriás	10	27
Nagykőrösi óriás	12	12
Ceglédi bíborkajszi	14	9

A legerősebb fertőzés az összes termőrész közel 30 %-át pusztította el. A termőrész pusztulást két ültetvényrészben vizsgálták és a két terület között jelentős eltérést tapasztaltak azonos évben.

A Nyikítai Botanikus Kert kutatói három éven keresztül vizsgáltak különböző *Prunus* fajok, ezek kajszival létrehozott hibridjei és kajszi fajták *M. laxaval* szembeni ellenállóságát. Az általuk felállított öt kategóriás fogékonysági sorban az 1. kategóriába a teljesen ellenálló genotípusokat sorolták be, míg az 5. kategóriában a fogékony genotípusok találhatók. A megfigyeléseik alapján a vizsgált kajszi fajták egyöntetűen a fogékony csoportba kerültek (Komar-Tyomnaya és Richter, 2000). Az eredményeiket a **3. táblázat** foglalja össze.

**3. táblázat.** Különböző *Prunus* fajok és ezek hibridjeinek ellenállósága a *M. laxa* kórokozó vessző- pusztulásával szemben (Komar-Tyomnaya és Richter, 2000) A genotípusok csoportosítása 1-től (teljesen ellenálló) 5-ig (fogékony) terjedt.

1.	<i>P. cerasifera</i> × <i>P. armeniaca</i> : ‘Sintez’, ‘Uryuko-alyca’, <i>P. domestica</i> × <i>P. armeniaca</i> : ‘Kleimen x ‘Krasny partizan’
2.	<i>P. mandshurica</i> , <i>P. mume</i> ‘Rubra plena’, <i>P. mume</i> ‘Rosea plena’, <i>P. dasycarpa</i> ‘Grossa tardiva’, ‘Manaresi’ ‘Tlor Ciran’, ‘Picole precocte’, Plumcot: ‘Zamshevy’, ‘Krasny’,
3.	<i>P. dasycarpa</i> : ‘Black apricot’, ‘Jolty Kan’, ‘Persidsky chorny’, ‘Shrederii’
4.	<i>P. ansu</i> : ‘Zolotisto Jolty’, <i>P. dasycarpa</i> : ‘Melitopolski Chorny’
5.	<i>P. davidiana</i> , <i>P. sibirica</i> , <i>P. armeniaca</i> × <i>P. mandshurica</i> × <i>P. sibirica</i> : ‘Sacer’, ‘Tovariscs’

Tzonev és Yamaguchi (1999) kajszival közeli rokon fajok *M. laxa* virágfertőzéssel szembeni ellenállóságát vizsgálták Japán Tsukuba tartományában. A vizsgált 123 fajta közül 43 *P. armeniaca* var. *ansu*, 20 *P. armeniaca* és 11 genotípus ezek hibridje volt. A 47 további fajta közül 30 a *P. mume* fajhoz tartozott, 19 genotípus pedig *P. mume* és *P. armeniaca* var. *ansu* keresztezéséből származó hibrid volt. Két *P. salicina* fajtát is bevontak a vizsgálataikba. A vizsgált *P. armeniaca* var. *ansu*, és ezek *P. armeniaca*-val képzett hibridjeinek erős fertőzöttsége alapján megállapították, hogy ezek a genotípusok rezisztencia forrásként nem alkalmasak a kajszinemesítés számára. A vizsgált *P. mume* fajták teljes immunitást mutattak a *M. laxa* fertőzésével szemben. A két vizsgált japánszilvafajta a ‘Sordum’ és ‘Red June’ az *M. laxa* fertőzésével szemben teljesen ellenálló volt. *P. armeniaca* var. *ansu* Nyugat-Kína párás klímájú területein terjedt el, emiatt feltételezték, hogy a faj több gombás betegséggel - ideértve a *M. laxa*-át is - szemben ellenállósággal rendelkezik (Mehlenbacher és mts., 1990). Harada és mts. (2004) Japánban a *Prunus mume* fajon súlyos vesszőpusztulást okozó új monília fajt azonosítottak, a *Monilia mumecola*-t.

Balan és mts. (1999) 124 fajta és hibrid ellenállóságát vizsgálták Romániában. A mesterséges virágfertőzés során az ágakat *M. laxa* szuszpenzióval permetezték le, majd a párás körülmények biztosítása érdekében, 48 órára vizes papírral burkolták le az ágakat. A vizsgált fajták érzékenységi sorát a fertőzés gyakorisága és erősségének szorzatából számították (attack level, A.L.). A fertőzés után 60 nappal értékelték a kísérletet. A vizsgált

fajták és egy hibrid ellenállósága az alábbiak szerint alakult: teljesen ellenálló (tünetmentes) a K55-39 hibrid, ellenálló (AL: 0,5-12) a 'Precoce de Italia', közepesen ellenálló (AL: 12,5-20) 'Precoce de Bergeron', 'Boccucia', 'Tivoli', mérsékelten fogékony (AL: 20,5-30) 'Excelsior', 'Canette', 'Manitoba', fogékony (AL: 30,5-50) a 'Beregron', 'NJA 19', 'Neptun 40', 'Royal', 'Sungiant', míg nagyon fogékony (AL> 50) a 'Francousi', 'Precoce de Colomer', 'NJA42', 'Paksi magyarkajsi', 'Erevani', 'Litoral', 'Saturn', 'Cafona' és 'Framingdale'.

Crossa-Raynaud (1969) kajsi és mandula fajták *M. laxa* érzékenységét vizsgálta mesterséges fertőzés alapján. A fertőzés levágott 2-4 éves fás részeken történt téli és kihajtás utáni időpontban. A kísérlet beállítását megelőzően a szabadföldi megfigyelésekből szerzett tapasztalataik alapján fogékony kontrollként a 'Canino' fajtát, míg ellenállóként a 'Hamidi' fajtát választották. Az ágakon 3 héttel a fertőzést követően felvételezték az elhalt szövet hosszát. Az eredményeket a **4. táblázat** mutatja be.

**4. táblázat.** Mediterrán kajszifajták fogékonysága a *M. laxa* kórokozó mesterséges ágfertőzésére Crossa-Raynaud (1969) kísérletei alapján.

Érzékenységi sorrend a <i>M. laxa</i> mesterséges ágfertőzésére	Fertőzés hossza és szórása (cm)			
	Télen		Tavasszal	
Canino (fogékony)	11,3	1,25	11,6	0,43
Búlida	7,2	1,32	8,8	0,32
R. du Roussilon	8,1	0,75	8,6	0,15
Amor leuch	5,4	0,79	7,1	0,33
Moorpark	4,8	0,51	6,0	0,17
Fakoussi	4,7	0,37	5,5	0,3
Real d'Imola	4,3	0,61	5,3	0,26
Hatif colomer	4,1	0,53	5,1	0,37
Jaubert-Foulon	3,8	0,47	5	0,24
Derby Royal	3,5	0,5	4,3	0,18
Hamidi (ellenálló)	2,5	0,56	3,4	0,16

### 3.3 A kajszi *M. laxa* ellenállóság növelésére irányuló nemesítési tevékenység

A kórokozókkal és kártevőkkel szembeni ellenállóság, a gyümölcsnemesítés során a második legfontosabb szemponttá vált a gyümölcs tulajdonságok után, mert a legtöbb gyümölcsfaj termesztése mára csak kémiai védekezéssel történhet gazdaságosan (Gardiner és mts., 2007). Az ellenálló fajták alkalmazása az egész társadalom és a termesztők által érezhető előnyökkel jár. A növényvédőszeresek mellőzésével csökken a környezetszennyezés és a termesztés költségei is (Reisch és Pratt, 1996).

A monília-ellenálló kajszi hibridek előállításáról keresztezéses nemesítéssel elsőként Crossa-Raynaud (1969) számol be. A 'Hamidi' × 'Canino' 45 egyedes utódpopulációjának mesterséges fertőzése alapján megállapította, hogy az utódokban megjelenik az ellenálló 'Hamidi' fajta ellenállósága. A mesterséges ágfertőzések során, az utódokon mért fertőzés terjedésének hossza folyamatos eloszlást mutatott a két szülő fajtahoz képest. Ez alapján a szerző a rezisztenciát poligénikus meghatározottságúnak feltételezte.

Nicotra és mts. (2006) hét éves kajszi monília rezisztencia nemesítési program eredményeiről számol be. Munkájuk során 17 keresztezési kombinációból származó 1200 utódot értékelték. Az ellenállóság forrásaként az 'Ivone Liverani', 'Amebile Vecchioni', 'Stark Early Orange', 'Perfection' és a 'Hamidi' fajtákat alkalmazták. A fertőzéseket Crossa-Raynaud (1969) által kidolgozott protokoll szerint végezték el. A fajták vizsgálatakor megállapítják, hogy a termőrész pusztulás mértéke a virágzási idővel is összefügg. Véleményük szerint, a korai virágzású fajták esetében nagyobb fertőzéssel kell számolni. Az ellenállóság öröklődéséről megállapítják, hogy poligénikus jellegű, de az utódok között domináltak az ellenálló egyedek.

A török 'Hacihaliloglu' fajta ellenállóságának növelése érdekében Gulcan és mts. (1999) keresztezéseket végeztek az ellenállónak tartott 'Boccucia', 'Ivonne Liverani', 'Nugget', és 'San Casterese' fajtákkal. A tavaszi mesterséges vesszőfertőzés során az összes genotípus esetében a vesszők teljes hervadását és száradását tapasztalták, így a végső, 3-4 hét után kialakuló tünetek alapján értékelték az ellenállóságot.

Csonthéjas fajok közül a meggy monília rezisztens fajták nemesítése már 1990-es évek elején megkezdődött a Gyümölcs- és Dísznövény Kutató Fejlesztő Kht.-ban. Az ültetvényben kilenc meggyfajta mesterséges virágfertőzésekor a 40-91 % között változott a

fertőzött virágok száma. Mindezek mellett az ellenállónak meghatározott 'Csengődi' és 'Bosnyák' fajtákon ágelhalást nem okozott a fertőzés (Rozsnyay, 2001). A meggy *Monilinia* ellenállóságának növeléséről nemesítéssel legújabbban hazánkban Szügyi és mts. (2012) számoltak be. A természetes, ültetvényben tapasztalható fertőzés és a mesterséges ágfertőzés értékelése az ellenállónak tartott 'Csengődi' és a fogékonynak ismert 'Érdi bőtermő' és a két fajta tíz hibridjén történt. A tíz hibrid a spontán fertőzés alapján került kiemelésre a 120 egyedes hibridcsaládból. Az egyedek ellenállóságának összehasonlítása a két fertőzési módszerrel (természetes fertőzés és mesterséges vesszőfertőzés) teljes ellentmondást mutatott, a mesterséges vesszőfertőzés során nem tapasztaltak jelentősebb eltérést a genotípusok között egyöntetűen pusztult mindegyik hánccsszöve. A két eltérő fenotípusú szülő fajta mesterséges vesszőfertőzése során is jelentéktelen eltérést tapasztaltak. A tíz kiemelt hibridből a természetes fertőzés alapján öt ellenálló képessége a 'Csengődi' fajtával azonos mértékű volt az ültetvényben történt bonitálás alapján.

### **3.4 A növényi rezisztenciagének**

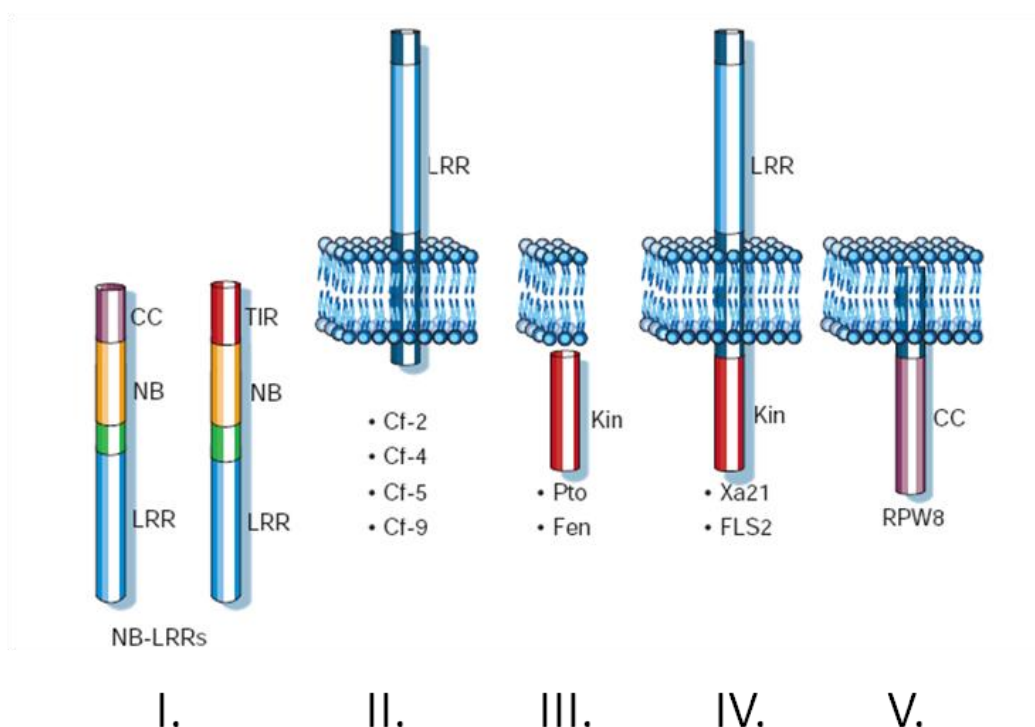
#### **3.4.1 A növényi rezisztenciagének csoportosítása**

A növényi kártevők és kórokozók eltérő stratégiákat alkalmaznak a növényi szövetek energiaforrásként történő felhasználása céljából. A fitopatogén baktériumok a sejtek intercelluláris járataiba a sztómákon, néha mechanikai sérüléseken át jutnak be, ahol felszaporodnak és a sejteket elpusztítják. A fonálférgek és levéltetvek a szűrő-szívó szájszervükkel szerzik meg a táplálékukat a növényi sejtekből. A gombakórokozók a legváltozatosabb úton képesek a növényi gazdaszervezet fertőzésére. Egyes kórokozó gombák a gazdaszervezetre történő érkezésük után annak légzőnyílásain jutnak az intercelluláris járatok közé, a szimbióta gombaszervezetekhez hasonlóan hausztóriumokat fejlesztenek, amik a citoplazmából történő tápanyagfelvételt biztosítják számukra. Ezzel szemben más gombakórokozók az epidermiszt átszakítva jutnak a gazdaszervezetbe, enzimeikkel és toxinjaikkal pusztítják el a sejteket, és kolonizálják a fertőzött szöveteket. Az eltérő patogének mindegyike a fertőzés sikerességének érdekében virulencia faktorokat alkalmaz (Jones és Dangl, 2006).

A növények a kórokozóikkal és kártevőikkel szembeni védekezéshez különböző, virulencia faktorokat felismerő rendszereket, és erre specifikus reakciókat alakítottak ki. A specifikus felismerés a növényi rezisztencia (*R*) gén termékének és a kórokozó közvetlen vagy közvetett virulencia faktorainak találkozásakor alakul ki. Az ezt követő jelátviteli

események rezisztencia esetén különböző védekezési válaszokon keresztül a hiperszenzitív reakció (HR) kialakulását okozzák (Dangl és Jones, 2001). Ezt a rendszert több mint hatvan éve ismerte fel Flor (1955) és megalkotta a ‘Gene for Gene’ elméletet.

Növényekből, elsősorban modell fajokból, 2006-ig több mint 70 specifikus rezisztenciagént izoláltak és bizonyították funkciójukat (Xiao, 2006). Ezek a rezisztenciagének, habár teljesen eltérő típusú patogénekkal (vírusok, bio- és nekrotróf gombák, nematódák, baktériumok) szemben biztosítanak ellenállóságot, öt osztályba sorolhatók az általuk kódolt fehérjék szerkezeti felépítése és azok feltételezett működési mechanizmusa alapján. Még az egy osztályba sorolt gének is sokszor változatos kórokozó csoportok felismeréséért felelősek (**4. ábra**).



**4. ábra** Az öt specifikus ellenállóságot biztosító növényi rezisztencia fehérjecsoport: Az első, az NBS-LRR csoport a legnagyobb R proteincsoport, amely a citoplazmában, ritkán membránhoz kapcsoltnak 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 egy transzmembrán, egy kináz és egy extracelluláris LRR domént hordoznak. Ilyen gének például az *Xa21* és *FLS2*. Az ötödik csoporthoz tartozik a *RPW8* gén, ez egy transzmembrán fehérje, ami az N terminálisán egy feltételezett jelfelismerő CC domént kódol (Jones és Dangl, 2006)

Az első – legnagyobb számban képviselt – csoportra jellemző, hogy egy NBS-LRR (nucleotide binding site – leucine-rich repeats) régiót tartalmazó fehérjét kódol. Az NBS régió, azaz nukleotid-kötőhely fontos szerepet játszik az ATP és GTP megkötésében. Az LRR, vagyis leucinban gazdag régió a rezisztenciagének specifikitását biztosítja. Ezek a gének tovább csoportosíthatók annak alapján, hogy analógjaik az N terminálison hordoznak egy TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor) vagy egy CC (coiled-coil) típusú domént. Az első alosztály TIR doménje hasonlóságot mutat a *Drosophila Toll* és az emlősök *Interleukin* transzmembrán receptorainak doménjeivel. A második alosztály egy coiled-coil, vagyis feltekeredett spirál doménnel rendelkezik (Dangl és Jones, 2001).

Az egyszikű növények csak CC-NBS-LRR típusú működő géneket tartalmaznak, kétszikű növényekben pedig mindkét csoport jelen van (Xiao, 2006). A genetikai vizsgálatok alapján megállapították, hogy ezek az RGA-k a genomban elszórtan, de csoportokba, ún. klaszterekbe rendeződve találhatók (Kanazin és mts., 1996). Ez a géncsoport alapvetően obligát biotrófok, hemibiotrófok ellen biztosít védelmet (Jones és Dangl, 2006), habár a paradicsomból izolált *I 2* (Simons és mts., 1998) és a sárgadinnyéből leírt *Fom-2* (Joobeur és mts., 2004) nekrotróf fuzáriumfajokkal szembeni rezisztenciagének a CC-NBS-LRR csoportba tartoznak.

A második csoportba olyan gének sorolhatók, amelyek membránon áthatoló, nagyméretű extracelluláris LRR régiókkal rendelkező fehérjéket kódolnak.

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

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

Az ötödik, utolsó csoportot olyan gének alkotják, amelyek által kódolt membránfehérjén egy coiled-coil domén található (Dangl és Jones, 2001).

### **3.4.2 Növényi rezisztenciagén-analógok azonosítása**

Azokat a szekvenciákat, amelyek tartalmazzák az NBS domént, rezisztenciagén-analógoknak (RGA) nevezik (Kanazin és mts., 1996). Ezzel szemben Qiang és mts. (2007) 228 *Rosaceae* szekvencia elemzése alapján rezisztenciagén-homológoknak nevezi ezeket a szekvenciákat. A homológia két szekvencia közös evolúciós eredetét jelenti. Ennek alapján két gén lehet ortológ, ha két különböző fajban találhatók és egy közös ős génből

származnak, amely a fajok közös ősében volt jelen. Két gén paralóg, ha egy organizmusban található, egy közös ős génből génduplikáció útján jöttek létre, és az azt követő divergens evolúció során alakultak ki. Általában különböző, de összefüggésben lévő funkciókat látnak el. Ezzel szemben az analógia közös evolúciós eredet nélküli hasonlóság (Patthy, 2007). A közös evolúciós eredet bizonyítása nélkül ezért a rezisztenciagén-analóg kifejezést szerencsésebb alkalmazni.

Növényi RGA-k izolálása alapjául a különböző rezisztenciagén-csoportok szekvenciaelemzése által meghatározott konzervált régiók ismerete szolgál. Ezen konzervált régiókra tervezett degenerált primerek alkalmazásával minden előzetes genomszekvencia-ismeret nélkül lehetséges rezisztenciagének analóg (RGA) szekvenciáinak felszaporítása és meghatározása (Xiao, 2006). Az így kapott szekvenciákból következtetett aminosav-sorrendek szekvencia adatbázisok szekvenciáival történő illesztése alapján feltételezhetjük a homológiát.

A legnagyobb számban klónozott rezisztenciagén-analógok az NBS domén DNS-szekvenciájának meghatározásából származnak. A fehérje NBS doménje a jelátviteli út során ATP és GTP molekulák megkötésére szolgál (Dangl és Jones, 2001). Az NBS domén változékonyságát növelő mutációk nagy gyakorisága miatt Qiang és mts. (2007) más funkciót feltételez. Az NBS domén két erősen konzervált régiót tartalmaz: az N terminálison egy foszforhurok (P-loop), a C terminálison egy hidrofób motívum helyezkedik el. Ezen régiókra tervezett degenerált primerek felhasználásával többek közt az alábbi növényfajokból határoztak meg sikeresen RGA-kat: *Arabidopsis* (Arts és mts., 1998), kukorica (Collins és mts., 1998), bab (Creusot és mts., 1999), burgonya (Leister és mts., 1998), saláta (Meyers és mts., 1999), kajszi (Soriano és mts., 2005), és számos más termesztett növényfaj. 2006-ig több mint 1600 NBS-LRR típusú RGA izolálása történt meg (McHale és mts., 2006).

A teljes növényi genomszekvenciák alapján a legnagyobb számban jelenlévő csoport az R gének közül az NBS-LRR típusú rezisztenciagének csoportja (**5. táblázat**). Az ismert teljes genomszekvenciák alapján elmondható, hogy a szőlő 30 434 (Jallion és mts., 2007), a nyár 45 555 (Tuskan és mts., 2006), a lúdfű 27 000 (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), és a rizs 37 544 fehérjét kódoló gént tartalmaz (International Rice Genome Sequencing Project, 2005).



**5. táblázat.** A szekvenált növényi genomok becsült génszáma, génsűrűsége és a NBS típusú gének mennyisége Velasco és mts. (2010) után.

Faj	Összes gén	Géngyakoriság/10kb	NBS gének száma
Alma	57386	0,78	992
Uborka	26682	0,73	61
Szója	46430	0,42	392
Nyár	45654	0,94	402
Lúdfű	27228	2,20	178
Szőlő	33514	0,66	341
Rizs	40577	0,97	535
Brachypodium	25532	0,94	238
Cirok	34496	0,47	245
Kukorica	32540	0,15	129

Az NBS-LRR típusú gének e négy faj esetében az összes feltételezett gén 1,51; 0,72; 0,53 illetve 1,23%-át teszik ki (a felsorolt növények sorrendjének megfelelően). A számok alapján Yang és mts. (2008) megállapították, hogy a szőlő és a lúdfű esetében lényegesen nagyobb arányban vannak jelen NBS-LRR típusú gének, mint a másik két növényfajban.

Yang és mts. 2008-ban két fásszárú faj - a szőlő és a nyár- esetében vizsgálták az NBS-LRR típusú géneket. Megállapították, hogy a TIR- és CC-NBS-LRR típusú rezisztenciagének eltérő felépítésűek lehetnek. Léteznek úgynevezett csonkolt R gének, melyeknek valamelyik doménje hiányozhat, vagy egyes domének akár többször is megjelenhetnek egy génen belül. A szőlőben összesen 495 NBS-LRR típusú gén található, amelyből 97 TIR-NBS-LRR típusú, beleértve az egyszerű TIR-NBS-LRR (90), és az eltérő felépítésű TIR-CC-NBS-LRR (1), TIR-NBS-LRR-TIR (3), TIR-NBS-LRR-TIR-NBS (1) és TIR-NBS-LRR-TIR-NBS-LRR (2) felépítésű szekvenciákat. A szőlő genomja további 365 nem TIR-NBS-LRR típusú gént tartalmaz: CC-NBS-LRR (200), CC-NBS-NBS-LRR (2), CC-NBS-LRR-NBS-LRR (1), egy ismeretlen domént és NBS-LRR doméneket

tartalmazó gén (147), valamint olyan NBS-LRR típusú gén, amelynek NBS doménje alapján feltételezhető, hogy a CC-NBS-LRR típusú csoportba tartozik, de CC doménje hiányzik (12). Ezen kívül ebben a növényfajban található összesen 76 olyan NBS típusú gén, amelyről hiányzik az LRR domén, beleértve azokat a géneket is, amelyeknek szekvenciája CC-NBS (26), TIR-NBS (14), valamint egy ismeretlen és egy NBS doménekből épül fel (36).

A nyárfa esetében az adatok azt mutatják, hogy összesen 78 TIR-NBS-LRR, 252 nem TIR-NBS-LRR, és 86 LRR régió nélküli NBS típusú gént tartalmaz a teljes genom.

*Arabidopsis*-on végzett vizsgálatok alapján Leister (2004) megállapította, hogy az NBS-LRR típusú gének tandem és nagyméretű kromoszóma részek duplikációjával sokszorozódnak. Zhou és mts. (2004) szerint két gén egy géncsaládba tartozik, ha az aminosavszekvenciájuk legalább 70 %-ban megegyezik, és a két illesztett nukleotidszekvencia legalább 70 %-os átfedésben van. Yang és mts. (2008) az NBS doménok illesztése alapján meghatározták, hogy a két vizsgált fásszárú faj esetében ezen kritériumok alapján mindkét faj esetében közel 78 %-a a vizsgált géneknek családokban helyezkedik el. Ez az arány *Arabidopsis*-nál és rizsnél 47,3 és 53,7 %-ot ért el. Abban az esetben, ha az aminosavszekvencia azonosságát minimum 80 %-os értékben határozták meg, a két lágyszárú faj esetében a géncsaládok száma jelentősen csökkent: *Arabidopsis*-nál 23,4 %, rizsnél 11,4 %. Ezzel szemben a szőlő 67,9 %-os és a nyár 74,5 %-os értékei alapján az egyes géncsaládokba sorolható gének között nagyobb fokú az azonosság. Ennek alapján feltételezik Yang és mts. (2008), hogy a fásszárú növényeknél bekövetkezett génduplikációk játszottak szerepet az NBS-LRR típusú gének a genomban történő megsokszorozódásában.

### **3.4.3 Rezisztenciagén-analógok izolálása *Prunus* fajokból**

A kórokozók elleni rezisztencia kulcsfontosságú szerepet tölt be a legtöbb csonthéjas nemesítési programban. A kajszi esetében a *Plum pox potyvirus* (PPV) által okozott kajszihimlő elleni rezisztencianemesítés fejlesztése érdekében különböző nemesítő csoportok foglalkoztak NBS-LRR típusú RGA-k izolálásával. Elsődleges céljuk a 'Stark Early Orange' fajtából származó, rezisztenciához kapcsolt molekuláris marker fejlesztése volt. Dondini és mts. (2004) elsőként amplifikált, klónozott és csoportosított kajsziból származó RGA-kat az NBS domén konzervált régiói alapján. A klónozott inszertek restriktációs enzimekkel történő hasítása alapján ezeket öt különböző csoportba sorolta.

Dondini és mts. (2004) a Shen és mts. (1998) által kidolgozott PCR stratégiát követték, mely során NBS-LRR típusú rezisztenciagének különböző konzervált motívumaira terveztek nem degenerált primereket. Csoportonként különböző mennyiségű, összesen 30 klónt szekvenáltak, melyek egyöntetűen a TIR-NBS-LRR típusú RGA csoportba tartoztak. Ezen szekvenciák illesztése alapján csoportonként primerpárokat terveztek a variábilis régiókra, és 17 különböző genotípuson tesztelték ezeket. A SEOBT101 primerkombináció csak a rezisztens fenotípusú egyedek esetében szaporított fel egy 300 bp hosszúságú DNS-szakaszt, amit lehetséges eszköznek tekintettek a rezisztencia meghatározására.

Soriano és mts. (2005) az NBS doménre tervezett degenerált primerek alkalmazásával 43 egyedi következtetett aminosav-szekvenciát határoztak meg 'Goldrich' és 'Stark Early Orange' PPV rezisztens fajtákból. A génszekvenciákat restrikciós hasítások alapján hat csoportba sorolták. A 43 következtetett aminosav-szekvencia mindegyike a TIR-NBS-LRR típusú csoportba tartozott. A csoportok variábilis szekvenciáira az N és C terminális irányába terveztek primereket, amiket az AFLP-RGA (Hayes és mts. 2000) technikához alkalmaztak. Ezeket a markereket a PPV-ellenálló heterozigóta 'Lito' fajta öntermékenyítésből származó F<sub>2</sub> hasadó populáció egyedein térképezték, de PPV rezisztenciához kapcsolt markert nem sikerült azonosítani. A 16 polimorf marker a korábban Vilanova és mts. (2003) által szerkesztett fizikai térkép 8 kapcsoltsági csoportja közül ötre térképeződött. Két lehetséges génklasztert határoztak meg a 6-os és 8-as kapcsoltsági csoporton, habár a DNS-szekvenciák alapján elmondható, hogy csak a 8. kromoszómán található régió tartalmaz stopkodon nélküli rezisztenciagén-homológokat. Az egyes kapcsoltsági csoportra térképezett markerek közül a *Prunus davidiana*-ból származó lisztharmat-rezisztencia lehetséges QTL-jéhez (quantitative trait loci) kapcsoltságot találtak, míg egy másik marker Vilanova és mts. (2003) által PPV rezisztenciáért felelős régióval mutatott kapcsoltságot.

A különböző RGA-családokra tervezett markerek több esetben azonos régiókba találhatók meg, ami megegyezik a Baldi és mts. (2004) által alma RGA vizsgálatakor megfigyelt jelenséggel, miszerint a fizikai távolság és filogenetikai távolság között korreláció van.

A kajszi esetében tapasztalt TIR-NBS-LRR és CC-NBS-LRR típusú RGA-k megjelenésének egyenlőtlen eloszlását összehasonlítva megállapították, hogy a vizsgált kétszikűeknél ez egyedülálló jelenség. Ezt azzal magyarázták, hogy a kajszi genomjában

valóban aránytalanul kis számban vannak jelen a CC-NBS-LRR típusú szekvenciák vagy az alkalmazott PCR technika nem megfelelő azok kimutatására (Soriano és mts. 2005).

Lalli és mts. 2005-ben összesen 42 RGA-t határoztak meg és térképeztek, amelyek az NBS-LRR, kináz, transzmembrán domén, patogénválasz (PR) proteinek és rezisztenciával kapcsolt transzkripciós faktorok közé tartoztak. Az RGA-k fizikai térképezését a BAC könyvtárakhoz való hibridizációval, térképező populáció nélkül végezték el. Számos próba olyan BAC klónokhoz hibridizált, amelyeken korábban már azonosítottak lisztharmat-rezisztencia QTL-eket. Ezen túl 3 amplifikált RGA a 7. kromoszómára a *Ma* gént tartalmazó régióba, míg másik 2 RGA a 2. kromoszómára, a *RMai* génnel mutatott kapcsoltságot. Mindkét gén fonálféreg-rezisztenciát biztosít *Prunus* fajokban.

Két RGA szekvencia kapcsoltságát mutatták ki Decroocq és mts. (2005) által meghatározott 1. és 7. kromoszóma Sharka rezisztencia QTL-jeivel. Nem találtak azonban a 6. kromoszómán elhelyezkedő, legerősebb hatású Sharka rezisztenciáért felelős QTL-ekhez kapcsolt szekvenciákat. Több RGA klónt térképeztek az 1. kromoszómának arra a régiójára, ahova Vilanova és mts. (2003) a Sharka rezisztenciát lokalizálták. A 3. kivételével az összes további kromoszóma tartalmazott RGA-kat. Összesen 26 NBS-LRR típusú RGA-t térképeztek őszibarackon, és ebből mindössze kettő volt CC-NBS-LRR típusú. Az illesztések mindkét NBS-LRR típusú csoport jelenlétét bizonyítják, de többségében TIR-NBS-LRR típusú RGA-kat izoláltak. Ezt az egyenlőtlen eloszlást őszibarack esetében azzal magyarázták, hogy a TIR-NBS-LRR típusú RGA-k nagyobb számban fordulnak elő a genomban, esetleg az amplifikáció során alkalmazott primerek ezeket a szekvenciákat nagyobb valószínűséggel szaporítják fel. A *Prunus* genomban a két csoport más régiókba térképeződött, hasonlóképpen, mint a lucernában és a szójában. Ezzel szemben az *Arabidopsis*-ban egy klaszterben mindkét csoportot térképezték Meyers és mts. (1999). A szőlő genomszekvencia alapján Velasco és mts. (2007) nem találtak arra példát, hogy a két csoport génjei egy klaszteren belül fordultak volna elő.

### **3.4.4 RGA markerek kapcsoltsága növényi rezisztenciákkal**

A molekuláris markerek azonosítása két stratégia alapján történhet. A homológiára alapozott marker készítésekor, primerek a már ismert szekvenciák alapján konzervált szakaszokra tervezhetők. Ezeket a markereket, amelyek már adott funkciójú gének szekvenciája ismeretében készülnek Andersen és Lübberstedt (2003) funkcionális

markereknek nevezte el. A második stratégia a szekvencia ismeret nélküli, véletlenszerű markerezési (RAPD, AFLP, ISSR stb.) technikák alkalmazása. A funkcionális RGA markerek használata elsősorban a fás szárú növények rezisztencia vizsgálatakor terjedt el, mert ezeknél a fajoknál térképező populációk hiányában ez a stratégia járhat sikerrel.

Az RGA markereket elsőként szőlőn Di Gaspero és Cipriani (2002) alkalmazta a peronoszpóra-rezisztencia vizsgálatára sikerrel. A három vadfaj (*V. amurensis*, *V. riparia*, *V. cinerea*,) és ellenálló interspecifikus hibridekben ('Seyval', 'Regent', 'Bianca') sikerült egy specifikusan megjelenő markert kimutatniuk, ami hiányzott a peronoszpóra-fogékony európai fajtáknál.

Donald és mts. (2002) szőlő lisztharmat rezisztencia vizsgálatakor három NBS típusú RGA markert azonosított a *Muscadinia rotundifolia* fajból származó *Run 1* lókuszhhoz kapcsoltan. A hasadó populáció 167 egyedén térképezték a markereket, két marker teljesen kapcsolt volt a *Run 1* génnel, míg a harmadik marker 2,4 cM távolságra helyezkedett el.

Calenge és mts. (2005) almából határoztak meg NBS típusú RGA szekvenciákat. A *Vr 2* ventúria rezisztenciagénnel talált kapcsolságot a második kapcsolsági csoportban, a *Pl-w* lisztharmat rezisztenciát tartalmazó régióba három NBS RGA markert sikerült térképezniük. A 'Durello di Forli' almafajtából származó *Vd* ventúria rezisztenciagénnel négy marker mutatott kapcsolságot.

### 3.5 Poligalakturonáz-gátló fehérjék

A növényi sejtfal egy összetett polimer vegyületekből álló rendszer, ami a sejtek elválasztást és szilárdítását biztosítja. A növényi sejtfal öt alapvető polimer vegyületből épül fel: cellulóz, hemicellulóz, pektin, glikoprotein, lignin. A sejtfal tulajdonképpen cellulóz mikrofibrillumok szövedéke, amely hemicellulózból és pektinből álló mátrixba ágyazódik be. A pektin típusú poliszacharidok minden magasabb rendű növényben előfordulnak, kétszikűekben az elsődleges sejtfal 35 %-át teszik ki, míg egyszikűekben csak 2-3 %, és a sejtfal elemeinek összetartásáért felelős vegyületek (Albersheim és mts., 1969). A pektint két fő polimer vegyület alkotja: homogalakturonán ( $\alpha$ -1-4 kapcsolódású galakturonsav), ramnogalakturonán (galakturonsav és ramnóz 2-4 kapcsolódása eltérő arabinóz és galaktóz oldaláncokkal). Ezek az elsődleges sejtfal középlemezét alkotják. A fiatal sejtfal elsősorban poliszacharidokból épül fel kis fehérje tartalom mellett, ami későbbiekben lignifikálódhat (Evert, 2006). Feladatai eltérőek, a sejt ozmotikus

nyomásával szembeni tartásával egyben a sejtek alakját is meghatározza, a növényi szövet szilárdságát adja, és a szállítórendszer falát alkotja. A sejtfa fontos szerepet tölt be a kórokozók szembeni ellenállóságban, mint elsődleges fizikai gát, és mint a lebontó enzimek terjedésének gátja (Albersheim, 1965). A növényi szövetek kórokozó általi kolonizálásának első lépése a mikrofibrillumokat kötő pektin poliszacharidok macerációja, lebontása. Poliszacharid bontó enzimeket a növények (Agrawal és Bahl, 1968), a gombák (Albersheim 1965) és a baktériumok (Ghuysen, 1968) egyaránt termelnek. A növényi kórokozók képesek enzimeikkel a növényi sejtfa poliszacharidjainak bontására (Albersheim és mts., 1969). Byrde és Fielding (1968) az alma monília fertőzésben a kórokozó pektinbontó enzimeinek szerepét bizonyította, ezek a fertőzési folyamatnak kulcsszereplői.

A kórokozó gombák meghatározott szénforrást tartalmazó táptalajban nevelve, a táptalajba az adott poliszacharidot bontó enzimet választják ki. A kórokozó gombák fejlődésük során meghatározott sorrendben választják ki a sejtfa bontásáért felelős enzimeket, amit Albersheim és mts. (1969) a *Colletotrichum lindemuthianum*, Jones és mts. (1971) *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* fajok vizsgálatakor igazolt. Mindkét esetben az endo-poligalakturonáz (PG) volt az elsőként termelt enzim. Ezek az enzimek kitisztítva megőrizték azt a tulajdonságukat, hogy különböző növényi sejtfalakról leemésztik a galakturonsavat. A poligalakturonáz enzimek képesek a növényi sejtfa pektinjeinek lebontását megkezdeni, e nélkül a sejtfa szerkezetét megváltoztató enzim nélkül a később szekretálódó poliszacharid-lebontó enzimek nem képesek a sejtfa pektinjeinek lebontására (Karr és Albersheim, 1970).

A növényi sejtfalból izolált fehérjék nem voltak hatással a *C. lindemuthianum* kórokozó gomba  $\alpha$ -arabinozidáz,  $\alpha$ -galaktozidáz, metil-celluláz, xilanáz, exo-poligalakturonidáz poliszacharid bontó enzimeire, viszont az endo-poligalakturonáz enzim hatásának gátlását figyelték meg (Albersheim és Andersona, 1971).

Gyümölcsfertőzési kísérletek során az extracelluláris pektolitikus gombaenzimek gátlását Byrde és mts. (1960) polifenolos vegyületek oxidáló hatásával magyarázzák. Mivel Fisher és mts. (1973) egyértelműen bizonyítják, hogy az általuk vizsgált fehérje a pektolitikus enzimek közül csak a PG-t gátolja, a korábban pektolitikus enzimek általános fenolos vegyületekkel történő gátlásától a folyamatot egyértelműen elkülönítették.

A jelenséget Fielding (1981) szilva, őszibarack, alma, körte, szőlő, moniliás és botritiszes gyümölcsfertőzésekor is megfigyelte. A kísérletben kivételt képzett a nem oxidatív módon fertőző *Penicilium sp.* (fenoláz-inhibitorokkal fertőző gomba), amely esetében nem volt PG-gátlás kimutatható a fertőzött almagyümölcsökből. A monilia és botritisz fertőzött gyümölcsök kivonatából nem volt kimutatható PG aktivitás, míg a fehérjekivonat izoelektromos fókuszálását követően a korábban is meghatározott izoelektromos ponton (pI 9-10) a poligalakturonáz aktivitás ismételten megjelent. A gátló vegyület 20 perces hőkezelés hatására, 40-70 C között, az enzimaktivitás folyamatosan csökkent, 100 C-on 5 perces kezelés az enzim aktivitását felére csökkentette.

Tripszines emésztés során a vegyület PG-gátló képessége megszűnt, így legalább egy fehérjealkotót valószínűsít Fielding (1981). Fontos megállapítás, hogy fertőzetlen gyümölcsmintákban nem volt kimutatható PG-gátló aktivitás, de ezek alapján nem volt eldönthető, hogy a fertőzés hatására keletkezik-e ez a vegyület, avagy folyamatosan megtalálható a szövetekben, de fertőzés hatására aktiválódik. A *Botrytis cinerea* PG enzimének gátlásáról számol be körte esetében Abo-Goukh és mts. (1983), és megállapítja, hogy a PGIP a körte érése folyamán termelődő endogén PG enzimére nincs hatással.

Babból Cervone és mts. (1987) izolálták az endo-poligalakturonázt gátló fehérjét (PGIP) és megállapították, hogy a PG-PGIP között kialakuló komplex eredményeként a PG enzim aktivitása teljes mértékben megszűnt. Később Cervone és mts.(1989) a PG enzim aktivitás gátlása mellett megállapították, hogy a pektin teljes hidrolízisének hiányában keletkező oligogalakturonsav származékok fitoalexin szerepet tölthetnek be. A sejtfal mátrixát alkotó pektin emésztéséből származó poliszaharidok hatására a zöldborsó hüvelyében a pisatin gombagátló fitoalexin akumlálódott (Walker-Simons és mts. 1983). A pektin emésztéséből származó oligogalakturon vegyületeket a bab és *Colletotrichum lindemuthianum* gazda patogén rendszerben aktív fitoalexinként határozták meg De Lorenzo és mts. (1990). Kísérleteik szerint három eltérő patogenitású *Colletotrichum lindemuthianum* izolátum azonos mértékben termelte az endo-poligalakturonáz enzimet, amik a pektinből elicitor aktív oligogalakturon sav származékokat emésztett le. Négy eltérő *Colletotrichum* fogékonyságú babfajtából ('Great Northern', 'Pinto', 'Red Kidney', 'Small Red') izolált PGIP fehérjék együttesen növelték az oligogalakturonsav származékok életidejét, a négy fajta PG aktivitásának gátlása között nem tapasztaltak eltérést. A négy eltérő érzékenységu babfajta PG-PGIP fehérjének kapcsolata, önmagában nem magyarázza

a fajták és kórokozó között megfigyelhető raszspecifikus rezisztenciát (De Lorenzo és mts. 1990).

A bab PGIP enzimének tripszines emésztésével Toubart és mts. (1992) aminosav-szekvencia szakaszokat határoztak meg. A gén 758 bp hosszúságú szakaszának klónozása az aminosavszekvencia alapján tervezett degenerált primerek alkalmazásával történt. A génszakaszt egy bab genomi könyvtárhoz hibridizálták és kiválasztották a PGIP gént tartalmazó klónt, meghatározták a 3,3 kB klón szekvenciáját. A genomi klón egy folyamatos leolvasási kerettel rendelkező 1026 bázispár (342 aminosav) hosszúságú gént tartalmazott. Sem a nukleotid-, sem a transzlált aminosavszekvencia nem mutatott hasonlóságot semmilyen addig ismert nukleotid- és aminosavszekvenciával. Mindegyik vizsgált szövetrészből (levél, szár, kallusz és virág) kimutatták a gén kifejeződését. A folyékony kultúrában nevelt kalluszokból a Northern-analízis során sokszorosan erősebb jelet kaptak a többi szövetrészhez képest. A cDNS klónok szekvenciája alapján megerősítették, hogy a gén nem tartalmaz intronokat. Stotz és mts. (1993) körteéből izolálták a PGIP gént és megállapították, hogy a Toubart és mts. (1992) által meghatározott bab PGIP gén aminosav-szekvenciájával 50 %-os egyezést mutat. A két gén az N terminálison egy feltételezhető szignálpeptid konzervált motívumban megegyezik. A gén két kópiában található meg a körtegenomban. A PGIP enzmről egyértelműen kimutatták, hogy egy glikoprotein és meghatározták az enzim glikozid részének összetételét. A gén kifejeződését a virágban és gyümölcsben mutatták ki, míg a levélszövetből nem. Az enzim aktivitása a gyümölcsben 200-szorosa volt a virágban mért aktivitásnak.

A bab PGIP paralóg génjei eltérő hatékonysággal képesek gátolni a különböző gombafajok PG enzimeit. A *Botrytis cinerea* PG enzimeit mindegyik bab PGIP fehérje képes gátolni, de eltérő hatékonysággal, míg a *Fusarium moniliforme* faj PG enzímére kizárólag a *PvPGIP2* gén hat. A két gén fehérje terméke között összesen nyolc aminosav eltérés van.

A *PvPGIP2* génnek a nyolc aminosav egyenként irányított mutagenézissel történt cseréje *PvPGIP1* gén szekvenciájára azt eredményezte, hogy minden esetben csökkent gátló hatást állapítottak meg a *F. moniliforme* PG gátlásában (Leckie és mts. 1999). A bab *PGIP1* enzimének 253 pozícióban található bázikus lizin glutaminra történő cseréje, a *F. moniliforme* PG enzim gátlását eredményezte. Ezek alapján megállapítható, hogy a PGIP gén kifejeződésének mértéke és a gén változatok együtt biztosíthatják a PGIP gének rezisztenciában betöltött szerepét.



Stotz és mts. (1994) paradicsom termésből izolálták a PGIP fehérjét. A körtéből és paradicsomból származó PGIP fehérjék a szürkerothadást okozó polifág *Botrytis cinerea* poligalakturonáz enzimaktivitásának gátlásakor a körtéből származó enzim 20-szoros gátló hatással rendelkezett a paradicsom PGIP fehérjéhez képest (Stotz és mts. 1993). A paradicsomból izolált cDNS szekvenciája alapján a bab PGIP aminosavszevenciájával 68% azonosságot, míg a körte PGIP aminosav szekvenciájával 50 %-os azonosságot mutatott. A szekvencia analízis során elsőként ismerték fel, hogy a PGIP gén tandem leucin gazdag ismétlődéseket (LRR) tartalmaz. A LRR régióról már korábban bizonyították, hogy fehérje–fehérje interakciókért lehet felelős, így a PG-PGIP összekapcsolódásának tényét ez megerősítette. Az első PGIP génnel történt sikeres transzformációs kísérletet Powell és mts. (2000) végezték el, a körte PGIP génjét építették paradicsom növénybe. A kontroll növényhez képest a paradicsom terméseken 15 %-kal, levélen 25 %-kal csökkent a *Botrytis cinerea* kártétele a transzformáns növények esetében. Később *Arabidopsis* (Ferrari és mts., 2003) szőlő (Aguero és mts., 2005), dohány (Joubert és mts., 2007) esetében bizonyították transzgénikus kísérletekkel a PGIP szerepét a növénypatogén PG gátlásában.

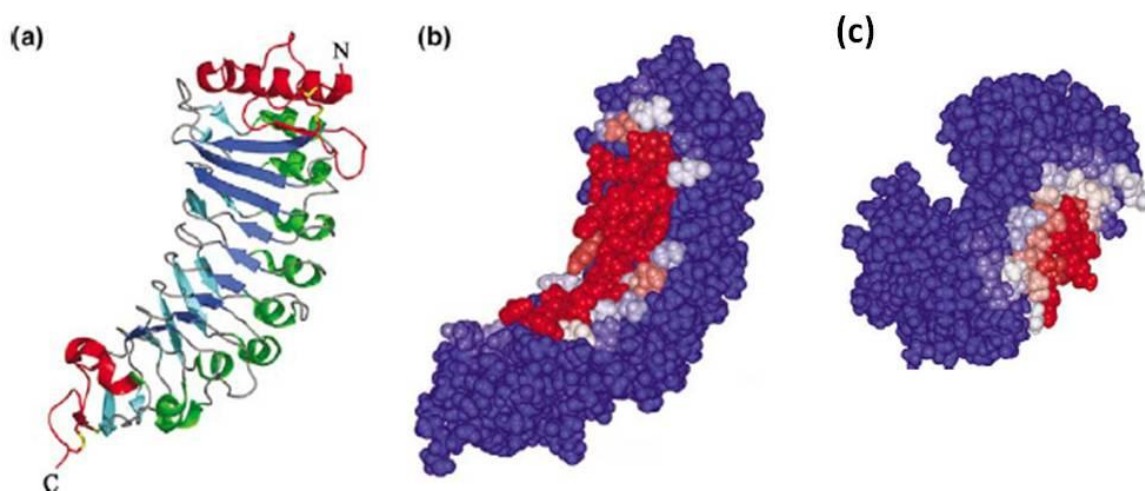
A PGIP gének expressziójának változását ventúria fertőzés hatására körte esetében Faize és mts. (2003) vizsgálták. Az ellenálló körtefajták esetében bizonyították, hogy a gén expressziója gyorsan (fertőzést követő nap) négyszeresére nőtt meg a fertőzés előtti állapothoz képest, és a két ellenálló fajta PGIP enzimeit 3-4 szeres gátló hatást okoztak a ventúria PG enzimének. Oliveira és mts. (2010) vizsgálták *Sclerotinia sclerotiorum* fertőzés hatására a PGIP gének expressziójának változását babon. A négy kópiában szereplő gén alléljai eltérő időpontokban és eltérő intenzitással expresszáltak a fertőzés hatására. A mechanikai sebzés hatására kizárólag egyetlen lókusztól származó allélok expresszáltak. A bab PGIP génjeinek megnövekedett expresszióját sebzés, oligogalakturonsav származékok és gombákból származó glukánázok okozták (Bergmann és mts. 1994).

Alma gyümölcsben a PGIP gén expressziója az érettség alapján változott, ami a Yao mts. (1999) szerint a gén a gyümölcsfejlődés során szabályozottan expresszál. A *Penicillium expansum* és *Botrytis cinerea* fertőzött gyümölcshúsban PGIP gének megnövekedett expresszióját tapasztalták, míg a fertőzetlen húsrészben nem emelkedett a gén kifejeződése. A gyümölcshús sebzésekor kisebb mértékű volt az expresszió változása mint a gombafertőzés hatására bekövetkezett növekedés. Az egy hónapos 0 °C

hőmérsékleten történő tárolási kísérlet során folyamatosan nőtt a PGIP gén expressziója az érett gyümölcsben. Ez alapján nemcsak a patogének ellen, hanem a gyümölcsfejlődés szabályzásában is szerepet játszik a PGIP fehérje (Yao és mts. 1999).

Az élővilágban megtalálható LRR proteinekét Kajava (1998) legkevesebb hat eltérő csoportba sorolta, amik egymástól független evolúciós eredettel rendelkeznek. A növényvilágban elterjedt extracelluláris LRR fehérjék konzervált szekvenciája: xxLxxLxLxxNxL(T/S)GxIPxxLGx (Kajava, 1998). Több LRR ismétlődés szükséges egy domén létrehozásához, aminek szerkezet patkó alakjához hasonlít. A fehérje belső oldalán helyezkednek el a  $\beta$ -lemezek egymással párhuzamosan, míg a fehérje külső oldalán az  $\alpha$  hélixek találhatók (Kobe és Deisenhofer, 1995).

A bab PGIP kristály szerkezetének vizsgálatakor Di Matteo és mts. (2003) megállapították, hogy a fehérje 10 LRR ismétlődésből áll. Az LRR ismétlődésekben két  $\beta$ -redő után egy  $\alpha$ -hélix következik (5. ábra). A fehérje belső konkáv oldala negatív töltésű, ami a PG enzim megkötését szolgálhatja. A *Fusarium moniliforme* poligalakturonáz pozitív töltésű aminosavainak (Arg-267 és Lys-269 ) kulcs szerepe van a PGIP2 enzim negatív töltésű részeihez történő kötődéskor.



**5. ábra.** *PvPGIP2* és a *F. moniliforme* PG fehérjék kristályszerkezete. 'a' kép: Szalagmodell ábrázolja a fehérje szerkezetét. Piros szalag az N és C terminálison található ciszteinben gazdag domént jelöli. Mindkét domént két diszulfidhíd köti a szolenoid szerkezetéhez. A központi extracelluláris domént tíz tandem ismétlődésű 24 aminosav hosszúságú LRR alegység alkotja. Három alegységből épül fel az eLRR rész. A fehérje belső (konkáv) oldalán a kézzel jelzett  $\beta$ -redő, a szolenoid külső oldalán találhatók a zöld spirállal jelölt  $\alpha$ -hélixek. Türkizkékkel a két oldal közti térben található nem szokványos  $\beta$ -redőket jelölték. 'b' kép: Pirossal jelölték fehérje kötésre képes részeket a fehérjén. 'c' kép: A *F. moniliforme* PG enzim kristályszerkezete, amin a fehérje–fehérje kapcsolódást kialakító részt piros színnel jelölték (Federici és mts., 2006).

## 4 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 Növényanyag

A vizsgált fajták és hibridek a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék szigetcsépi kajszai ültetvényéből származnak (6). Az ültetvényt 1990 és 2000 között telepítették 5x4 méteres térállásban, alanyként cseresznyeszilva magoncokat használtak. A mesterséges vesszőfertőzés a tanszék soroksári ültetvényében történt. A fertőzés a 'Korai zamatos' és 'Zard' fajták, és ezeknek 2003-ban történő keresztezéséből származó 48 utódon történt.

**6. táblázat.** A munkánk során vizsgált kajszai, cseresznyeszilva és japánszilva fajták és hibridek

Fajta neve	Származása	Nemesítő által megadott pedigree
<b>Aurora</b>	USA	RR17-62 × NJA-13 / Rutbhart
<b>Baneasa 4/11</b>	Ro.	Ismeretlen
<b>Ceglédi arany</b>	Mo.	Rózsabarack C. 1668 × Ceglédi óriás; 1994
<b>Ceglédi bíborkajszai</b>	Mo.	Véletlen magonc; 1953
<b>Ceglédi óriás</b>	Mo.	Tájszelekció, Izsák; 1953
<b>Ceglédi Piroska</b>	Mo.	Ceglédi óriás × Magyarkajszai C. 1789; 1995
<b>CR-2-63</b>	USA	Ismeretlen
<b>Effekt</b>	Ukrajna	Krupnoplodnij szabadmegporzású magonca
<b>Goldrich</b>	USA	Sunglo × Perfection
<b>Gönci magyarkajszai</b>	Mo.	Magyarkajszai szelektált klónja; 1960
<b>Harcot</b>	Kanada	(Geneva × Narmata) × Morden 604 × NJA1 (Perfection × Phelps); 1977
<b>Harmat</b>	Mo.	Salah szabadmegporzású magonca; 2002
<b>Karola</b>	Szlovákia	Kloboucka × Velkopavlovicka
<b>Kecs-psar</b>	Üzbegisztán	Helyi fajta Közép-Ázsiában; Kosztina, 1930
<b>Konkurencia</b>	Ukrajna	Effect × Priuszadebnij rannij
<b>Konzervnii pozdnij</b>	Ukrajna	Véletlen magonc
<b>Korai zamatos</b>	Mo.	Jubilar szabadmegporzású magonca; 2002
<b>Magyarkajszai C.235</b>	Mo.	Magyarkajszai szelektált klónja
<b>Mamaia</b>	Románia	(Ananas × Ananas) × (Tarzii de Bukuresti × Ananas); 1985
<b>Mandulakajszai</b>	Mo.	Ismeretlen; 1954
<b>Marculesti 18/6</b>	Románia	Ismeretlen
<b>Mari de Csanad</b>	Románia	Ismeretlen eredetű helyi fajta
<b>Nikitszkij</b>	Ukrajna	Krasznocsokij szelektált klónja

#### 6. táblázat folytatása

<b>NJA-8</b>	USA	Ismeretlen
<b>Orange red</b>	USA	Lasgerdi Mashhadi x NJA2
<b>1/33</b>	Mo.	<i>P. cerasifera</i> × <i>P. vulgaris</i>
<i>P. dasycarpa</i>		<i>P. cerasifera</i> × <i>P. armeniaca</i> spontán hibrid
<i>P. salicina</i> 'Methley'	USA	<i>P. salicina</i> × <i>P. cerasifera</i>
<i>P. cerasifera</i>		magonceredetű alany
<i>P. salicina</i> 'Burbank'	USA	<i>P. salicina</i> Burbank Luther által szelektált magonc
<b>Pannónia</b>	Mo.	Magyarkajsi × Borsi-féle kései rózsza
<b>Pisana</b>	Olaszország	ICAPI 26/5 szabadmegporzása; 1995
<b>Priuszadebnij rannij</b>	Ukrajna	Szamarkandszkij rannij x Krasznoscsoj
<b>Sulmona</b>	Románia	(Luizet × Umberto) × (Ananas × Ananas)
<b>Venusz</b>	Románia	(Umberto × Ananas) × (Luizet × Umberto)
<b>Zard</b>	Üzbegisztán	Zardalju szabadmegporzású magonca

#### 4.2 Szabadföldi természetes fertőzés megfigyelése

A szabadföldi természetes fertőzés megfigyelése a szigetcsépi ültetvényében történt három vegetációs időszakban. A vizsgálat első két évében történt védekezés a virágzáskori moniliás betegséggel szemben, fehérbimbós stádiumban és teljes virágzáskor Topas 100 EC penkonazol hatóanyagú gombaölőszerekkel (0,5 l/ha). A fertőzés mértékének felvételezése minden évben szíromhullást követően öt héttel történt, intenzív hajtásfejlődéskor. A betegség kategóriákat a teljes termőrészpusztulás százalékos értékének megfelelően alakítottuk ki (7. táblázat). Fajtánként legalább 4 egyedet vizsgáltunk legalább három éven keresztül, az ennél kevesebb egyeddel rendelkező genotípusokat nem értékeltük.

A *P. mume*, *P. sibirica* természetes vesszőfertőzését az MTA ÖBKI Vácrátóti Botanikus Kertjében található egyedeken tanulmányoztam 2009-2011 között.

**7. táblázat.** Monilia fertőzöttség bonitálási kategóriái

Betegség kategóriák	Elpusztult termőrészek (%)
0	0
0,5	1-5
1	6-10
1,5	11-15
2	16-20
2,5	21-25
3	>26

### 4.3 Fertőzési kísérletek

#### 4.3.1 Szabadföldi virágfertőzési és megporzási kísérletek

A mesterséges virágfertőzési kísérletek a szigetcsépi ültetvényben történtek. Két genotípus esetében a ‘Kecs-psár’ és ‘Goldrich’ fajta fáin fehér bimbós állapotban egész ágak összes virágát kasztráltuk, ami a szirmok és a porzók mechanikai eltávolítását jelentette. A kasztrált ágak felét ‘Pannónia’ fajta pollenjével poroztuk be, míg az ágak másik felét megporozatlanul hagytuk. Ezzel párhuzamosan kijelöltünk kezeletlen szabadelvírázású ágakat pozitív kontrollként mindkét vizsgált fajtán. A kasztrálást követő napon az ágakat 500 konídium/ml szuszpenzióval permetezzük le. A vizsgált ágakon a monilia fertőzést teljes szirmhullást követően egy héttel felvételeztük, megszámoltuk a fertőzött és ép virágok számát. A növényvédelmi kezeléstől a vizsgált ágakat fóliatakarással óvtuk. Az elpusztult vesszőrészekből a kórokozót burgonya dextróz agar (PDA, Duchefa) táptalajon izoláltuk vissza, és a táptalajon fejlődő gombatelep morfológiája alapján azonosítottuk.

#### 4.3.2 Mesterséges vesszőfertőzés

A mesterséges fásrészek fertőzését elsőként a Crossa-Raynaud (1969) módszerével kíséreltük meg. A virágzás után két héttel két-három éves levágott ágakat fertőztünk a hánccszövetben ejtett sebeken *M. laxa* által átnőtt PDA korongokkal és nedves környezetben tartva inkubáltuk. Az ellenálló ‘Zard’ fajta levágott kétéves ágainak mesterséges próbafertőzéseket követően azt tapasztaltuk, hogy az ágak teljes hosszán a hánccsrész elpusztult, ezért ezt a fertőzési technikát nem alkalmaztuk. A továbbiakban

ennek a technikának egy, az egyéves vesszők fertőzésére átalakított változatát kíséreltük meg elvégezni. A vizsgálathoz az ellenállóságot mutató 'Zard' és erősen fogékony 'Korai zamatos' fajták egy-egy példányát és ezek keresztezéséből származó 48 egyedből álló utódpopulációját használtuk. A mesterséges vesszőfertőzési kísérleteket a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékének soroksári kajsziültetvényében végeztük 2009. szeptemberében és 2011. októberében. Fánként legalább öt vesszőn két-két pontban 3-7 mm hosszú sebzést ejtettünk a levélalappal szemben és a vessző háncsszövege alá *M. laxa* által kolonizált 2 mm átmérőjű táptalaj korongot helyeztünk, majd fóliával tekertük be. A fertőzés kiértékelése 2010. januárjában 15 héttel a fertőzés után, és 2011. novemberében 8 héttel a fertőzést követően a vesszők begyűjtésével és feldolgozásával folytatódott. Az elhalt szövetrész hosszát és a fertőzési helynél a vessző átmérőjét tolómérővel mértük meg, a vessző háncsszövetének történő felvágását követően. A 2 mm-nél vastagabb vesszőknél mintánként megmértük az elpusztult szövet hosszát és kiszámítottuk az így nyert adatok átlagát. Statisztikailag összehasonlítottuk a fenti értékeket a fertőzést követő szöveti elváltozások jellemzői alapján fogékornak vagy ellenállónak ítélt egyedek esetében. A statisztikai tesztek előfeltételeit (adatok normál eloszlása, varianciák homogenitása) ellenőriztük, ezek eredményei alapján, ahol kellett, nem-parametrikus tesztet alkalmaztunk. Ezek az adatok normál eloszlását nem igénylő Mann-Whitney-teszt és varianciák homogenitását nem igénylő Welch-teszt voltak. A szülő és utódok fertőzött vesszőin vizsgáltuk a fertőzött vesszők hosszának és a vesszők átmérőjének korrelációját. Mivel a parametrikus Pearson-korreláció egyik előfeltétele (adatok normál eloszlása, Shapiro-Wilk teszt  $p < 0,05$ ) nem teljesült, ezért nem parametrikus Spearman-korrelációt végeztünk. Az analízisek a Statistica 8.0 szoftver segítségével készültek.

#### 4.3.3 Laboratóriumi kísérletek

A virágrészek érzékenységet a *Monilinia laxa* kórokozóval szemben 0,5 % agar (szirom) illetve ½ PDA (bibe és porzósálak) táptalajra helyezve vizsgáltuk. Az ültetvényből begyűjtött bimbós vesszőket, ágakat üvegházban hajtattuk meg és a felnyílás előtti virágokról a szirmot, bibét és a porzósálakat a vacokkal együtt virágról leválasztva petricsészébe helyeztük sötétbe, 10 °C-ra. A sziromfertőzést 10 µl szuszpenzióval (10 konídium/µl) a szirom színi oldalán végeztük. Negatív kontrollként desztillált vizet alkalmaztunk. A bibe és porzósálak fertőzésekor a PDA táptalajon fejlődő micélium elé

helyeztük a virágrészeket. A bibéből kiválasztódó ribonukleázok kimutatását agar táptalajon Halász (2007) leírása alapján végeztük.

A micélium fejlődésének vizsgálatakor a 'Ceglédi óriás' virágainak kinyílása előtt a bibéit 200 µl-es csőbe helyeztük lefelé (3db/cső) és 50 µl desztillált vizet pipettáztunk rá. Egy éjszakán át 20 °C-on ráztuk 50 rpm-mel. Folyékony táptalajként friss burgonya főzőlevét használtuk. 50 g friss hámozott burgonyát 500 ml vízben megfőztünk és 70 g/m<sup>2</sup> szűrőpapíron keresztül megszűrtük. 500 µl folyékony táptalajhoz 25 µl bibekivonatot adtunk. A micélium fejlődését a kísérlet 12., 24., 72. órájában vizsgáltuk meg fénymikroszkóppal.

A levélfertőzőési kísérletnél két héttel a szíromhullást követően zöld hajtásokat gyűjtöttünk a 'Zard' és 'Orange red' fajtákról és ezekről 20-20 darab 3-8 cm hosszúságú levelet desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírra helyeztük Petri-csészékbe.. A lezárt Petri-csészéket fényszekrénybe (20 °C, 12 órás megvilágítottság) helyeztük. Ezt követően a levelek turgorának kialakulásakor a levéllemezek közepére, színi oldalon 6 mm átmérőjű *M. laxa* által átszőtt agarlemezt helyeztünk, kontrollként steril agarlemez korongokat helyeztünk mindkét fajta 5-5 levelére.

#### **4.3.4 Mikroszkópos vizsgálatok**

A mesterségesen és természetesen fertőzött növényi részeket Leica MZ6 sztereomikroszkóppal, Carl Zeiss Jena Jenalumar fénymikroszkóppal és a BCE Központi Laboratóriumában Tesla BS 300 típusú pásztázó elektromikroszkóppal vizsgáltuk. A minták előkészítése a központi laborban az alábbi protokoll szerint történt. A virágmintákat 5 %-os glutáraldehidben történő három órás kezelés után, 1 %-os ozmium-tetroxidos áztatás követte két órán át. A dehidrációt, egyre töményebb, majd végén abszolút acetonnal végeztük. A minták acetontól történő tisztítása 7,2 pH-jú foszfátpufferrel történt. A szárítás CPD 020 típusú készülékben végeztük egy éjszakán át. A minták felületének vezetőképeségét 30nm vastag aranyréteg felvitel biztosította, amit CPD 040 típusú katódporlasztó készülékkel végeztünk. A virágrészeket elektronmikroszkóp alatt értékeltük, s a fertőzőési pontokról fényképfelvételeket készítettünk 25-4000-szeres nagyítással.

## 4.4 Molekuláris vizsgálatok

### 4.4.1 DNS- alapú kísérletek

#### 4.4.1.1 DNS-izolálás

A genomi DNS izolálása teljesen kifejlett fiatal levelekből történt DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) használatával. A DNS minőségét 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük. A DNS-oldat koncentrációját és tisztaságát Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel (Bio-Science Kft, Budapest) határoztuk meg. A PCR reakcióhoz használt DNS mintákat, amennyiben szükséges volt, 20 ng/μl koncentrációra hígítottuk.

#### 4.4.1.2 PCR-technika az NBS szekvenciák meghatározására

Az NCBI adatbankban 9 növényfajból izolált NBS-LRR típusú rezisztenciagének szekvenciái közül kiválasztottunk 26 szekvenciát, melyek közül 8 a TIR-NBS-LRR, 18 pedig a CC-NBS-LRR típusú RGA családba tartozik. A felhasznált szekvenciák között 11 lúdfű, 4 paradicsom, 3 rizs, 2 burgonya, 2 len, 1 sárgadinnye, 1 napraforgó, 1 paprika és 1 dohány szekvencia szerepelt. A nukleotid- és aminosav-szekvenciákat a ClustalW program (Thompson és mts., 1994) alkalmazásával illesztettük. Az illesztett szekvenciákra manuálisan terveztük meg a degenerált primereket. A degenerált nukleotidok jelölését GCG szabvány szerint végeztük. A tervezett primerek permutációs indexének maximuma 10 000-szeres volt. A primerek szekvenciáját a **8. táblázat** mutatja be.

Használtuk továbbá a Soriano és mts. (2005) által is alkalmazott, Gentzbittel és mts. (1998) által a P-loop [GxGxxGR(T/S)] motívumra tervezett P-loopGent F, illetve a Kanazin és mts. (1996) által a HD (GLPLxL) motívumra tervezett LM637 R primereket. A primereket a gödöllői Biomi Kft. ABI 3400 készülékkel (Applied Biosystem) szintetizálta.

Az amplifikációhoz a körülményeket gradiens PCR technikával optimalizáltuk az alábbi program szerint: kezdeti denaturálás 94 °C 2 min, majd 35 cikluson keresztül: 94 °C 30 sec, 48-60 °C (oszloponként növekvő) 45 sec, 72 °C 1 min, végül 72 °C 5 min.

A PCR-hez 20-30 ng genomi DNS-t használtunk 25 μl végtérfogathoz. Az 1×PCR puffer (Promega) végső koncentrációja 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl és 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,4 μM az adott primerekből és 0,625 U GoTaq DNS-polimeráz (Promega). A továbbiakban a P-loop F és HD R primerek kötődési hőmérséklete 48 °C, a P-loopGent F és LM637 R primerereké pedig 54 °C volt. Az amplifikáció PTC 200 (MJ Research) típusú PCR gépben történt.



**8. táblázat.** Az NBS-LRR típusú rezisztenciagénekre tervezett degenerált primerek szekvenciái és permutációs indexei

Primer	Szekvencia 5'–3'	Permutációs index	Forrás
CUB P-loop F	5'-RTT GNA TGG GNG GNN TDGG-3'	1536	saját tervezés
CUB Kin2 F	5'-TND TNH TNG ATG AYR TNT GG-3'	9216	saját tervezés
CUB HD R	5'-GCY ARW GGY AVH CCW YYA CA-3'	1152	saját tervezés
P-loopGent F	5'-GAA TGG GKG GAG TYG GYA ARA C-3'	16	Gentzbittel és mts. (1998)
LM637 R	5'-ARI GCT ARI GGI ARI CC-3'	2048	Kanazin és mts. (1996)

M=A+C, S=C+G, Y=C+T, R=A+G, W=A+T, N=A,+T+G+C,

1 %-os TBE agaróz gélen [1x TBE (12,11 g Tris; 5,135 g bórsav; 0,372 g EDTA 1000 ml desztillált vízben), 1 % agaróz] megfuttattuk az így kapott mintákat, melyeket etidium-bromidos festéssel UV fény alatt tettünk láthatóvá. A kívánt hosszúságú fragmentumokat az 1 %-os agaróz gélből kivágtuk. A minták gélből való kitisztítása QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) segítségével történt.

#### 4.4.1.3 SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

A pozitív klónokból származó PCR terméket egyszálú konformáció polimorfizmussal vizsgáltuk. A PCR termékből 8 µl-t, és a denaturáló stop festékből (FDE) (98 % deionizált formamid, 2 % 0,5 M-os EDTA, 0,2 % brómfenolkék, 0,2 % xylene cianol kék) 7 µl-t mértünk össze és 5 percig 95 °C-on denaturáltuk. Natív 10 %-os 0,8 mm vastag poliakrilamid gélen (19:1 akrilamid: bis –akrilamid v/v) 4 °C-on 24, illetve 48 órát futtattuk, 180 V feszültségen. A gélek ezüsfestését Schumacher és Randles (1983) leírása alapján végeztük.

#### 4.4.1.4 A PCR-termékek klónozása és DNS-szekvenciájuk meghatározása

A gélből izolált PCR termékeket a pGEM-T Easy plazmid vektorba (Promega, USA) klónoztuk a gyártó útmutatásai szerint. A klónozott fragmentumokkal JM109 kompetens sejteket transzformáltunk. A teljes ligációs elegyet 80 µl –70 °C-on tárolt

kompetens baktériumszuszpenzióval finoman összeráztuk, majd 20 percen át jégen tartottuk, azután 45 másodpercre 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük 2 percig. Végül 950 µl 37 °C-os folyékony, antibiotikum mentes LB táptalajt adtunk hozzá (10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, pH=7), és másfél óráig rázattuk 37 °C-on, 150 rpm fordulatszámmal. Ezután 100–400 µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk LB /ampicillin/IPTG/X-gal szilárd táptalajon: 10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 7 g/l agar, 100 µg/ml ampicillin pH=7; a plate felszínén 100 mM IPTG-t és 50 mg/ml X-galt oszlattunk szét, fél óráig 37 °C-on tartottuk a szélesztés előtt. A kész plate-eket fordított helyzetben 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A baktérium kolóniák színéből következtetni tudtunk a ligálás sikerességére. A kék színű, negatív klónok nem tartalmazták az inszertet. A fehér, pozitív klónokat kolónia-PCR-rel ellenőriztük, hogy valóban tartalmazzák-e az általunk várt 500 bp körüli inszertet, a plazmidra tervezett M13 R és F primer kombinációval. Minden jól elkülöníthető, fehér színű telepet előbb átoltottunk steril fogpiszkáló segítségével egy masterplate-re, majd ugyanezt a fogpiszkálót helyeztük a kolónia PCR mixbe. A masterplate-en a telepeket egy éjszakán át 37 °C-on szaporítottuk fel. A megfelelő méretű inszertet tartalmazó klónokat tovább szelektáltuk egy *semi-nested* polimeráz láncreakcióval, amelyben a HD R vagy LM637 R mellett a Kin2 F CC-NBS-LRR specifikus primert használtuk a következő programban: denaturáció 94 °C-on 2 min, majd 30 cikluson keresztül 94 °C 30 sec, 56 °C 45 sec és 72 °C 1 min, végül 72 °C további 1 min. A 25 µl végtérfogathoz itt is ugyanazokat az arányokat használtuk. Az 1×PCR puffer (Promega, USA) végső koncentrációja 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl és 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM az adott primerekből és 0,625 U *Taq* DNS-polimeráz (Promega, USA).

A pozitív minták plazmid DNS-ének izolálását EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (Biocenter Kft., Szeged), végeztük. Szekvenciájuk meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) automata DNS-szekvenátorral történt a Biomi Kft. gödöllői laboratóriumában.

#### **4.4.2 RNS-alapú kísérletek**

##### *4.4.2.1 Génexpressziós kísérletekhez történt mintagyűjtés*

A mintákat a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék szigetcsépi ültetvényében szedték a ‘Zard’ fajtáról két alkalommal: kettő illetve négy héttel a teljes virágzást követően, míg az ‘Orange Red’ fajtáról két héttel a teljes virágzást

követően gyűjtöttük az ép és fertőzött mintákat. A nem fertőződött valamint a természetes virágfertőzést mutató vesszőket levágtuk és a gyors csomagolást és feliratozást követően szárazjégben illetve folyékony nitrogénben szállítottuk be a tanszéki laboratóriumba, ahol a feldolgozásig -80 °C -on tároltuk.

#### 4.4.2.2 RNS-izolálás és egyszálú cDNS szintézis

A begyűjtött vesszőkből a fertőzés alatti ép háncsszövetről lelángolt szikével körben 1 cm-es szakaszt hámoztunk le, majd steril dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel porrá morzsoltuk. Az ép vesszőkből hasonlóan vettünk mintát. A ribonukleinsav-kivonást forró bórsavas extrakciós módszerrel végeztem Wan és Wilkins (1994) leírása alapján. A minták tisztaságát és mennyiségét Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel (Bio-Science Kft, Budapest) és minőségét 1 %-os TBE agaróz gélen ellenőriztük.

A cDNS szintézisét a First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Sciences, Biocenter Kft, Szeged) felhasználásával végeztük 5' végén biotin jelölt oligo dT (18 bp) indítószekvencia alkalmazásával a gyártó utasításai szerint.

#### 4.4.2.3 Kétszálú cDNS szintézis

Az egyszálú cDNS-t kiegészítő második szál szintézisét DNS-polimeráz I és RNáz H enzimek alkalmazásával végeztük az alábbiak szerint mintánként: 10x DNS-polimeráz I. puffer 10 µl, RNáz H (*E. coli*, 5 U/µl) 0,2 µl, DNS-polimeráz I. (*E. coli*, 10 U/µl) 2,2 µl, MQ-víz (ioncserelő gyantán (Milli-Q) megsűrűt desztillált víz) 67,6 µl, egyszálú cDNS 20 µl. A mintákat 15 °C-on két órán keresztül inkubáltuk. A protokolltól eltérve nem alkalmaztuk a második szál egységeinek összekapcsolásához ajánlott *E.coli* ligázt.

A ds cDNS végterméket kitisztítottuk. A 100 µl ds cDNS termékhez 200 µl MQ-vizet adtunk, majd 300 µl fenol:kloroform:izoamil-alkohol (25:24:1 v/v) keverékével extraháltuk. Ezt követően a mintákat 12 000 rpm fordulatszámon, 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázist tiszta csövekbe vittük át. A mintákat 300 µl kloroform:izoamil-alkohol (24:1 v/v) keverékével extraháltuk, majd 5 percig újra centrifugáltuk. A vizes fázist tiszta csőbe pipettáztuk át, majd hozzáadtunk 30 µl 4 M-os nátrium-acetátot, és 2,5x-es térfogatú -20 °C-os, 96 %-os etanollal (750 µl) kicsaptuk és 1 óráig -20 °C-on inkubáltuk. Ezt követően 13 000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A mintákat 500 µl 70 %-os, -20 °C etanollal kétszer mostuk, majd végül a mintákat vákuumcentrifugában leszárítottuk. A kétszálú cDNS-t 30 µl MQ vízzel

oldottuk vissza. A minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 1000 típusú spektrofotométerrel (Bio-Science Kft, Budapest) ellenőriztük.

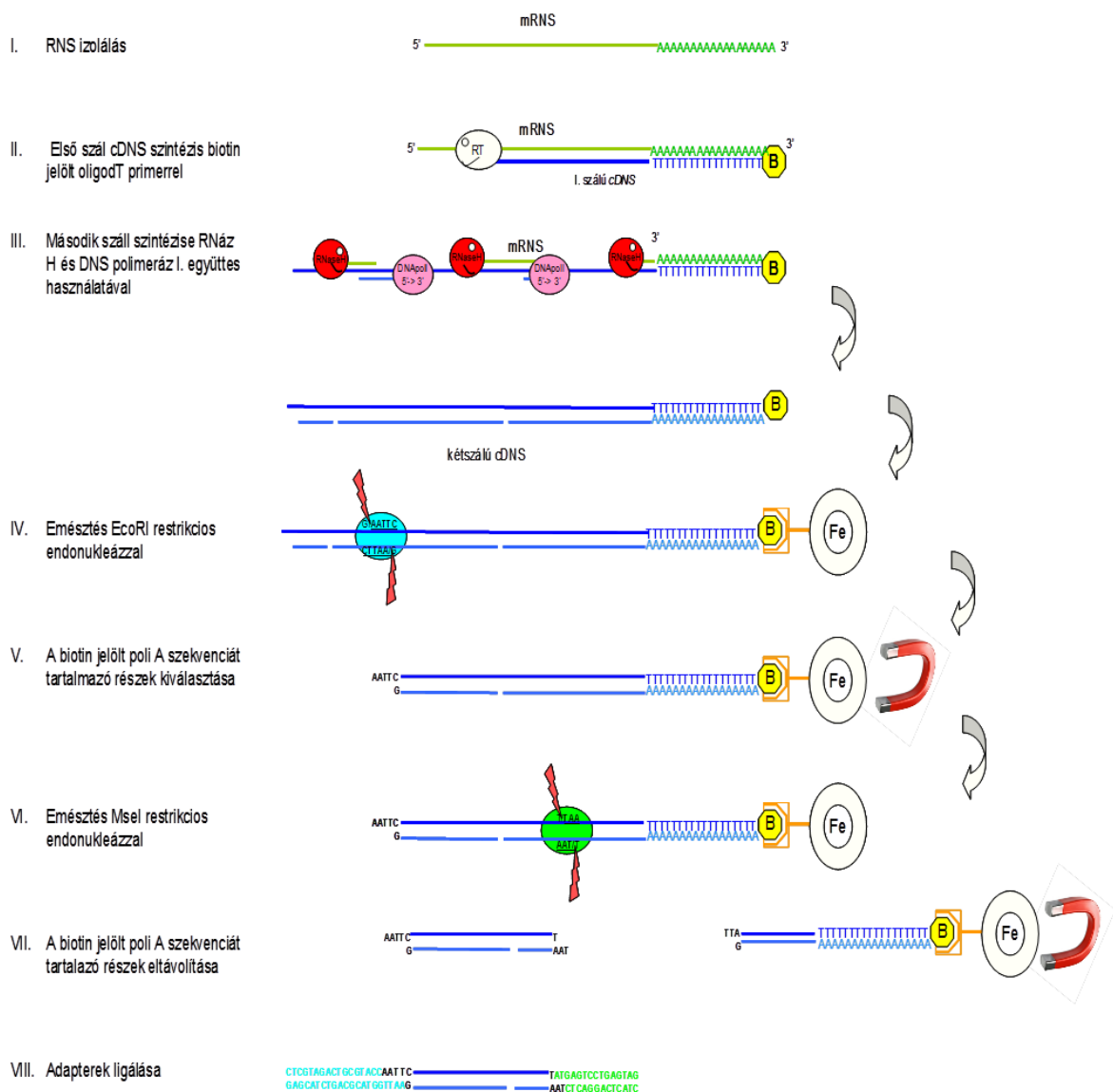
#### 4.4.2.4 cDNS AFLP

A cDNS AFLP technikát Vuylsteke és mts. (2007) leírása alapján végeztük, kisebb módosításokat alkalmazva. A technika lépéseit a **6.** mutatja be. Az első emésztés előtt a mintáinkat 25 ng/μl koncentrációra hígítottuk. Az első restriktív emésztést a *EcoRI* enzimmel végeztük az alábbi mintánkénti összetétellel: MQ-víz 15 μl, 10x Reakció puffer (Red) 4 μl, *EcoRI* (10 U/μl) 1 μl, kétszálú cDNS (25 ng/μl) 20 μl. Az emésztés 3 órán át 37 °C-on történt.

A biotin-jelölt részek kinyerését Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen) gyöngyökkel végeztük. Mintánként 10 μl Dynabeads oldatot szuszpendáltunk fel 100 μl 2xSTEX (40 ml NaCl (5 M), 2 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 400 μl 0.5 M EDTA, 2 ml TritonX-100 100 ml-re MQ vízzel kiegészítve) oldatban. Mágneses cső állványban összegyűjtöttük a vas gyöngyöket és leszívtuk az oldatot. A második aktiváló mosás 40 μl 2xSTEX pufferben történt. Az első emésztésen átesett mintákat (40 μl) a már felületaktív Dynabeads gyöngy szuszpenzióval (40 μl) kevertük össze.

Ezután a mintákat a mágneses állványba helyeztük, a felülúszót óvatosan leszívtuk, majd a kitapadt vasionos részt 100 μl 1xSTEX-sel mostuk, új csőbe pipettáztuk tovább. Ezt a lépést négyszer ismételtük. Az utolsó mosásnál a mágnessel összegyűjtöttük a gyöngyöket, a felülúszót eltávolítottuk, majd 30 μl T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> pufferrel (1 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0, 20 ml 0.5 M EDTA 100 ml végtérfogatra kiegészítve MQ-vízzel) a gyöngyöket felszuszpendáltuk és új csőbe pipettáztuk át.

A második restriktív endonukleázos emésztésnél a *TruI* enzimet választottuk, ami az *MseI* restriktív endonukleáz izoskizomerje. A mintákhoz (30 μl) a következő összetevőket adtuk: MQ-víz 5 μl, 10x puffer R 4 μl, *TruI*. (10 U/μl) 1 μl. Az emésztés 65 °C-on 2 órán át tartott PTC 200 (MJ Research) típusú PCR készülékben. Az emésztést követően mágnessel a gyöngyöket összegyűjtöttük, és a felülúszót (40 μl) új csőbe pipettáztuk át.



**6. ábra.** A cDNS AFLP ‘One gene-one tag’ (Vuylsteke és mts., 2007) sematikus ábrája.

A második emésztést követő szelekciós lépéssel kizárólag a két végén eltérő ragadós végekkel rendelkező DNS szakaszok alakultak ki a két eltérő emésztés hatására (*TruI* 5'-TA-3' és *EcoRI* 5'-AATT-3'). A végső mintaszál a ragadós végekhez történő adapterek ligálásával készült el (**9. táblázat**). A ligációs reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta mintánként: MQ-víz 5,34 µl, 10x reakciós puffer 1 µl, T4 DNS-ligáz (1 U/µl) 1 µl, ATP (10 mM) 1 µl, *EcoRI* (10 U/ul) 1 µl, *TruI* adapter (150 pmol/µl) 0,33 µl, *EcoRI* adapter (15 pmol/µl) 0,33 µl.

A ligációs mix hozzáadása után a mintákat 3 óráig, 37 °C-on inkubáltuk, ezután pedig 50 µl T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> puffert adtunk hozzá. Ezzel az eljárással mintánként 100 µl templátot kaptunk.

**9. táblázat.** Az adapterek szekvenciái

<i>Eco</i> RI adapter	5'CTCGTAGACTGCGTACC 3' CTGACGCATGGTTAA
<i>Tru</i> I adapter	5'GACGATGAGTCCTGAG 3' TACTCAGGACTCAT

A cDNS AFLP első polimeráz láncreakciója (preamplifikáció) szelektív nukleotidot nem tartalmazó indítószekvenciákkal (**10. táblázat**) készült az alábbi összetétellel: MQ-víz 30,5 µl, 10x puffer 5 µl, MgCl<sub>2</sub> (20 mM) 5 µl, dNTP mix (10 mM) 1 µl, *Eco*RI+0 primer (50 ng/µl) 1,5 µl, *Tru*I+0 primer (50 ng/µl) 1,5 µl, Dream*Taq* (5 U/µl) 0,5 µl. A PCR elegyhez 5 µl templátot adtunk és a következő programot állítottuk be a PTC 200 típusú (MJ Research) PCR készüléken: 94 °C 3 min, 25 cikluson keresztül 94 °C 30 s, 56 °C 1 min és 72 °C 1 min, végül 72 °C 5 min. A mintákból 5 µl-t 1 % TBE agaróz gélen választottunk el, és etidium bromidos festéssel tettük láthatóvá. A mintákat 600-szorosra hígítottuk T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> pufferrel.

A cDNS AFLP második polimeráz láncreakciójánál 3 szelektív nukleotidot tartalmazó indítószekvenciákat alkalmaztunk a

**11. táblázatban** bemutatott kombinációk szerint az alábbi összetétellel: MQ víz 9,65 µl, 10xDream*Taq* puffer 2 µl, *Eco*RI+3 primer (1 pmol/µl) 0,05 µl, *Mse*I+3 (10 ng/µl) 0,3 µl, Dream*Taq* polimeráz (5 U/µl) 0,3 µl, MgCl<sub>2</sub> (20 mM) 2 µl, dNTP mix (10 mM) 0,4 µl. A 600-szorosra hígított prePCR termékekből 5 µl-t használtunk templátként a reakciókban. Az alkalmazott PCR program: 94 °C 3 min, 13 cikluson keresztül 94 °C 30 s, 65 °C 30 s ciklusonként 0,7 °C-al csökkentve és 72 °C 1 min, a 14. ciklustól további 22 cikluson keresztül 94 °C 30 s, 56 °C 30 s és 72 °C 1 min, végül 72 °C 5 min. A reakció sikerességét a poliakrilamid gélelektroforézis előtt 1 %-os TBE agaróz gélen ellenőriztük.

**10. táblázat.** A cDNS AFLP reakció során alkalmazott primerek, piros színnel vannak jelölve a restrikciós emésztés eredményéül kialakult ragadós végek, míg kékkel a szelektív nukleotidok.

Primer neve	Szekvencia 5'–3'
<i>MseI</i> + 0	5'- GATGAGTCCTGAGTAA
<i>EcoRI</i> + 0	5'- GACTGCGTACCAATTC
<i>MseI</i> + CTT	5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTT
<i>MseI</i> + CAG	5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAG
<i>EcoRI</i> + ACC	5'- GACTGCGTACCAATTC ACC

**11. táblázat.** Az alkalmazott primer kombinációk

Primer kombináció száma	
I.	<i>EcoRI</i> + ACC és <i>MseI</i> . + CTT
II.	<i>EcoRI</i> + ACC és <i>MseI</i> . + CAG
III.	<i>EcoRI</i> + 0 és <i>MseI</i> + CTT
IV.	<i>EcoRI</i> + 0 és <i>MseI</i> + CAG

#### 4.4.2.5 Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A mintákat 8 %-os denaturáló akrilamid gélen választottuk el Sequi-Gen (BioRad, Budapest) vertikális elektroforézis készülékkel. Az üveglapok akrilamiddal érintkező oldalát elsőként 97 %-os alkohollal megtisztítottuk. Az futtatókészülékkel összeépített üveglapot (hosszú) 500 µl Repel Silane (Promega, USA) oldattal kezeltük, ez biztosítja a gél és az üveglap elválását. A gél tapadását a másik (rövid) üveglaphoz Bind Silane (Promega, USA) kezeléssel (5 µl Bind Silane, 5 µl 96 %-os ecetsav, 5 ml 95 %-os etilalkohol) biztosítottuk. A keveréket egyenletesen eloszlattuk az üvegfelületen, majd az elpárolgást követően a kezelt lapot áttöröltük 95 %-os etanollal, ezután 5 percig száradni hagytuk. A készüléket ezután raktuk össze. Az üvegfelületek kezelését elszívófülke alatt végeztük. A 100 ml, 8 %-os gél a következőképpen készült: 20 ml 40 %-os akrilamidhoz (19:1 akrilamid: bis–akrilamid v/v) hozzáadtunk 45 g ureát (Reanal, Budapest) (10x), majd 10 ml 10xTBE-t. Ezt 100 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel. Miután az urea teljesen feloldódott 0,1 g ammónium-peroxi-diszulfátot (APS) (Reanal, Budapest) 1000 µl

desztillált vízben feloldottunk csőben. Ebből 500 µl-t tettünk bele az akrilamid oldatba. Közvetlenül a két üveglap közé juttatás előtt az oldathoz hozzáadtunk 100 µl tetrametil-etilén-diamint (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA), hogy a polimerizációt beindítsuk. A polimerizáció 30 perc alatt ment végbe, a gél 38 °C-ra melegítettük elő 80 W-on. Ezt követően 6 µl PCR tereméket, 2 µl FDE festékkel (10 ml deionizált formamid, 200 µl 0.5 M EDTA (pH 8,0), 10 mg xylene cyanol) elkevertünk és 92 °C-on 5 percig denaturáltuk PCR készülékben, majd a mintákat a gélre történő felvitelig jégen tartottuk. A minták elválasztása állandó teljesítmény mellett 80 W-on 5 órán át történt. A denaturáló akrilamid gél ezüstfestését Bassam és Gresshoff (2007) leírása alapján végeztük, amit a vizuális értékelésük követett.

A gélből a visszaizolálandó fragmentumokra 50 µl MQ vizet pipettáztunk és lelángolt szikével a gél darabot kivágtuk, majd gél lefénnyképeztük. A kivágott darabokat 100 µl T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> pufferben 4 °C-on tartottuk egy órán át, majd a felülúszót új csőbe pipettáztuk.

A gélből kitisztított fragmentumok felszaporításához (reamplifikáció) polimeráz láncreakciót végeztünk az eredeti reakció indítószekvenciáival az alábbi összetevőket alkalmazva mintánként: MQ-víz 10 µl, 10xDream*Taq* puffer 2 µl, *Eco*RI+3 primer (1 pmol/µl) 0,05 µl, *Mse*I+3 (10 ng/µl) 0,3 µl, Dream*Taq* polimeráz (5 U/µl) 0,3 µl, MgCl<sub>2</sub> (20 mM) 2 µl, dNTP mix (10 mM) 0,4 µl, templát DNS 5 µl. A reakció során az AFLP második polimeráz láncreakciójának programját használtuk.

A PCR termékeket 1 %-os TBE agaróz gélen ellenőriztük és azoknál a mintákat, ahol egy határozott csíkot kaptunk szekvenálásra kitisztítottuk. A tisztításhoz 5 µl mintához 0,5 µl (10 U) Exonuclease I-et (Fermentas, Biocenter, Szeged), és 1 µl (1 U) FastAp Thermosensitive Alkaline Phosphatase-t (Fermentas, Biocenter, Szeged) adtunk. Ezután PCR készülékben 37 °C-on 15 percig inkubáltuk. A reakciót 85 °C-os, 15 perces inkubálással zártuk le. Ezután a mintákat az eredeti primereket alkalmazva ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készülékkel a szegedi Baygen Sequencing Platform szolgáltató cégnél szekvenáltattuk meg.



#### 4.4.3 PGIP gén szekvenciájára tervezett primerek

Az alma és az őszibarack PGIP gén szekvenciáival homológiát ( $E$ -érték  $<10^{-50}$ ) mutató *Prunus* szekvenciákat a NCBI BLASTn és BLASTp programját (Altschul és mts., 1990) alkalmazva gyűjtöttük ki.

A ClustalW (Thompson és mts., 1994) program segítségével a szekvenciákat illesztettük. A konzervált részekre négy primert terveztünk (**12. táblázat**)

**12. táblázat.** A *Rosaceae* fajokból származó PGIP gének illesztése alapján tervezett indítószekvenciák

Primer	Szekvencia 5'-3'	Hossza (bp)
<b>PGIP CONS1 F</b>	CATCCTAAACC(C/A)AGC(T/G)CTCTC	20
<b>PGIP CONS2 F</b>	AGC(T/G)CTCTC(C/A/T)GAGCTCTGC	19
<b>PGIPZ R</b>	GATCCAAGGAAGTCAAGCTCTTC	23
<b>PGIP R</b>	AACTGTTGTAGCTCACGTTTCAGGA	24

A lehetséges négy primerkombinációt alkalmazva (a korábban alkalmazott PCR reakció körülményeivel azonos módon) gradiens (48-61 °C) PCR-t végeztünk. Három fajtagenomi DNS-en ('Zard', 'Orange red', 'Korai zamatos') és a 'Zard' és az 'Orange red' fajta első alkalommal gyűjtött fertőzött vesszőiről származó cDNS templátokon a PGIP R és PGIP CONS 1 F primerkombináció alkalmazásával készült PCR termékeket agaróz gélelektroforézis során választottuk szét. A PCR reakció körülményei a korábban alkalmazott feltételekkel megegyeztek 58 °C-os tapadási hőmérséklet alkalmazásával. A korábban leírt protokollokat követve 9 fragmentumot izoláltunk gélből, és ezeket klónoztuk. A genomi DNS-ről készült plazmidokból ötöt, míg a cDNS templátokról készült termékek közül 10-10 plazmidot küldtünk el szekvenciameghatározására.

## 4.5 Bioinformatikai vizsgálatok

### 4.5.1 Az NBS RGA szekvenciák bioinformatikai vizsgálata

A DNS szekvenciákat és ezek transzlált aminosav szekvenciáit BLASTn és BLASTp programok segítségével hasonlítottuk össze az NCBI (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) szekvencia adatbázisban található szekvenciákkal. Húszerő nagy azonosságot ( $E$  érték  $< 1 \times 10^{-50}$ ) mutató RGA szekvenciát és 20 referenciának tartott eltérő fajokból származó R gén NBS szekvenciáját töltöttük le a szekvencia adatbázisból.

A filogenetikai analízishez ezeket és a Samuelian és mts. (2008) által összegyűjtött 262 *Rosaceae* NBS szekvenciáját alkalmaztuk. A szekvenciák illesztését a Clustal W program segítségével végeztük (Thompson és mts. 1994). A filogenetikai törzsfát a Mega 5.0 szoftvercsomaggal (Tamura és mts. 2011) szerkesztettük meg a legközelebbi szomszédok csoportosítását alkalmazó módszerrel (*neighbour joining method*) előállított és Kimura 2 modellt alkalmazó algoritmussal. Az elágazások megbízhatóságát a törzsfán 1000-szeres bootstrap analízissel ellenőriztük.

#### **4.5.2 A cDNS AFLP szekvenciáinak bioinformatikai vizsgálata**

A kapott nukleinsavszekvenciák vizsgálatához az NCBI BLASTn és BLASTp programját (Altschul és mts., 1990) és a Phytozome v8.0 programot (Goodstein és mts., 2012) használtuk. A szekvenciák funkciójának felderítésére homológia alapján a Phytozome v8.0 program által támogatott PFAM, KOG, KEGG, and PANTHER adatbázis kereső programokat alkalmaztuk. A 15. TDF (transzkriptumból származó fragmentum) szekvenciával homológ gént a Phytozome 8.0 szekvencia adatbázis (Goodstein és mts., 2012) segítségével az őszibarack és az alma genomján kerestük meg. A szekvenciák egymáshoz illesztéséhez a ClustalW programot használtuk, a filogenetikai törzsfa készítéséhez a MEGA 5.0 szoftvercsomagot alkalmaztuk (Tamura és mts., 2011).

Az expressziós vizsgálatok eredményeül kapott szekvenciák homológia-vizsgálatakor az  $E$ -érték  $<10^{-8}$  hasonlóságot mutató találatokat fogadtuk el.

## 5 Eredmények

### 5.1 A kajszi ellenállóságának vizsgálata *M. laxa* fertőzésre

#### 5.1.1 Az ellenállóság szabadföldi bonitálása

A fajták fogékonyságának összehasonlításakor elsőként a fertőzött virágszámot rögzítettük, ami már a felvételezéskor nehézségekbe ütközött. Az azonos nóduszon található fertőzött virágokról nehezen lehetett eldönteni, hogy a fertőzés egy vagy több független virágfertőzésből származik-e. Ellentmondásos volt, hogy nem minden egyes virágfertőzés végződött feltétlen vesszőfertőzéssel, mert a fertőzött virágrészek a kórokozó vesszőbe hatolása előtt leválhatnak a termőrésztől.

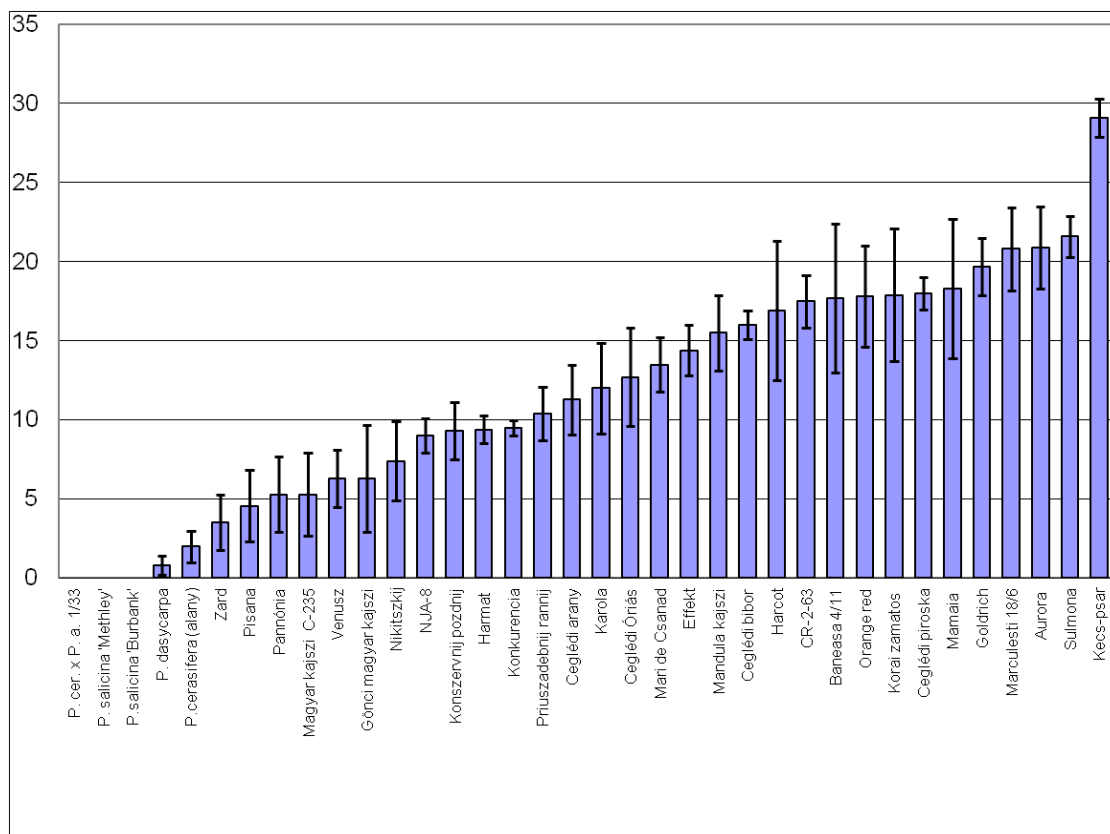
Másik nehézséget a kajszi alternanciája okozta, mert a gyümölcsritkítás hiányában néhány fajta nem fejlesztett virágrügyeket a túl kötöttség miatt. Emiatt 'Goldrich' fajta esetében a vizsgálat első két évében a termőrészpusztulás 30 %-ról 5 %-ra csökkent, amit a kihagyó évre jellemző virágrügyek hiánya okozott.

A fajtákra jellemző termőrész-képződése nagyon eltérő, így a hosszú termőrészeken (vesszők) termő fajták esetében egyetlen virág fertőzése az alapi részen teljes hosszban okozza a vessző hervadását, míg a rövid termőrészen (termőnyárs) a virág fertőzése kevesebb termés kieséssel és fás rész pusztulásával jár. A fajták termőrész fertőzöttségének mértéke határozza meg a fajták érzékenységét, illetve ellenállóképességét.

A moniliás termőrészpusztulás felvételezéskor figyelembe vettem a termés mennyiségét és az alternáló egyedeket kizártam a vizsgálatból. A bonitálás eredményét a **7. ábra** mutatja be.

A fertőzésnek teljesen ellenálló diploid japánszilvafajták egyedein nem volt megfigyelhető a termőrész károsítása, habár a gyümölcsmúmiák mint elsődleges fertőzési források közelsége ellenére is csak szíromfertőzést figyeltünk meg (**8. ábra**).

A *P. dasycarpa* egyedein, az 1/33 cseresznyeszilva és kajszi interspecifikus hibriden sem figyeltünk meg a 3 év alatt moniliás vesszőfertőzést. Az ültetvényben található cseresznyeszilva alany fán, a korona belső felében rövid termőrészek 1-2 %-os pusztulását figyeltük meg. Így ezeket a fajokat és fajtákat teljesen immunisnak tekintjük.



7. ábra. Érzékenységi sor a 2006-2009 között vizsgált kajszi és diploid szilva (*P. cerasifera*, *P. salicina*) genotípusok *M. laxa* fertőzésére. A diagram a fertőzött termőrészek százalékos arányát mutatja be.



8. ábra. A *P. salicina* 'Methley' fajtán a fertőzési forrás gyümölcsmúmiák tömeges előfordulása ellenére sem tapasztaltunk termőrészpusztulást a vizsgálat három évében.

A kajszifajták közül a közép-ázsiai ‘Zard’ fajta bizonyult a legellenállóbbnak (7. és 9. ábra). A ‘Zard’ esetében előfordult ugyan a virágfertőzés, de hosszú termőrész pusztulás egyetlen esetben sem történt a három év alatt. A virágfertőzést, a virágkocsány körül maximum 5 mm-es körben jelentkező a hánccsszövet károsodás követte. A fa belsejében a rövid leárnyékolt gyenge növekedésű termőrészek esetében ez a fertőzés ritkán a termőrész pusztulásával járt.



**9. ábra.** A *Monilinia laxa* kártétele két kajszifajtán. A baloldalon az ‘Orange red’ fajta 30 % feletti termőrész pusztulása, míg a jobb oldalon az 1-2 %-os rövid termőrész károsodást elszenvedő ‘Zard’ fajta látható. A felvétel 2010-ben a felhagyott szigetcsépi génbankban készült.

A következő fogékonysági kategóriába a ‘Pisana’, ‘Pannónia’, ‘Vénusz’, ‘Magyarkajszai C235’, ‘Gönci magyarkajszai’, ‘Nyikitszkij’ fajták sorolhatók. Ezeknél a fajtáknál nem érte el a fertőzés az összes termőrész 10 %-os fertőzöttségi mértéket. A magyarkajszai fajtakörhöz tartozó fajták esetében az ellenállóság nem volt egyértelműen meghatározható. Ezeknél a fajtáknál nem volt tapasztalható a ‘Zard’ fajtával hasonló módon működő ellenállóság, a virágfertőzésen túl a hosszú termőrészek pusztulása is megfigyelhető volt. A magyarkajszai fajtakörre kis virágszám volt jellemző, amelyek elsősorban a rövid termőrészekben helyezkedtek el.

A 10 %-os termőrészfertőzés mértékét elérő fajták az NJA-8, ‘Konszervnij pozdnij’, ‘Harmat’, ‘Konkurencia’, ‘Priuszedebnij rannij’, ‘Ceglédi arany’, ‘Karola’ fajták voltak. Az érzékenységi sorban a 15 % körüli fertőzöttséget mutató fajták sorrendben a

következők: ‘Ceglédi óriás’, ‘Mari de Canad’, ‘Effekt’, ‘Mandulakajszi’, ‘Ceglédi bíbor’. A 15-20 % közötti termőrészpusztulást mutató fajták esetében volt megfigyelhető a legnagyobb szórás. Az érzékenységi sorban a legfogékonyabb fajtákon – ‘Marculesti 18/6’, ‘Aurora’, ‘Sulmona’, ‘Kecs-psár’ - 5 héttel a virágzást követően a termőrészek több mint 20 %-a pusztult el. A kiugró érzékenységgel rendelkező a ‘Kecs-psár’ fajtán 25 %-os termőrész pusztulás jelentkezett. Ezen a fajtán a megfigyeltük a pirosbimbós stádium előtti spontán fertőzés kialakulását, ami a virágzás alatti időjárástól függetlenül mindegyik évben kialakult (**10. ábra**).



**10. ábra.** A ‘Kecs-psár’ fajta virágai és vesszője a bimbó felnyílása előtt már a fertőzés tüneteit mutatják. Ezeket a spontán fertőzött virágokat és termőrészeket eltávolítottuk a mesterséges virágfertőzési kísérlet beállítása előtt.

A *P. sibirica* és *P. mume* faj egyedeinek vizsgálatát a Vácrátóti Botanikus Kertben végeztük 2009-2011 között. A *P. mume* egyedein nem tapasztaltuk az *M. laxa* fertőzését. A négy vizsgált évben csak két alkalommal virágoztak a japánkajszi fák, mert a virágrügyek 2009-ben és 2010-ben teljes téli fagykárt szenvedtek. A szibériakajszi estében mindegyik évben 30 %-os termőrész pusztulást figyeltünk meg, ami a ‘Kecs-psár’ fajta fogékonyágához volt hasonló. Mivel ezekből a fajokból 2-2 egyeden történt a felmérés, és ezek magonc eredetűek, így az eredményeket nem tüntettük fel a grafikonon.

## 5.1.2 Virágrészek érzékenysége a kórokozóval szemben

### 5.1.2.1 A kasztrálás és megporzás hatása a virágfertőzés kialakulására

A ‘Goldrich’ fajta virágjainak természetes fertőzését megvizsgálva megfigyeltük, hogy a fertőzés a virágszirmon és porzószállakon jelenik meg elsőként (**11. ábra** ‘A’ kép). A fertőzött virágok leghosszabban épen maradó része a bibe volt (**11. ábra** ‘B’ kép).

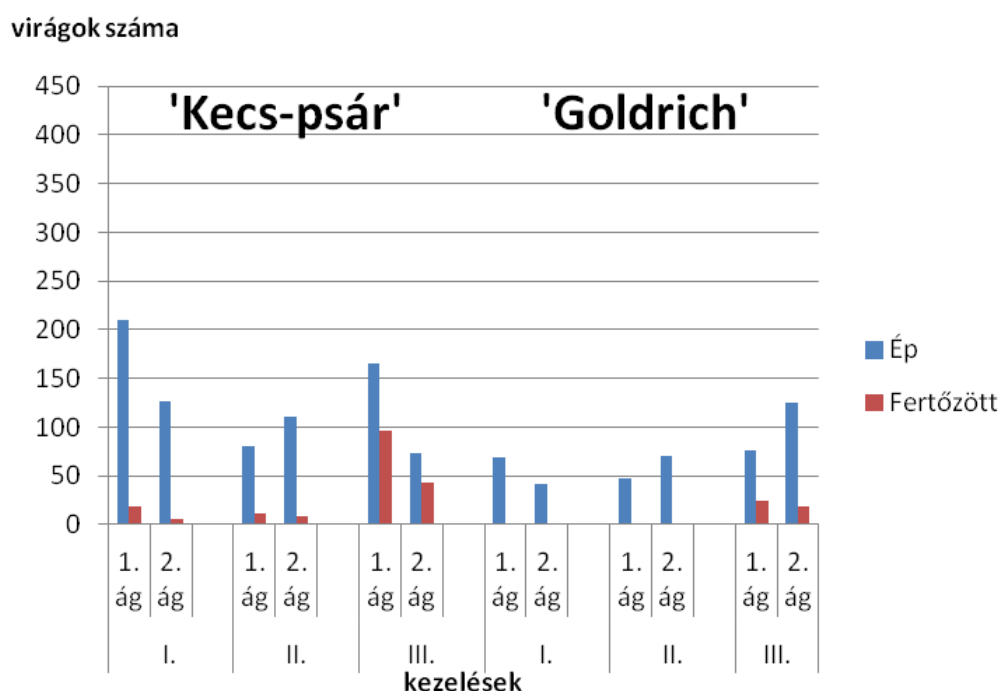




**11. ábra.** A: A *Monilinia laxa* fertőzés kezdete szirmon. B: 'Goldrich' termőnyársának moniliafertőzése. A bibe a legtovább ép szövettáj fertőzés során. C: A 'Kecs-psár' fajtán a keresztezett ágon (fekete karikával jelölve) nem figyelhető meg a többi ágérrszel szemben monilia fertőzés okozta termőrész pusztulás.

A virágfertőzés lefolyásának meghatározását a keresztezéskor megfigyelt jelenség segítette. A keresztezett ágakon elmaradt a fertőzés legfogékonyabb fajták esetében is (**11. ábra** 'C' kép). A keresztezéskor az összes virágot kasztráljuk a kijelölt ágon. A kasztrálás a porzók a szirmok és a vacoköböl mechanikai eltávolítását jelenti, amit a mesterséges megporzás követ. Annak eldöntésére, hogy a megporzás vagy a kasztrálás felelős a keresztezett ágakon a virágok 'ellenállóságaért' két fajtán végeztük el a kasztrálást megporzás nélkül és a kasztrálást megporzással. A két kezelés összehasonlítása a fertőzött virágszám alapján történt.

A 'Goldrich' fajta esetében a 111 kasztrált és megporzott virágból összesen egy esetben találtunk fertőződést, a kasztrált és megporozatlan 118 virág mindegyike ép volt. A pozitív kontrollnak szánt szabadelvírágzású ágakon 201 virágból 43 esetben tapasztaltuk a fertőzés tüneteit. 'Kecs-psár' fajta esetében a kasztrálás során is megfigyeltük még fel nem nyílt virágokon a spontán fertőzés tüneteit (**10. ábra**), ezért ezeket a virágokat termőrésztől eltávolítottuk.



**12. ábra.** A 'Kecs-psár' és 'Goldrich' fajtákon kezelésenként mutatja be a grafikon az ép (kék oszlop) és fertőzött (bordó oszlop) virágok számát. Az I. kezelés: kasztrált és megporzott, II. kezelés: kasztrált és megporzatlan, III. kezelés: szabadelvirágzású ágak.

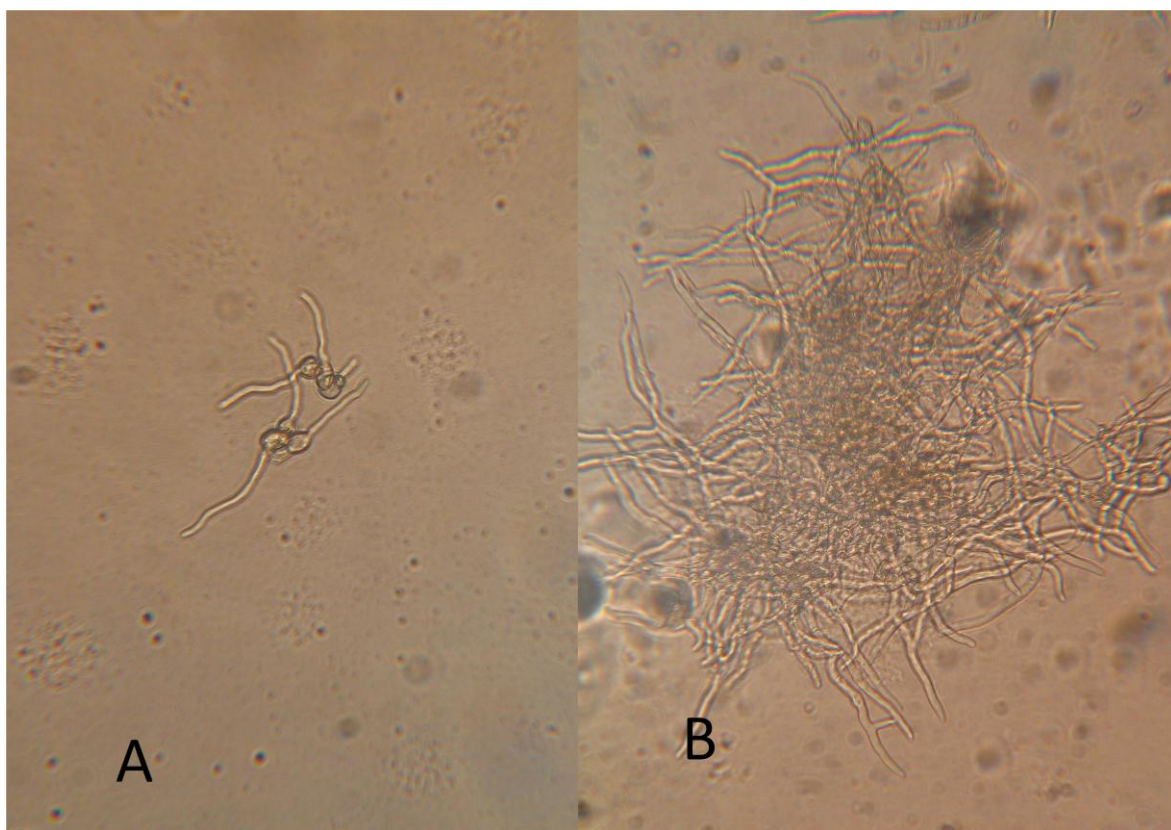
A 'Kecs-psár' fajta vizsgálatakor a 337 kasztrált és megtermékenyített virágból 24 esetben találtunk fertőződést, a kasztrált és megporzatlan 190 virágból 20 esetben tapasztaltuk a tüneteket. A szabadelvirágzású ágakon 219 virág közül 140 esetben figyeltük meg a virágok elbarnulását, amit a hánccsszövet pusztulása követett. Az egy nóduszon fejlődő virágokról - habár a fertőzéstől számított 7. napon felvételeztük - nem lehetett megállapítani, hogy ez két független virágfertőzés vagy az egyik virágról terjedt át a kórokozó a szomszédos virágra ezért ezeknél az összes fertőzött virág számát rögzítettük (12. ábra).

A kézi megporzású és megporzatlan virágok között eltérést tapasztaltunk a bibe szöveténél az öregedése során. A megporzott kasztrált virágok bibéje erősen megbarnult, a kasztrált nem porzott ágakon találhatókhoz képest. A megbarnult szövetekből nem sikerült a kórokozót visszaizolálnunk.



#### 5.1.2.2 A bibekivonat növekedésgátló hatása az *M. laxa* micéliumfejlődésére

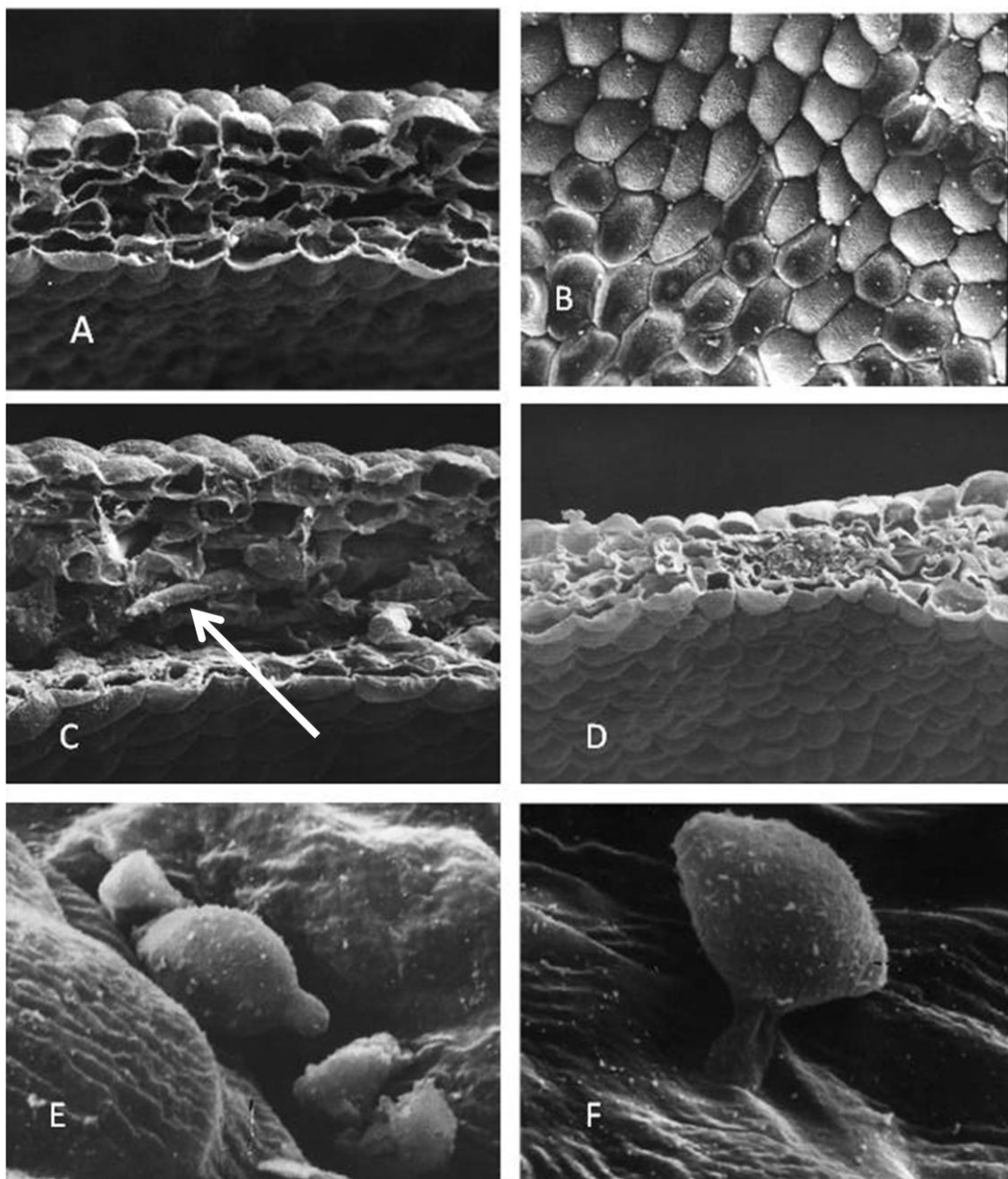
A bibefertőzés gátlásának vizsgálatához a 'Ceglédi óriás' fajta bibéjéből származó kivonatot *M. laxa* konídiumtenyészet folyékony táptalajához adtuk. A hetvenkettedik óra után szabad szemmel megfigyelhető volt, hogy a bibekivonat nem tartalmazó táptalajban összefüggő micélium tömeg nőtt. A bibekivonattal kezelt tenyészetben nem tapasztaltuk a kísérlet kezdetéhez képest eltérést. A fénymikroszkópos vizsgálat alapján megfigyeltük, hogy tizenkettedik órakor a bibekivonattal kezelt konídiumok 20 %-a csírázott, a kezeletlen konídiumok esetében ez az érték 70 % volt. A csíratömlők hosszúságában ekkor nem volt eltérés megfigyelhető. Az egynapos tenyészetek vizsgálatakor a bibekivonattal kezelt micéliumok növekedése leállt, ekkora a konídiumok fele csírázott ki. Ekkor a kezeletlen tenyészetekben a micéliumok kötegekbe álltak össze, emiatt a nem csírázó konídiumokat eltakarhatták. A háromnapos tenyészetek csíratömlő fejlődés közötti eltérést mutatja be a **13. ábra**.



**13. ábra.** Bibekivonat *M. laxa* micélium fejlődésének gátlása. Háromnapos micélium tenyészetek a bibekivonatot tartalmazó (A), és kezeletlen (B) folyékony táptalajokban 300 szoros nagyításban.

### 5.1.2.3 *A virágszirom M. laxa fertőzése*

A mikroszkópos vizsgálatok alapján megfigyelhető volt, hogy a fertőzés kezdetekor a csírázó konídium a szírom felületéről az epidermisz kutikuláját és sejtfalát extracelluláris enzimeivel feloldva hatolt az felpuhult szövetekbe. A szövetbe hatoló micélium körül nem keletkezik kutikuláris perem. A mechanikai sejtfalattöréssel szemben, a kutikula és sejtfal kémiai degradációjának tényét erősíti a belépési pont körüli bemélyedés hiánya is (**14. ábra F kép**). Az epidermisz sejtfalának felületét összefüggő papillás kutikula réteg borítja, ami a kórokozó konídiumának megtapadásának kedvez (**14. ábra E és F kép**). A szírom szöveti felépítése ad magyarázatot a gyorsan bekövetkező szöveti macerációra. A szírom színi és fonáki oldalát szimmetrikus felépítésű egyrétegű elliptikus keresztmetszetű epidermisz sejtek alkotják, közöttük nincsenek gázcsere nyílások (**14. ábra A kép**). Az epidermiszsejtek félgömbökhöz hasonló felületet képeznek, ami a citoplazma nyomásával szembeni vékony és laza sejtfal szerkezetével magyarázható. Két sejsor között mezofillumszövet található. A keresztmetszeti felvétel alapján a mezofillum 50 %-nál nagyobb részét alkotják az intercelluláris járatai (**14. ábra A kép**), ami a micélium és szekretált enzimeinek gyors, korlátlan terjedésének biztosít lehetőséget (**14. ábra C kép**). Elsőként a mezofillumsejtek plazmájának károsodása miatt a szírom vastagsága felére csökken (**14. ábra D kép**), amit az epidermiszsejtek pusztulása követ (**14. ábra B kép**). A micélium terjedésének irányát a szíromban a turgorukat veszített behorpadó epidermiszsejtek jelzik.



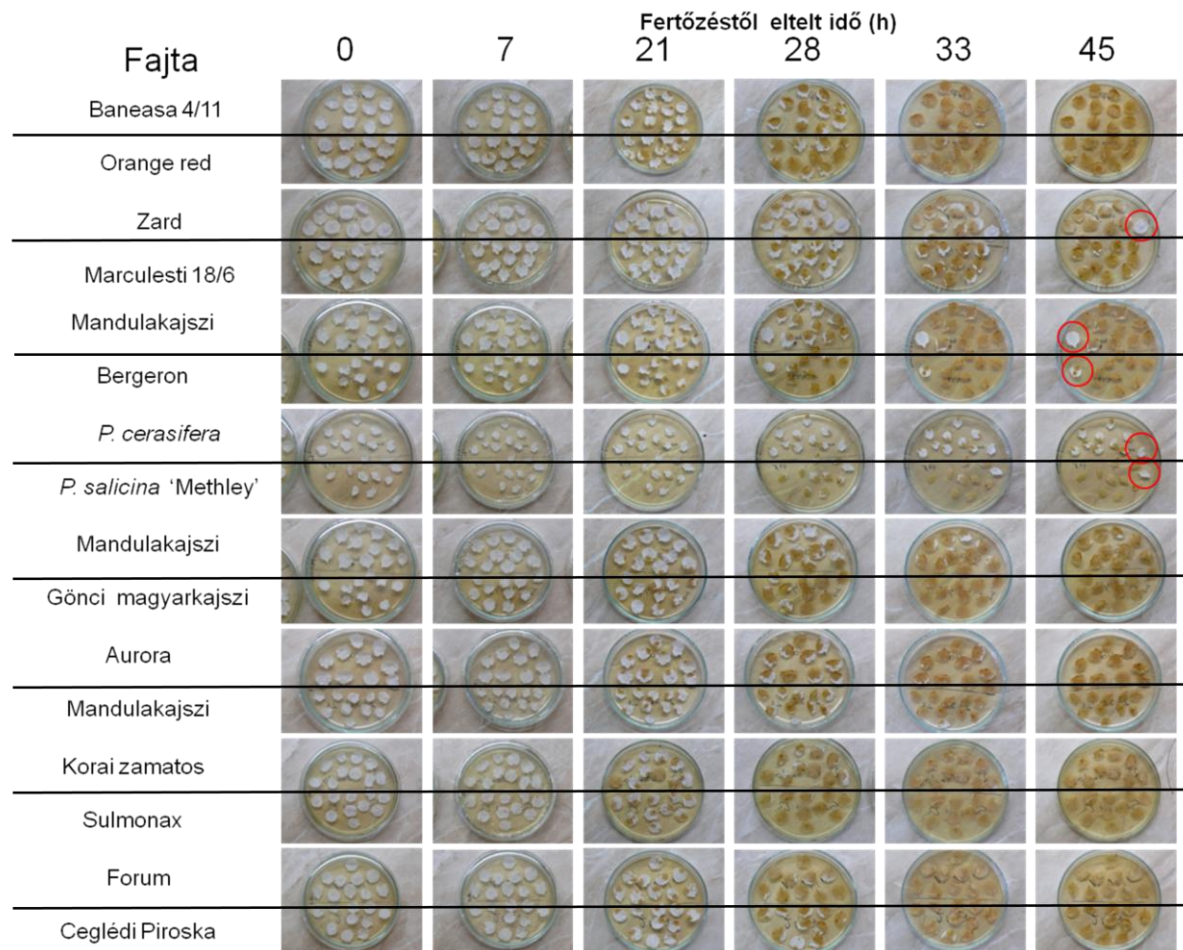
**14. ábra.** A 'Goldrich' fajta szirmának pásztázó elektron mikroszkópos felvételei.

A: Ép szirm keresztmetszeti felvétele (400x). B: *M. laxa* fertőzését követően a turgorukat vesztett epidermiszsejtek (400x). C: Intercellulárisok között fejlődő csíratömlő (fehér nyíl mutat rá) (1000x). D: Fertőzés következtében károsodott sejtfal (300x) E: *M. laxa* csírázó konídiuma (3000x). F: Kicsírázott és a szirm szövedeteibe behatoló konídium (4000x).

#### 5.1.2.4 Fajták mesterséges szírom fertőzése *in vitro*

Az ültetvényből begyűjtött bimbós termőrészeket üvegházban virágoztattuk és a felnyíláskor a szirmokat PDA táptalajra helyeztük. A szirmokra egy ponton konídiumszuszpenziót juttattunk a színi oldalra.

**15. ábra** mutatja a kísérlet eredményeit. Minden vizsgált kajszifajta szirma 45 órával a fertőzést követően egyöntetűen kolonizálódott. A 2. 3. és 4. sorban lévő minták esetében a vizes kontroll a szirmokon nem okozott elváltozást. Kivételt képez a 'Bergeron', amely esetében a táptalajon keresztül következett be a fertőzés. A kajszin kívül *P. cerasifera* és a *P. salicina* 'Methley' egyedeinek szirmait is vizsgáltuk. A *P. cerasifera* esetében 45 órával a fertőzést követően a szíromszövetek 30 %-át fertőzte meg a gomba. A japánszilva minták esetében 7 órával a fertőzés után a fertőzési csepp körül 3-4 mm-rel nagyobb, vizenyős folt jelent meg az összes fertőzött szirmon, ami arra utal, hogy a japánszilva szirmjai nem mutattak nagyobb ellenállóságot a vizsgált kajszik átlagához képest. Az 'Orange red' fajta szirmán több pontból kezdődött a szövetbarnulás, ami a szirmok természetes fertőződésével magyarázható. A második felvételezéskor, a 'Zard' fajta szirmain volt a legcsekélyebb, a 'Baneasa 4/11', 'Orange red', 'Marculesti 18/6' és a 'Mandulakajszí' fajtákon mérsékelt míg a 'Forum', 'Sulmonax', 'Aurora', 'Korai zamatos', 'Gönci magyarkajszí', 'Bergeron' és 'Ceglédi Piroska' fajtákon a legerősebben jelentkezik a fertőzés. A legnagyobb eltérés a vizsgált kajszifajták között huszonnyolc órával a fertőzés után volt megfigyelhető. Hat fajta az 'Orange red', 'Gönci magyarkajszí', 'Bergeron', 'Sulmonax', 'Korai zamatos', 'Forum' esetében nem volt megfigyelhető ép rész. A 33. óra után a kajszifajták közül csak a 'Zard' és 'Marculesti 18/6' szirmokon volt még ép szöveti rész. A fertőzést követő 45 óra elteltével nem volt ép szíromszövet egyetlen vizsgált kajszifajta esetében sem. A kajszifajták szíromlevelein különböző sebességgel történt a fertőzés, az első teljesen kolonizált szirmok a fertőzést követő 28. órában jelentek meg, míg a legkésőbb elpusztult szirmok 45 órával a fertőzést követően felvételeztük. A vízzel kezelt szirmok (15. ábra pirossal keretezett szirmok) a 45 óra elteltével sem mutattak szövetpusztulást.

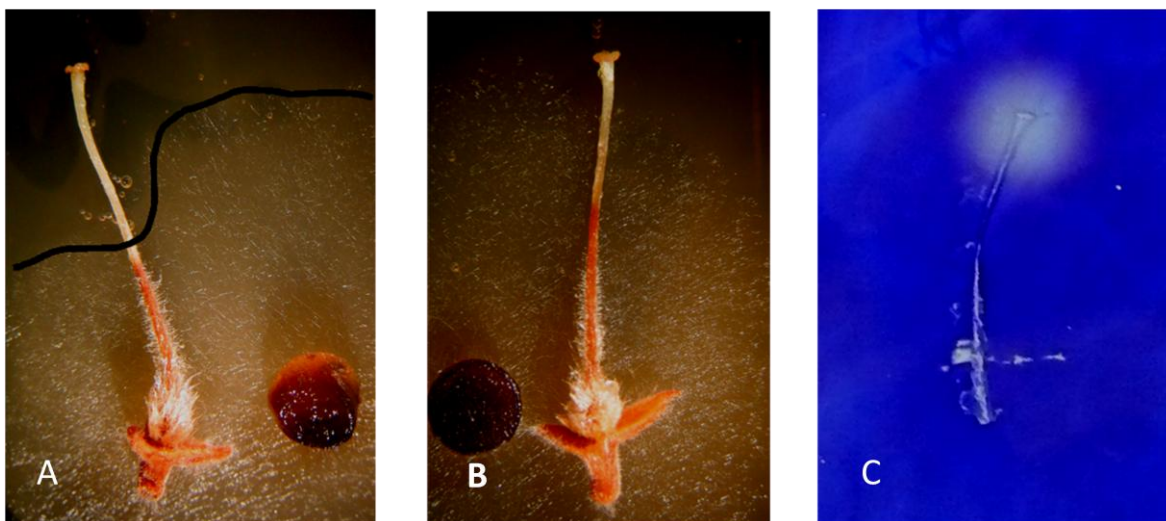


**15. ábra.** Kajsi, cseresznyeszilva és japánszilva szirmok mesterséges fertőzése *Monilinia laxa* konídium szuszpenziójával. Minden petricsészében két fajta 10-10 szirm fertőzése követhető nyomon vízszintes elrendezésben. A fertőzéstől eltelt órák száma az oszlopok felett található. Az utolsó oszlopban piros keret jelzi a vízzel kezelt kontroll szirmokat.



#### 5.1.2.5 A bibe kórokozóval szembeni ellenállóképességének in vitro vizsgálata

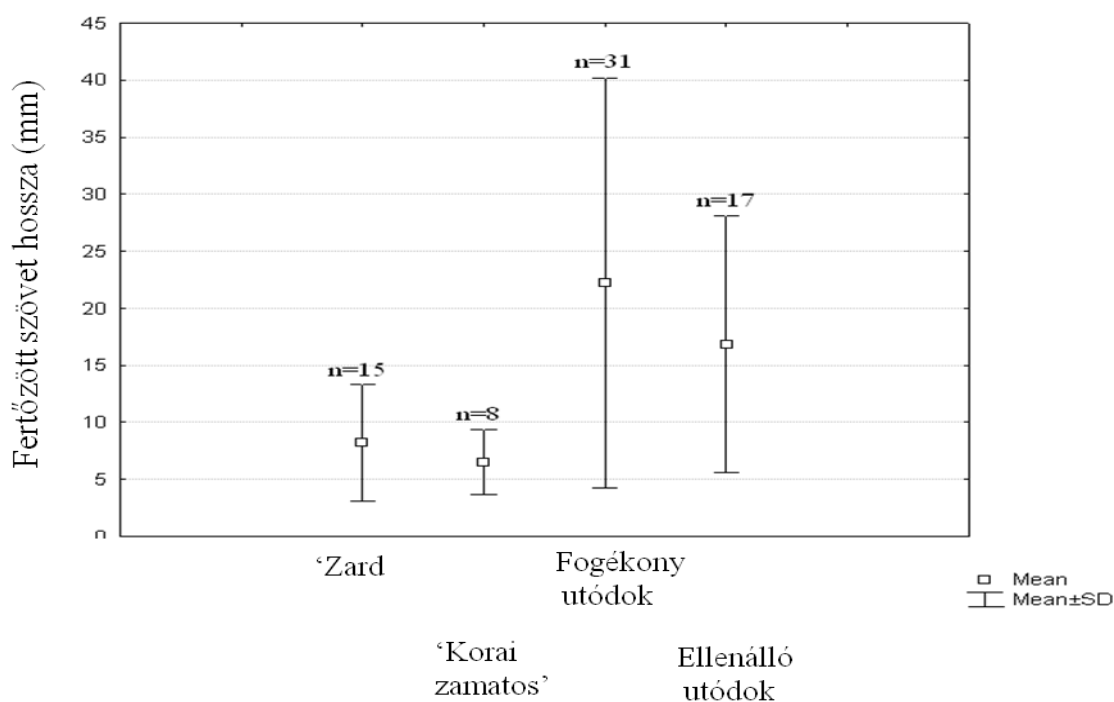
A PDA táptalajon nevelt *M. laxa* tenyészetek csökkent fejlődését figyeltük meg a táptalajra helyezett bibe környezetében. A bibe körül a kórokozó fejlődése a koncentrikus növekedése során rövid ideig gátlást szenvedett, a légmicéliumok fejlődése ezen a részen lelassult. Később ez a lemaradás a gomba fejlődésében teljesen eltűnt. A termő és a bibe kolonizációja során a bibe, a természetes fertőzéshez hasonló módon, képes volt hosszabb ideig ellenállni a kórokozó macerációjának. A bibéből szekretálódó ribonukleázok működését a *Torula* RNS bomlása jelzi. Az RNS toluidinkékkel történő festésekor a bibe körül fehér folt jelzi a ribonukleinsav bomlását (16. ábra). Ennek a foltnak a mérete megközelítette a micélium fejlődést gátló zóna méretét. A bibeszövet fokozott ellenállóképessége és a táptalajon a gomba korlátozott növekedése alapján feltételezhetjük a bibében kifejeződő ribonukleázok gombafejlődést gátló hatását.



**16. ábra.** A táptalajon fejlődő *M. laxa* fejlődésének gátlása a bibe körüli régióban. 'A': A micélium fejlődésének körvonalát a fekete sávval jelöltük. 'B': Megfigyelhető a bibe fokozott ellenállósága a kórokozó szövet macerációjával szemben. 'C': A *Torula* RNS degradációja toluidinkék festéssel mutatható ki a bibe környékén a táptalajba diffundált ribonukleázok hatására.

### 5.1.3 Ellenállóság vizsgálata a ‘Zard’ × ‘Korai zamatos’ család egyedein mesterséges vesszőfertőzés alapján

Az ültetvényben történt fertőzéskor *M. laxa* micéliummal átszőtt agarkorongokat helyeztünk a vesszőkön vágott sebekre. Kontrollként steril agarkorongokat használtunk, aminek eredményeként nem tapasztaltuk a fertőzési tünetek kialakulását, mindkét fajta esetében egy kalluszosodó, megvastagodott sebgyógyulást kaptunk. A fertőzés hatására a vesszőkön, a levélalapokon kialakultak az exogén sztrómák, amik konídiumokat fűztek le. A 2 mm-nél kisebb átmérőjű vesszők fertőzésekor a kórokozó körbenőtte a floémot, ennek következtében a fertőzés felett található részek teljes hosszban elhervadtak. Mivel ezeknek a vékony vesszőknek a fertőzése más eredményt (vesszőhossz pusztulás) hozott, mint a vastagabb vesszőké, ezért ezeket a fertőzéseket nem vettük figyelembe az adatok elemzése során.



**17. ábra.** A ‘Korai zamatos’ és ‘Zard’ fajták és hibridjeik fertőzött szövethossz alapján történő összehasonlítása. Az utódokat fertőzésre adott válaszreakciójuk alapján ellenálló és fogékony csoportokba soroltuk. Az n érték a két szülő fajta esetében a fertőzések számát az utódok esetében a fertőzött egyedek számát mutatja.

A mesterséges fertőzés a két szülőfajtan nem várt eredményt hozott. Az elpusztult vesszőszövetek hossza és a természetes fertőzés alapján tapasztalt fenotípus között ellentmondás mutatkozott. A szabadföldi felvételezések alapján ellenállónak tartott ‘Zard’

fajta vesszőin az átlagos fertőzött szövethosszúság nagyobb volt, mint a fogékony ‘Korai zamatos’ fajta esetében tapasztalt érték, habár nem volt szignifikánsan kimutatható eltérés a t-próba alapján a két szülőfajta között (**17. ábra**).

A felvágott vesszők sztereomikroszkópos vizsgálata alapján biztosan elkülöníthető válaszreakciót tapasztaltunk. A ‘Korai zamatos’ fajta esetében a fertőzött szövet és az ép szövet között egy elmosódó átmenet volt megfigyelhető, míg a ‘Zard’ fajta esetében az összes fertőzésnél határozott, élesen elkülöníthető volt az ép és fertőzött rész. A rezisztens ‘Zard’ esetében a fertőzés határánál az ép szövetrész megvastagodását lehetett megfigyelni (**18. ábra**).



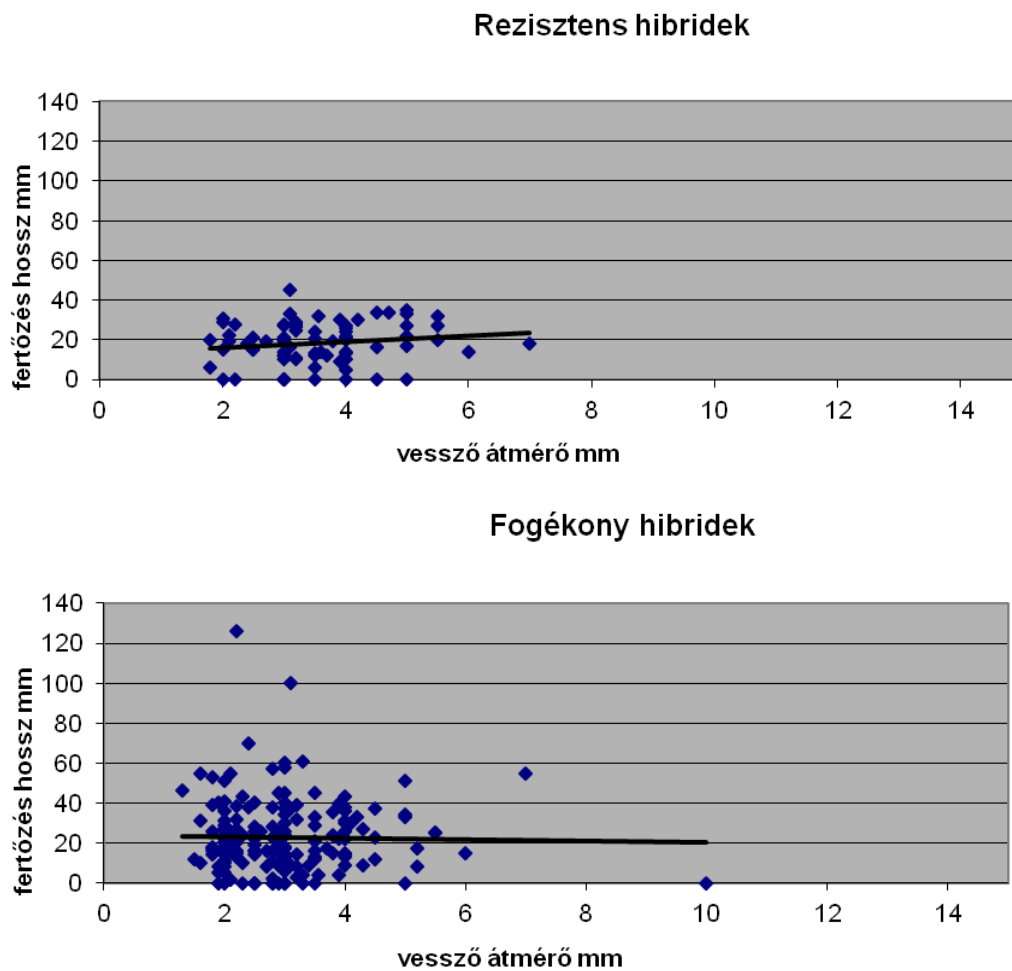
**18. ábra. A:** ‘Korai zamatos’ vesszőjének mesterséges *M. laxa* fertőzése. A fertőzött és ép háncsszövet között átmenet figyelhető meg, ami a kórokozó folyamatos terjedését jelzi. **B:** ‘Zard’ fajta vesszőjének válaszreakciója a mesterséges *M. laxa* fertőzésre. Az ép és fertőzött rész élesen elkülönül, a fertőzés határán a háncsszövet megvastagodása figyelhető meg.

A ‘Zard’ fajta esetében is megfigyelhető volt a háncsszövet pusztulása. A kórokozót sikeresen izoláltuk a fertőzött háncsszövetből, a negatív kontrollként megsebzett és steril agarkoronggal tesztelt sebzésekről viszont nem. A fertőzött vesszők levélalapjain általános volt a gomba exogén sztrómáin tömegesen megjelenő szürke konídium tömeg (**19. ábra**).





**19. ábra.** A 34-es hibrid vesszőfertőzése során a levélalapokon exogén sztrómák fejlődtek.

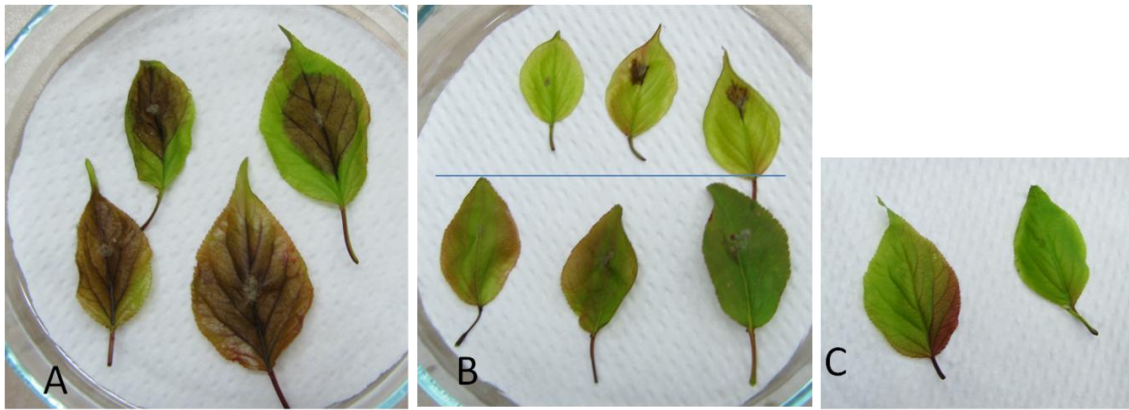


**20. ábra.** A fogékony és ellenálló hibridek fertőzéshossz és vesszőátmérőjének bemutatása.

A fertőzés hatására adott válaszreakciók alapján (**18. ábra**), a 'Korai zamatos' × 'Zard' család utódjaiból 17 egyedet ellenállónak, míg 31 egyedet fogékonnak határoztunk meg. Mivel a fogékony és ellenálló egyedek pusztult vesszőhosszaiból származó adatsorok átlagának összehasonlítására alkalmas parametrikus t-teszt feltételei nem teljesültek (varianciák homogenitása, Levene-teszt  $p < 0,05$ ; adatok normál eloszlása, Shapiro-Wilk teszt  $p < 0,05$ ), ezért a parametrikus tesztnél gyengébb, nem-parametrikus statisztikai tesztek alkalmaztunk. A fogékony és ellenálló egyedek fertőzött vesszőrészének hossza szignifikáns eltérést mutatott. A szenzitíveknél átlagosan 22,5 mm-t, míg a rezisztenseknél 17,5 mm-t mértünk (Mann-Whitney-test  $Z=1,9858$ ,  $p=0,047$  és Welch-test  $d=2,838$ ,  $p=0,007$ ) (**17. ábra**). Az összes vesszőn mért fertőzéshossz és a vesszők átmérője között nem volt szignifikáns korreláció (Spearman-korreláció  $r=0,0458$ ,  $p=0,12$ ), sőt a fertőzéshossz gyakorlatilag nem változott a vesszőátmérő eltéréseivel (**20. ábra**).

#### **5.1.4 A 'Zard' és 'Orange red' fajták ellenállóságának összehasonlítása a fiatal levelek mesterséges fertőzése alapján**

Az ültetvényben tapasztalt levélfertőzőési tünetek alapján megkíséreltük a két fajta leválasztott leveleinek fertőzését. Az 'Orange red' fajta esetében a természetes fertőzés során a fertőzött virágok és hajtások felületén keletkezett exogén sztrómák körül elhelyezkedő leveleken apró barna léziókat, majd az egész levéllemezre elterjedő barna pusztulást figyeltünk meg. Ezeket a tüneteket a 'Zard' fajta levelein nem tapasztaltuk. A két fajta közötti eltérést a **21. ábra** szemlélteti. Az 'A' kép és 'B' kép felső három levele az 'Orange red' fajtáról származik, míg a 'Zard' fajta leveleit a 'B' kép alsó fele mutatja be. Az 'Orange red' esetében már a fertőzést követő 48 órára teljes felületen pusztult a levelek 30 %-a, míg a 72. órára az összes levél teljesen kolonizálódott. A 'Zard' fajta esetében 72. órára alakultak ki a tünetek, de ez maximálisan a levelek felületének 15 %-ára terjedt ki. A negatív kontroll leveleken nem tapasztaltunk fertőzést ('C' kép). Az 'Orange red' leveleken a gomba exogén sztrómáin konídiumokat fejlesztett.

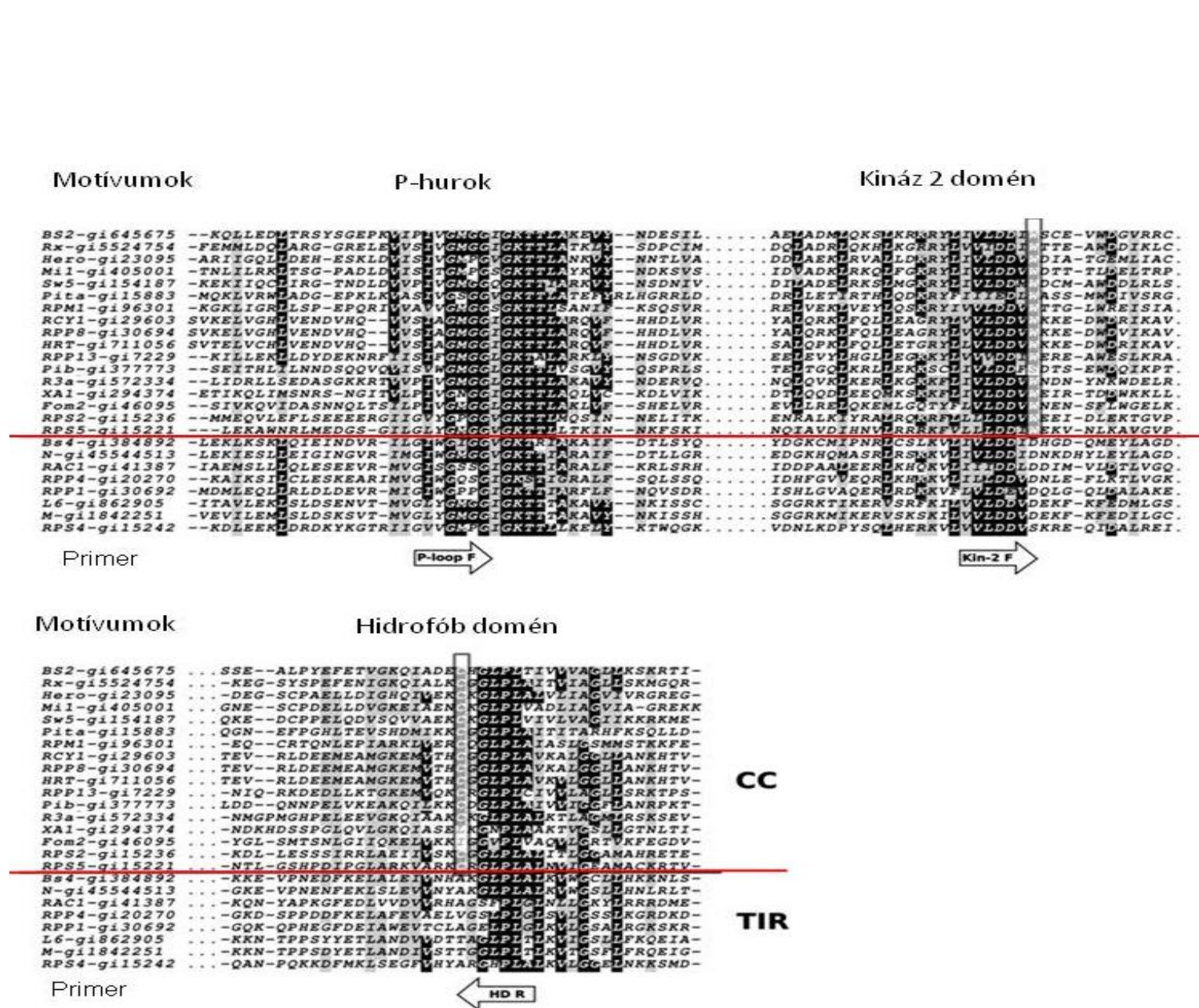


**21. ábra.** Két kajszfajta mesterséges *M. laxa* levélfertőzése. 48 órával a fertőzést követően az ‘Orange red’ (‘A’ kép és ‘B’ kép felső része) fajta levelein a megbarnult részeket kolonizálta a gomba. A ‘Zard’ fajta (‘B’ kép alsó fele) esetében nem látható fertőzött rész kialakulása. A negatív kontroll leveleken 48 óra elteltével (‘C’ kép) nem történt elváltozás egyik fajta esetében sem.

## 5.2 Molekuláris vizsgálatok

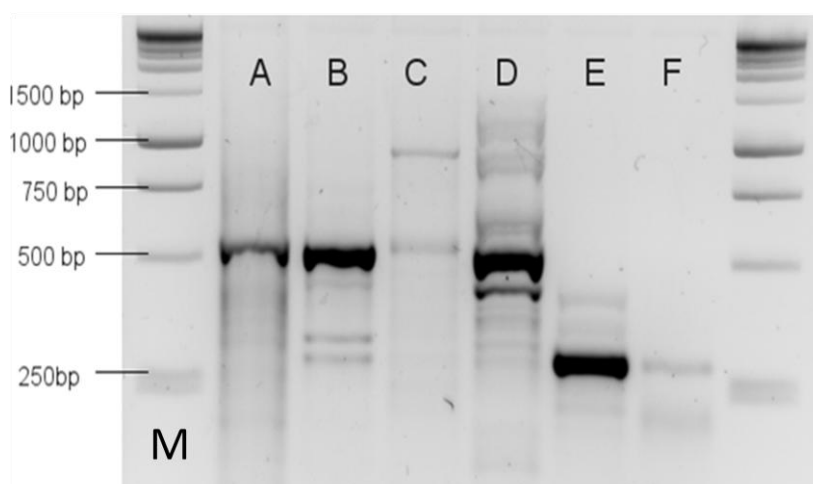
### 5.2.1 Eltérő fogékonyságú kajszfajták összehasonlítása NBS LRR típusú rezisztenciagén-analógok SSCP vizsgálata alapján

A monília-ellenállósághoz kapcsolt molekuláris marker kifejlesztésének érdekében elsőként a növényvilágban legelterjedtebb rezisztenciagén családon belüli változékonyságot vizsgáltuk. A vizsgálat alapja a különböző növényfajokból izolált rezisztenciagének konzervált szekvenciájának hasonlósága, emiatt a módszer alkalmazása mindennemű előzetes szekvenciaismeret nélkül alkalmazható bármilyen növényfajon. A konzervált szekvencia szakaszokat kilenc rokonságilag távol álló fajból izolált 26 NBS-LRR rezisztenciagén NBS domén aminosav-szekvenciája alapján választottuk ki. Mivel a géneknek az NBS doménon kívül nem volt egyöntetű, legalább 8 aminosav-egyeztetést mutató szakasza, így a gének TIR vagy CC és LRR doménjaira nem terveztünk indító szekvenciákat. Az illesztés alapján a Kináz II motívum C terminálisán a CC-NBS-LRR csoportba tartozó szekvenciákban egy triptofán aminosav található, míg a HD motívum N terminálisán 89 %-os valószínűséggel cisztein (**22. ábra**). Mivel korábban kajszból kizárólag TIR-NBS-LRR típusú RGA-kat izoláltak, a CC-NBS-LRR típusú szekvenciákra specifikus primereket terveztünk. A degenerált primer tervezésénél a permutációs index értékét nem maximalizáltuk az értéket (**22. ábra**).



22. ábra. Az NCBI adatbázisból származó 26 aminosav-szekvencia illesztése alapján az NBS domén 3 konzervált régiója, amelyekre a primereket terveztük. A felső 18 szekvencia CC-NBS-LRR, az alsó 8 pedig TIR-NBS-LRR típusú RGA-kból származik. A fekete alapon látható aminosavak a P-loop, Kináz II és hidrofób

Az összes lehetséges primerkombinációval gradiens PCR-t végeztünk a ‘Goldrich’ fajta genomi DNS-én, és kiválasztottuk a várt méretben határozottan megjelenő fragmentumokat adó legmagasabb tapadási hőmérsékletet. A primerkombinációk alkalmasságát a **23. ábrán** bemutatott gélkép alapján választottuk ki. Fontos megemlíteni, hogy a CC-NBS-LRR szekvenciára specifikus, saját tervezésű CUB-Kin2 F és CUB-HD R primerkombináció alkalmazásakor a várt 250 bp hosszúságú PCR terméket kaptuk (23. ábra E primerkombináció), ami alapján feltételeztük a CC-NBS-LRR rezisztenciagén analógok jelenlétét a kajszi genomban. A CUB-Kin2 F és a korábban publikált LM367 R primerkombináció alkalmazásakor nem kaptunk terméket (**23. ábra F** primerkombináció), ami magyarázatot adott a CC-NBS-LRR típusú génanalógok korábbi kimutatásának hiányáról a kajszi esetben.

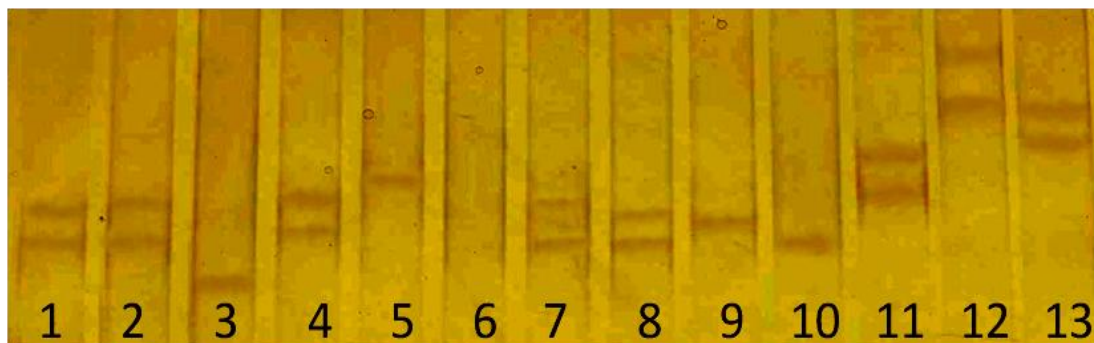


**23. ábra.** A ‘Goldrich’ kajszifajta NBS doménjára tervezett primerek PCR analízise. A: CUB-P-loop F és CUB-HD R, B: P-loopGent F és LM637 R, C: CUB-P-loop F és LM637 R, D: P-loopGent F és CUB-HD R, E: CUB-Kin2 F és CUB-HD R, F: CUB-Kin2 F és LM637 R primerkombinációk. M: 1-kb + DNS-marker.

Ezen eredmények alapján megállapítható volt, hogy a tervezett primerek nagyobb degeneráltsági foka miatt nagyobb számban lehet a kajszi genom egymástól eltérő NBS szekvenciáit meghatározni. A primerkombinációk közül a saját tervezésű CUB-P-loop F és CUB-HD R, a P-loopGent F és LM637 R indítószekvenciákkal készült polimeráz láncreakció termékeit pGemT-Easy vektorba ligáltuk, és *E. coli* JM 109 kompetens sejtekbe klónoztuk. A klónok szekvenciájában vizsgáltuk a CC-NBS-LRR géncsaládra jellemző Kináz II motívum végén található triptofánt kódoló TGG triplet jelenlétét a CUB-Kin2 F primer és az eredeti reverz primerek *semi-nested* polimeráz láncreakció



alkalmazásával. A Soriano és mts. (2005) által alkalmazott primerkombinációból származó 96 klón esetében a *semi-nested* kolónia PCR technikával egyetlen esetben sem kaptuk a várt CC-NBS-LRR-re jellemző fragmentum méretet, míg a saját tervezésű primerkombináció esetében a 96 klónból 28 esetben a 250 bp hosszúságú DNS fragmentum szaporodott fel. Az egyedi klónokból származó PCR termékek között agaróz gélen nem lehetett hosszpolimorfizmust kimutatni, ezért a szekvencia alapú különbségek kimutatására alkalmas SSCP technikát alkalmaztuk. A 28 pozitív klónból az SSCP vizsgálat alapján 11 eltérő futtatási mintával rendelkező klónt választottunk ki szekvenálásra. (**24. ábra**).



**24. ábra.** 1-11. A CC-NBS-LRR szekvencia specifikus pozitív kolónia PCR-termékek eltéréseinek kimutatása SSCP technikával. 12-13. minta a két TIR NBS RGA klón.

Két olyan negatív klón szekvenciáját is meghatároztuk, amelyek egyértelműen a TIR-NBS-LRR géncsaláddal mutattak nagy hasonlóságot. A megszekvenált 13 eltérő nukleinsav-szekvencia transzlált aminosav-szekvencia illesztését a **25. ábra** mutatja be. A CC-NBS-LRR szekvenciákra jellemző Kináz II domén N terminálisán található triptofánt (W) az illesztésen piros kerettel jelöltük

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100							
Pr. arm. CC1	KTTLVAKTFN	DERVKRQFH	CCAWLTVSQT	---	YATDDL	LRSLIKQF	HEARMEKVP	--	ADMN-SMTYRE	ELRVLVN	YLESKRHMV	VLDVW	---	IKLWKEM	92		
Pr. arm. CC2	KTTLTQLAYN	DDNVKAHFEI	RKVVCVSDP	---	FDEIKIAK	DISGDCATSSN	-----	---	QLDYVLQ	RMSKSI	RGKRRL	VLDVW	---	ENRQKWELL	84		
Pr. arm. CC3	KTTLVARTFT	DDVVKSHFECY	AWITVSQS	---	YVIEDLL	RRLLKEFH	KAKKEAVP	--	ADMN-AMS	YNELLEI	LVNYLET	KRLV	VLDVW	---	VHLWDKI	92	
Pr. arm. CC4	KTTLVARTFK	DDIVKRHFECY	AWITVSQS	---	YVIEDLL	RRLLKEFH	KAKKEEVP	--	ADMN-AMS	YNELLEI	LVNYLET	KRLV	VLDVW	---	VHLWEKL	92	
Pr. arm. CC5	KTTLTQLAYN	DDNVKAHFEI	RKVVCVSDP	---	FDEIKIAK	DISGDCATSSN	-----	---	QLDYVLQ	RMSSES	IQGKRRL	VLDVW	---	ENRQKWELL	84		
Pr. arm. CC6	KTTLVARTFK	DDIVKRHFECY	AWITVSQS	---	YVIDDLL	RRLLKEFH	KAKKEEVP	--	ADMN-AMS	YNELLEI	LVNYLET	KRLV	VLDVW	---	VHLWDKI	92	
Pr. arm. CC7	KTTLVARTFK	DEIVKRHFECY	AWITVSQS	---	YVIEDLL	RRLLKEFH	KAKKEEVP	--	ADMNAMS	SYELLEI	LVNYLET	KRLV	VLDVW	---	VHLWEKI	93	
Pr. arm. CC8	KTTLVAKTFT	SESVKRHFSCY	AWITVSQS	---	YVIEDL	FRSLKEV	HQATKEEVP	AAADLN-	SMSYRE	ELHILV	TYLESR	RRLV	VLDVW	---	IKLLKEM	94	
Pr. arm. CC9	KAALVARTFT	NHVVKSHFECY	AWITVTQS	---	YVIEDLL	IRLLKEFH	KERKEEVP	--	TNMN-S	MSRHE	LEI	LVNYLET	KRLV	VLDVW	---	IHLWEKI	92
Pr. arm. CC10	KTTLVARTFK	DEIVKRHFECY	AWITVSQS	---	YVIEDLL	RRLLKEFH	KEKKEEVP	--	AEMN-AMS	YNELLEI	LVNYLET	KRLV	VLDVW	---	VHLWDKI	92	
Pr. arm. CC11	KTTLVARTFK	DDIVKRHFECY	AWITVSQS	---	YVIEDLL	RRLLKEFH	KAKKEEVP	--	AGMN-AMS	YNELLEI	LANYLET	KRLV	VLDVW	---	VHLWEKL	92	
Pr. arm. T1	--TIARTAY	NQNFYKFG	SSFLADIRATS	KLPNGLV	HQLQNL	LSGLQ	KGAKKIY	-----	SLDEGIT	KIKRAI	RCKRVL	HALDDV	---	LEQFNA	86		
Pr. arm. T2	--TIAKAI	WNAIAHEF	EGSCFLPNV	REGS----	LVQLHET	LLDKVL-	GKNWKIQ	-----	SVDEGIS	VIKKRL	RHKKIL	LILDDV	DQ---	LEQLEN	80		

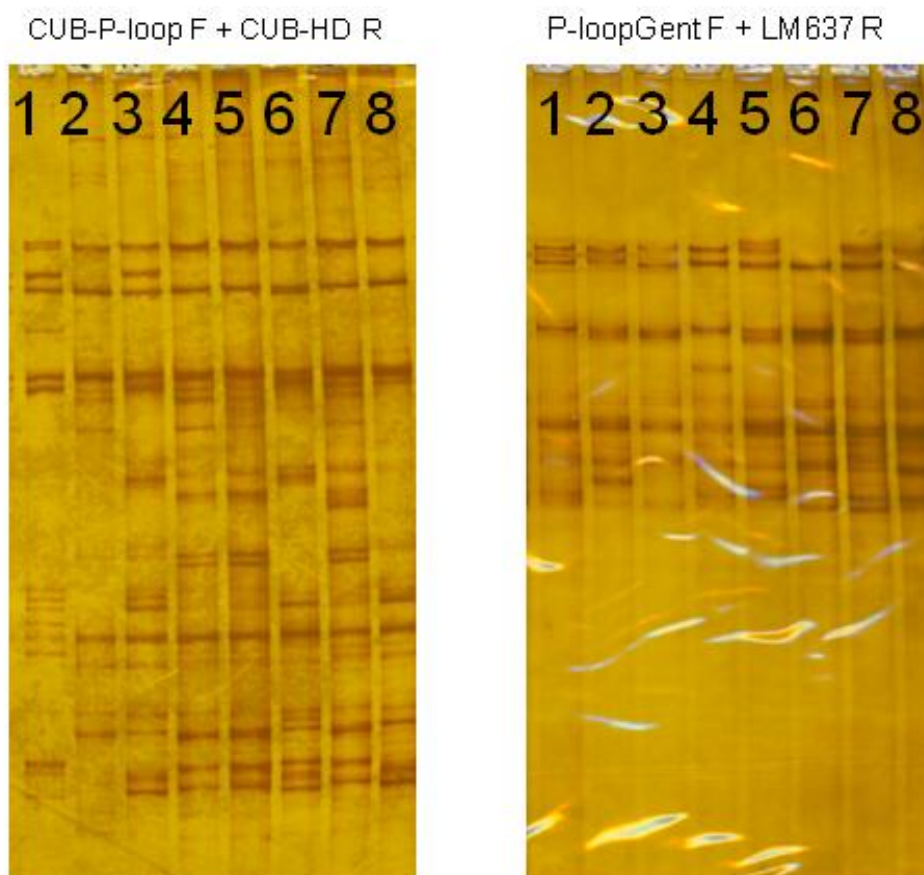
	110	120	130	140	150	160	170														
Pr. arm. CC1	RIALPNT-QF	GSRI	MLTT	RR	EDVAS	YSFGV	QSHHHIQP	LGKND	AWDLFS	RKA	FSA	YQNKCC	PPDLQ	SLAEELVEK	167						
Pr. arm. CC2	KVPLMQNGA	KSSI	ILV	TRKIE	VAN-	MMRAT	PNMIN	LEGLS	DEYCLAI	FNHMA	FPGD-	DVDE	SKAFEDI	SKKIVKK	158						
Pr. arm. CC3	RFSFPDK-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VERVH	HKIQP	LEKGD	SWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSTEIL	PLARELVEK	167					
Pr. arm. CC4	RFSFPDK-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VERVH	HKIQP	LEKGD	AWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSPELL	PLARELVEK	167					
Pr. arm. CC5	KVPLMQNGA	KSSI	ILV	TRKIE	VAN-	MMRAT	SNMIN	LEGLS	DEYCLAI	FNHMA	FPGD-	DADE	SKAFEDI	SKKIVKK	158						
Pr. arm. CC6	RFSFPDK-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VESHV	HKIQP	LEKGD	AWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSPELL	PLARELVER	167					
Pr. arm. CC7	RLSFPDK-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VESHV	HKIQP	LEKGD	AWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSTEIL	PIARELVEK	168					
Pr. arm. CC8	RIALPNR-Q	LGS	RIIL	TR	KEEI	AFYS	FGVESHV	RIQ	PLKKN	EAWBL	FSKKA	FSTYHN	KRCPP	ELESS	AWELLGK	169					
Pr. arm. CC9	RFSFPDT-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VESHV	HKIQP	LEKGD	AWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSPEIL	PLAQELVEK	167					
Pr. arm. CC10	RFSFPDK-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VESHV	HKIQP	LEKGD	AWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSPELL	PLARELVEK	167					
Pr. arm. CC11	RFSFPDK-Q	LGS	RVML	TT	RR	EDIA	SSSFG	VESHV	HKIQP	LEKGD	AWBL	FSMKAF	SSYPNK	SCSPELL	PLARELVEK	167					
Pr. arm. T1	ILGMR	EWLHP	GS	SKII	IT	TR	HEHLK	--	VHENC	AMFVK	GLN	ENES	LELFS	WHAFR	QHPGEGYMDLS	RPVVQHCK-	159				
Pr. arm. T2	LAG-DD	WFG	GS	RVII	IT	T	KD	RG	LLD--	NREI	ELI	YEV	KKLE	YNQ	AL	ELFS	WHAFGRSEPPKDY	LKLAQR	AI	AFAD-	152

25. ábra. Tizenegy kajsi CC-NBS-LRR és két TIR-NBS-LRR aminosav-szekvencia illesztése.

A szekvenciákat (PaCC1-PaCC11 és PaT1-PaT2) az NCBI adatbázisba a következő azonosító számokon tettük közzé: GQ336813 – GQ336825. A szekvencia-illesztések alapján megállapítható, hogy a kajsziiban eddig nem ismert CC-NBS-LRR gén családdhoz tartozó szekvenciákat sikerült meghatároznunk. A tervezett primerek alkalmazásával mindkét NBS-LRR típusú gén család tagjait tudjuk vizsgálni a kidolgozott PCR technikával, ezáltal szélesebb körben lehet felfedni a NBS domén szekvenciáit a kajszi genomban.

A vizsgált fajták közül természetes fertőzés alapján kiválasztottuk az ‘Aurora’, ‘Orange red’, ‘Goldrich’, ‘Harcot’, ‘Korai zamatos’, ‘Ceglédi Piroska’, ‘Ceglédi bíbor’ fajtákat, mint monília fogékony genotípusokat, míg ellenálló kajszi genotípusként a ‘Zard’ fajtát alkalmaztuk. A fajtákat két primerkombinációval - CUB-P-loop F és CUB-HD R, illetve P-loopGent F és LM637 R vizsgáltuk. A PCR termékek között agaróz gélelektroforézis során nem tapasztaltunk hosszpolimorfizmust. Mivel a klónok SSCP vizsgálata korábban sikeresen felfedte a felszaporított DNS szakaszok változékonyságát, az ellenálló és fogékony fajták NBS szekvenciák közötti eltérést ismételt az egyszálú konformáció-polimorfizmus módszerével vizsgáltuk. Egyértelműen megfigyelhető a gélek alapján, hogy az általunk tervezett primerkombináció alkalmazásakor összesen 31 felszaporított DNS szakaszt nyertünk, míg a kisebb degeneráltsági fokkal rendelkező P-loopGent F és LM637 R primerkombináció esetében az összes fajtára nézve 13 elkülöníthető fragmentum keletkezett (**26. ábra**). Mivel egyik primerkombináció esetében sem találtunk kizárólag az ellenálló ‘Zard’ fajtára jellemző fragmentumot, megállapíthatjuk, hogy habár a kidolgozott technika a vizsgált fajták között egyértelmű változékonyságot mutatott ki, az NBS domén szekvenciáját tekintve, nem sikerült a monília-ellenállósághoz kapcsolt allélt meghatároznunk. Ezen eredmény alapján természetesen nem lehet kizárni, hogy a monília rezisztenciát nem NBS-LRR típusú rezisztenciagén okozza, de megállapítható, hogy a közel 60 NBS szekvencia között nem volt a rezisztens fajtában egyedileg megjelenő DNS-fragmentum.





**26. ábra.** A hét moniliára fogékony fajta 1: ‘Korai zamatos’, 2: ‘Goldrich’ 3: ‘Harcot’, 4: ‘Ceglédi Piroska’, 5: ‘Aurora’ 6: ‘Ceglédi bíbor’, 7: ‘Orange red’, - és az ellenálló ‘Zard’ kajszifajta NBS-LRR típusú rezisztenciagénekre specifikus PCR-termékek eltérésének kimutatása egyszálú konformáció-polimorfizmus technikával. A két primerkombináció közül a baloldali akrilamid gélen összesen 31 fragmentum, a jobboldali gélképen 13 fragmentum volt elkülöníthető. A 8. számú ‘Zard’ mintában nem található egyedi fragmentum, ezért ezek az RGA szekvenciák nem kapcsolhatóak a monilia-rezisztenciához.

### 5.2.2 A kajszii NBS LRR RGA-k filogenetikai vizsgálata

A filogenetikai vizsgálatot az általunk meghatározott 13 NBS RGA és 311 nemzetközi adatbázisból származó NBS szekvencia (293 a *Rosaceae* családból és 21 nem *Rosaceae* családból származó) illesztése, és ebből készített filogenetikai törzsfá alapján végeztük el (2. melléklet). A dendrogramon két (CC NBS és TIR NBS) jól elkülönülő csoportba kerültek a szekvenciák.

A saját NBS LRR szekvenciáink négy távoli csoportban helyezkednek el a törzsfán. A PaCC 5 és PaCC 2 a korábban Samuelian és mts. (2008) által létrehozott csoportok szerint a non-TIR I, a PaCC 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 és 11 non-TIR VI csoportba sorolódtak.

A kajszi TIR szekvenciái közül a PaT 1 a TIR XII és a PaT 2 a TIR XI csoportba került. A filogenetikai törzsfán a 70 %-nál nagyobb bootstrap értékkel támogatott elágazásokat fogadtuk el eltérő csoportnak.

A törzsfán kétféle csoport kialakulását figyeltük meg. Az első típusú csoportokban egy nemzetségből származó szekvenciák, míg a második típusú csoportban több génuszból származó szekvenciák kerültek. A CC-NBS szekvenciák 91 %-a rendeződött több nemzetségből származó szekvenciákat tartalmazó csoportokba. A TIR szekvenciák esetében ez az érték 57 % volt. A törzsfán a TIR-NBS-LRR szekvenciákat tartalmazó csoportban a nem *Rosaceae* családból származó szekvenciák kulcscsoportokat alkottak a *Rosaceae* eredetű szekvenciáktól. A CC típusú csoportban viszont a nem *Rosaceae* családba tartozó fajok szekvenciájának egynegyede a *Rosaceae* fajokkal került több nemzetséget tartalmazó csoportba. A dendrogramon a két csoport ágai eltérő hosszúságúak voltak. A TIR csoport szekvenciái terminális elhelyezkedéssel rövidebb ágakon, és faj- illetve nemzetség specifikusan helyezkedtek el. A CC-NBS szekvenciák hosszabb ágakon helyezkedtek el, és az elágazások a fa alapi része felé tolódtak el. Ezen megállapítások alól két csoport a *Prunus* IV és *Rosa* IX. kivételt képezett.

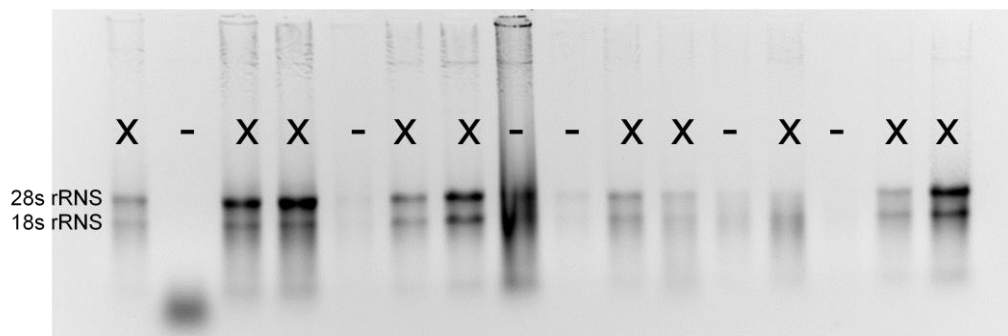
### **5.3 A ‘Zard’ és ‘Orange Red’ fajták vesszőfertőzésének transzkriptomikai vizsgálata cDNS-AFLP technikával**

A korábbi kísérleteink eredményei alapján megállapítható, hogy a ‘Zard’ fajta esetében tapasztalható ellenállóságot a vesszők hancsszövetének válaszreakciója biztosítja. A hancsszövetekben bekövetkező génkifejeződés nyomon követésére a cDNS-AFLP ‘One gen one tag’ (Vuylsteke és mts. 2007) technikáját választottuk. A technika biztosítja, hogy egyféle mRNS-ről egyetlen PCR termék keletkezzen, így növelve a vizsgálható expresszált gének számát. A két kiválasztott fajta közötti természetes fertőzéssel szembeni fogékonyságot a **27. ábra** szemlélteti.



**27. ábra.** Az eltérő tünetek a *M. laxa* vesszőfertőzésére. A: 'Orange red' fajta virágfertőzéséből kialakult teljes vesszőpusztulás. B: 'Zard' fajta termővesszőjén a virágfertőzést követően a kórokozó legfeljebb a kocsány körüli részen képes a háncsot elpusztítani, így a teljes termőrész épen marad C: A fertőzött és szürke exogén sztrómákkal borított virágról a kórokozó nem okozta a 'Zard' fajta rövid termőrész-pusztulását.

A munka első fázisaként a vesszőkből RNS kivonására került sor. A kiválasztott kajszifajták egészséges és fertőzött hajtásainak a még nem fertőződött hancsszövetéből sikeresen izoláltunk RNS-t a forró bórsavas módszerrel Wan és Wilkins (1994) leírása alapján. A harminc mintából a 16 esetben sikerült 50 ng/μl-nél nagyobb koncentrációban a nukleinsav-kivonás. Ezek minőségét ellenőriztük agaróz gélen (**28. ábra**). A két rRNS alegység diszkrét sávjai alapján döntöttük el a RNS minta további alkalmazhatóságáról.



**28. ábra.** RNS kivonás ellenőrzése 1 %-os agaróz gélen. Az X-szel jelölt mintákat a két rRNS alegység diszkrét sávjai alapján választottuk ki további vizsgálatokra.

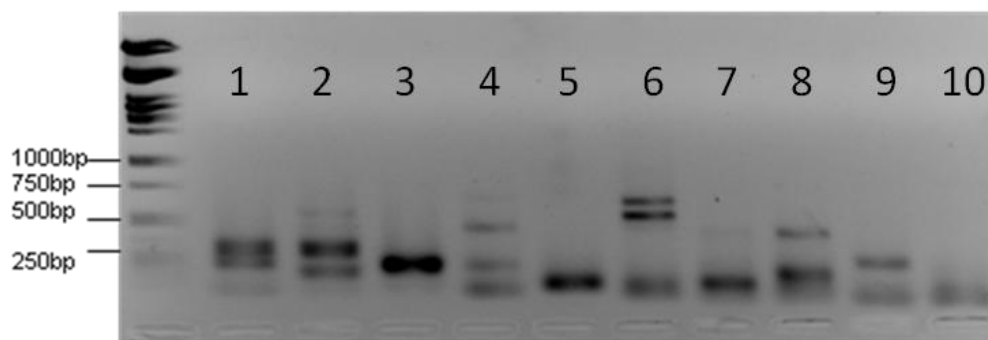
A cDNS kiegészítő szál készítésénél eltértem a protokolltól, mert a második szál szintézisét követően nem alkalmaztuk az *E. coli* ligázt. Előkísérletben ugyanazt a mintát kétféleképpen (ligázzal és nélküle) elkészítettük és azonos mintázatot kaptuk az akrilamid gélelektroforézis során.

A cDNS-AFLP első, nem szelektív PCR reakció agaróz gélen történő elválasztása során a protokoll által megadott 100-500 bp közötti elmosódott DNS mintázatot kaptuk.

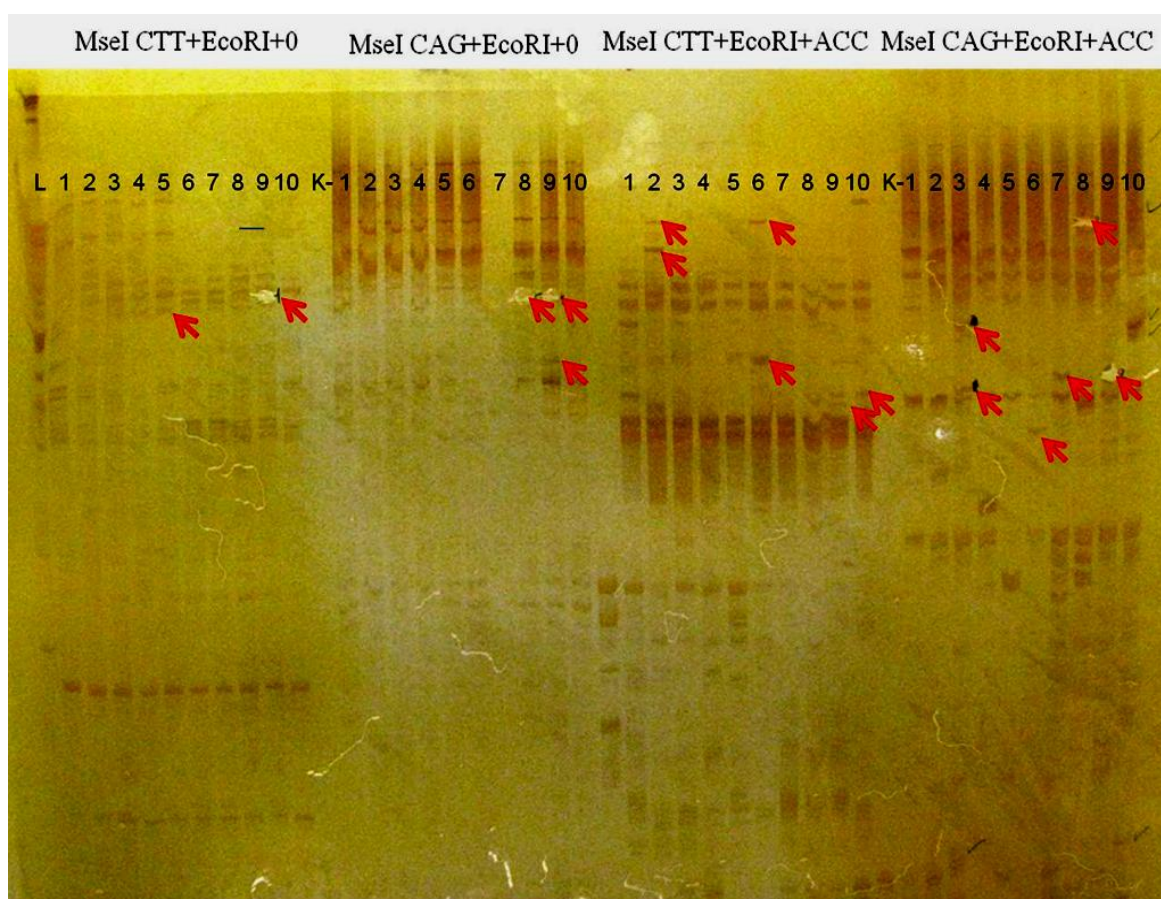
A második, szelektív nukleotidokat alkalmazó PCR reakció eredményét az **29. ábra** gélképe mutatja be.

Az agaróz gélelektroforézis alapján sikeres reakciók termékeit nagy felbontású 8 %-os denaturáló akrilamid gélelektroforézissel választottuk el (**30. ábra**). A gélen azokat a transzkriptum eredetű DNS fragmentumokat (TDF) választottuk ki szekvencia meghatározás céljából, amelyek egyedien jelentek meg a két fajta fertőzött mintái között. 30 fragmentumot izoláltunk, és ezekből 18 mintát sikerült felsokszorozítanunk re-PCR során. A PCR termékek bázissorrendjét direkt szekvenálással határoztattuk meg.





**29. ábra** A II. szelektív primerkombináció alkalmazása a 10 vizsgált kajszimintán. Minták sorrendben (Z: 'Zard', OR: 'Orange Red') 1: Z egészséges II., 2: OR egészséges I., 3: Z egészséges II., 4: Z fertőzött II., 5: Z fertőzött II., 6: Z fertőzött I., 7: Z fertőzött I., 8: OR fertőzött I., 9: Z fertőzött I., 10: Z egészséges M: 1-kb + DNS-marker



**30. ábra.** A kajszi vesszők hánccszövetmintáinak cDNS-AFLP vizsgálata négy primerkombinációt alkalmazva. Z: 'Zard' OR: 'Orange Red' 1: Z egészséges II., 2: OR egészséges I., 3: Z egészséges II., 4: Z fertőzött II., 5: Z fertőzött II., 6: Z fertőzött I., 7: Z fertőzött I., 8: OR fertőzött I., 9: Z fertőzött I., 10: Z egészséges K-: vizes kontroll A piros nyilak jelzik a gélből kivágott és megszekvenáltatott fragmentumok egy részét.

### 5.3.1 A TDF-ek homológia alapján történő azonosítása

Az NCBI nukleotid adatbázisában (nBLAST) és az őszibarack genomon (Phytozome 8.v) azonosítottuk a 18 mintánkkal nagy hasonlóságot mutató szekvenciákat (**13. táblázat**).

Egy fertőzött vesszőből származó ‘Orange red’ szekvenciáról megállapítottuk, hogy a *Pseudomonas fluorescens* szaprofág baktérium génjét kódolja, ami külső szennyeződésre utalt. A további elemzésekből ezt a szekvenciát kizártuk. A 17 szekvencia őszibarackgenommal történő illesztés során 11 esetben sikeresen határoztuk meg a genomban való elhelyezkedésüket (**13. táblázat**). A 3., 6., 9., 11., 14. és 18. minta esetében nem sikerült az őszibarackgenommal értékelhető azonosságot kimutatnunk ( $E$ -érték  $<10^{-8}$ ). A 11 szekvencia feltételezhető funkciójának megállapítását homológia alapján végeztük el. Három minta esetében (4., 10., 16.) nem találtunk lehetséges génfunkciót. A 12. és 13. TDF-ek mindkét fajtában megjelentek a fertőzés hatására, és egy cink-ujj domént tartalmazó fehérjét kódolnak.

A 15. TDF szekvenciája a poligalakturonáz enzimgátlófehérjék (PGIP) szekvenciáival mutatott egyezést ( $E$ -érték: 0). A szekvencia forrását jelentő TDF kizárólag a poliakrilamid gélen az első alkalommal gyűjtött, fertőzött ‘Zard’ mintákban volt megtalálható. Továbbiakban ennek a PGIP gén szekvenciájának meghatározását és a vesszőmintákban a gén kifejeződésének vizsgálatát tűztük ki célul.

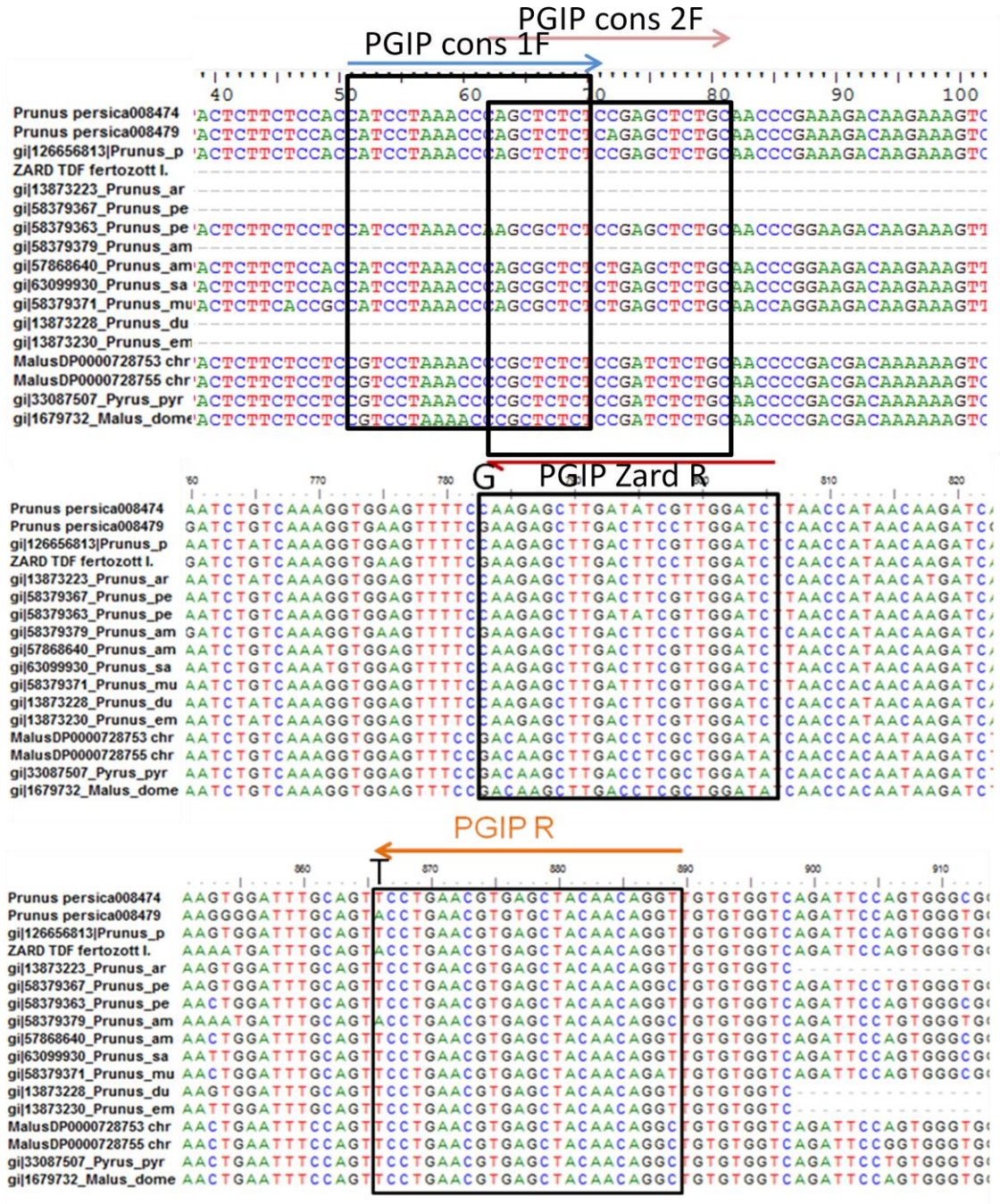
**13. táblázat.** A cDNS-AFLP során kiválasztott fragmentumok lehetséges génfunkcióinak feltételezése szekvenciaazonosság alapján. A táblázatban az őszibarackgenommal hasonlóságot ( $E$ -érték $<10^{-8}$ ) mutató fertőzött mintákból származó szekvenciákat tüntettük fel. Zöld színnel a ‘Zard’ fajtából, narancssárga háttérrel az ‘Orange red’ fajtából, míg a mindkét fajta mintáiban jelenlévő fragmentumokat türkizkékkel jelöltük.

Transzkriptumból származó DNS fragmentum (TDF)	TDF hossza (bp)	Azonosság alapján feltételezhető fehérjék	Az őszibarack genomjával történő illesztés alapján		
			TDF lókusza,	$E$ -értéke,	kromoszómán a pozíciója
1. Zard fertőzött I.	363	PQ-loop fehérjecsalád	ppa017921	2e-63	3: 21.079.579-21.081.198
			ppa021350,	2e-63	3: 21.076.300-21.089.160
2. Zard fertőzött I.	538	Della protein	ppa003975	1.00e-254	7: 20.910.516-20.912.871
4. Orange Red fertőzött I.	733	ismeretlen fehérje	ppa011164	1.5e-124	2: 3.192.907-3.195.390
7. Zard fertőzött II.	605	Foszforibulokináz	ppa000994	2.6e-133	1: 22.024.771-22.025.550
8. Orange Red fertőzött I.	224	Transzmembrán aminosav transzport fehérje	ppa005008	6.6e-89	4: 24.765.300- 24.785.103
10. Zard fertőzött I.	185	ismeretlen fehérje		3.8e-61	6: 11.623.135-11.623.296
12. Zard fertőzött I.	125	Cink-ujj fehérje (C3HC4)	ppa024723	8e-36	2: 25.878.109 – 25.880.378
13. Orange red fertőzött I.	124	Cink-ujj fehérje (C3HC4)	ppa024723	8e-36	2: 25.878.109 – 25.880.378
15. Zard fertőzött I.	452	Poligalakturonáz-gátló fehérje (PGIP)	ppa008474	5.5e-153	7: 10.624.791-10.625.217
			ppa008479	0.	7:10.645.144-10.645.571
16. Orange Red fertőzött I.	289	ismeretlen fehérje	ppa007057	1e-24	6:14.564.060-14.564.360
17. Zard fertőzött II.	380	PQ-loop fehérje család	ppa021350	2e-63	3: 21.076.300-21.089.160

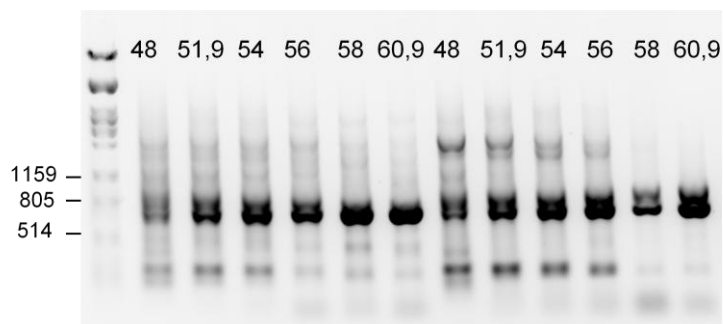
### 5.3.2 PGIP gének szekvenciáinak meghatározása

Azonosítottunk az általunk megtalált PGIP gén részleges szekvenciájával hasonlóságot mutató két lókuszon található két PGIP ortológ gént az őszibarack és két gént az almagenomból és szekvenciájukat letöltöttük. Az ezekkel nagy hasonlóságot mutató *Rosaceae* családhoz tartozó fajokban található feltételezhető PGIP szekvenciákat az NCBI adatbázisból gyűjtöttük ki. A szekvenciákból a nem kódoló részeket eltávolítottuk (intronok, 3' és 5' UTR) és ezek illesztése alapján a konszenzus szekvenciárészekre primereket terveztünk az egymástól legtávolabb eső 3' és 5' konzervált régiókra (**31. ábra**). A forward primerek közül a PGIP1 F, a *Prunus* nemzetség szekvenciájára specifikusan, PGIP2 F primert *Prunus*, *Malus* és *Pyrus* nemzetségek konszenzus szekvenciájára terveztük. A reverse primerek közül az egyiket a 15. TDF minta szekvenciájára specifikusan (PGIPZ R), míg a másodikat (PGIP R), a 15. TDF mintát mellőző szekvenciákra terveztük. A primerek alkalmazásának optimalizálására gradiens PCR-t készítettünk mindkét fajta genomi DNS-en (**32. ábra** és **33. ábra**). A PGIP1F és PGIPZ R primerkombináció alkalmazásakor mindkét fajta esetben egy 750bp körüli termék jelent meg a legmagasabb (60,9 °C) tapadási hőmérséklet alkalmazásakor, ez alapján megállapíthatjuk, hogy a PGIPZ R primer nem működik specifikusan a Zard fertőzött mintáiban kimutatott PGIP allélra.

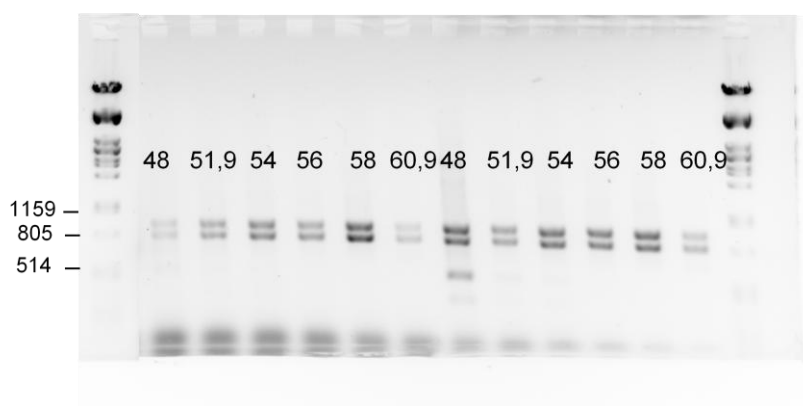




**31. ábra.** A négy primer elhelyezkedése a *Rosaceae* PGIP génszekvenciák illesztése alapján kapott konzervált régiókra. A PGIP Zard R reverz primert a 15. TDF szekvenciára specifikusan (G), míg a PGIP R primer a 15. TDF felszaporítását mellőzi (T).



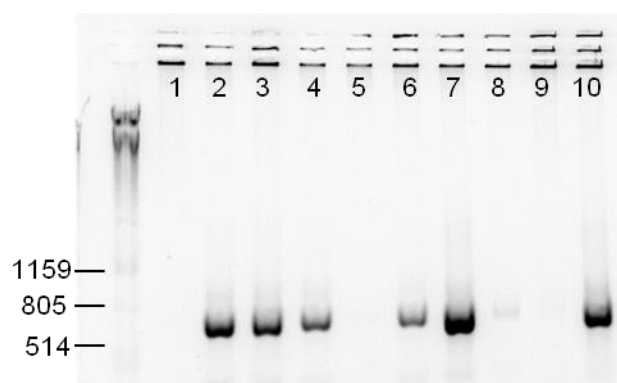
**32. ábra.** A PGIP1F és PGIPZ R primer kombináció gradiens PCR alkalmazása 48-60,9 C-os tapadási hőmérsékletek alkalmazásával a Zard (1-6 oszlop) és Orange Red (7-12 oszlop) fajták DNS-ével.



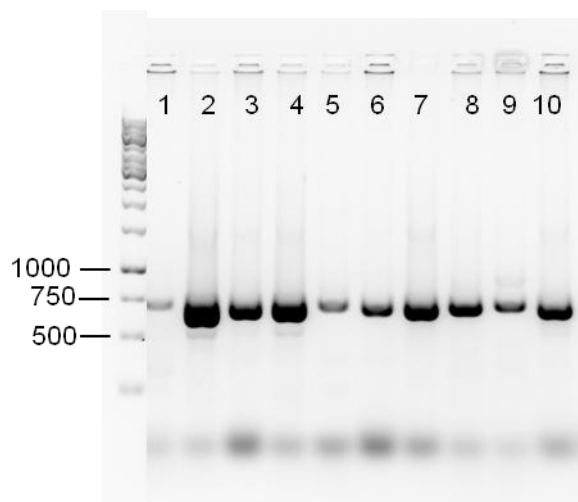
**33. ábra.** A PGIP1F és PGIPR primerkombináció gradiens PCR alkalmazása 48-60,9 C-os tapadási hőmérsékletek alkalmazásával a 'Zard' (1-6 oszlop) és 'Orange Red' (7-12 oszlop) fajtákon.

A 15. TDF minta szekvenciáját kizáró primerkombináció (PGIP1F és PGIP R) gradiens PCR eredményeül két jól elkülönülő 800 bp és 900 bp hosszúság körüli fragmentumokat kaptunk, a két fajta között hosszpolimorfizmust nem tapasztaltunk. A becsült fragmenthosszak megfeleltek az őszibarackgenomból származó két lókuszon található intron nélküli és intront tartalmazó allélok hosszúságának (**33. ábra**).

A két primerkombinációval ellenőriztük a vesszőmintáinkból származó cDNS-eket, hogy jelen van-e a PGIP gén bármely allélja. A fertőzetlen mintákban nem kaptunk terméket a PGIPR és PGIP1F primerek alkalmazásával (1, 8, 9). A két fajta fertőzött mintáiban (2, 3) viszont azonos erősségű mintázatot kaptunk. A második alkalommal gyűjtött 'Zard' fertőzött mintákban (4 és 6) egy hosszabb és gyengébb termék jelent meg (**34. ábra**). Megállapíthatjuk tehát, hogy a PGIP gének a két kajszfajta esetében a *M. laxa* fertőzésre adott válaszként fejeződnek ki a vessző hancs szövetében.



**34. ábra.** A vesszőkből származó cDNS-minták PGIP1 F és PGIP R primerekkel készült PCR-termékek elválasztása agarózgélen. 1: Z ép., 2: Z fertőzött I., 3: OR fertőzött I., 4: Z fertőzött II., 5: Z fertőzött II., 6: Z fertőzött II., 7: Z fertőzött I., 8: Z ép II., 9: OR ép , 10: Z fertőzött I. Rövidítések Z: ‘Zard’, OR: ‘Orange Red’

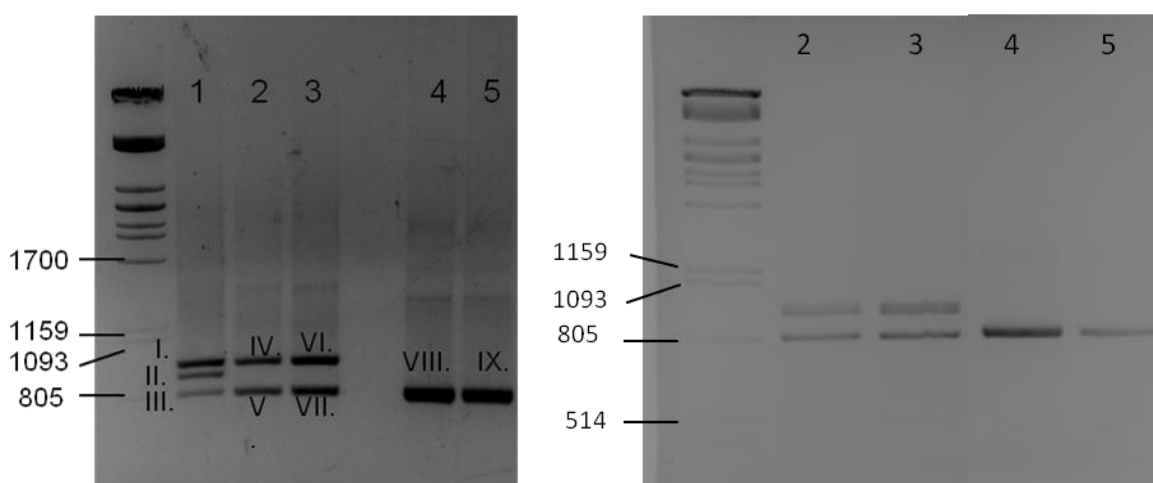


**35. ábra.** A vesszőkből származó cDNS-minták PGIP1F és PGIPZ R primerekkel készült PCR-termékek elválasztása agarózgélen. Minták sorrendben 1: Z ép II., 2: Z fertőzött I., 3: OR fertőzött I., 4: Z fertőzött II., 5: Z fertőzött II., 6: Z fertőzött II., 7: Z fertőzött I., 8: Z ép II., 9: OR ép , 10: Z fertőzött I. Rövidítések Z: ‘Zard’ OR: ‘Orange Red’.

A PGIPZ R és PGIP1F primer kombináció alkalmazásakor a fertőzött ‘Orange Red’ mintákban is megjelent azonos erősgű termék (**35. ábra**), miközben a fertőzetlen mintákban egy halvány fragmentum jelentkezett. Ezek alapján a cDNS AFLP során kiválasztott PGIP szekvenciára (15. TDF) tervezett primer (PGIPZ R) nem működik allélspecifikusan, mert mindkét fajta fertőzetlen és fertőzött mintáiból származó cDNS-en fragmentumokat szaporított fel.

A PCR-termékeink szekvenciájának meghatározásával kívántuk ellenőrizni, hogy a felszaporított termékek valóban a PGIP génekkel mutatnak hasonlóságot. Ezentúl a cDNS-AFLP technika alkalmazásakor kizárólag a ‘Zard’ I. fertőzött mintáiban megjelenő (15. TDF) allél szekvenciáját szeretnénk volna meghatározni.

Három fajta genomi DNS-en (‘Korai zamatos’, ‘Orange red’, ‘Zard’) és a két fajta fertőzött vesszőiből készült cDNS mintáján készítettünk PCR-t PGIP1 F és PGIP R primereket alkalmazva. A gélből izolált és klónozott fragmentumokat 33. ábra mutatja meg. A második 2 %-os agaróz gélen a 900 bp hosszúságú termékről kiderült, hogy két eltérő hosszúságú fragmentumot rejt (**36. ábra**).



**36. ábra.** PGIP1 F és PGIP R primerkombinációval készült PCR-termékek elválasztása 1 és 2 %-os agaróz gélen. 1: ‘Korai zamatos’, 2: ‘Orange red’, 3: ‘Zard’, 4: cDNS Zard fertőzött I., 5: cDNS ‘Orange red’ fertőzött vessző minta. A római számokkal jelöltem a gélből izolált és klónozott fragmentumokat.

A gélből kivágott fragmentumokat klónoztuk, és a genomi fragmentumonként (I-VII) 5- klónt, míg a cDNS-ről (VIII-IX) készült klónokból 10-et küldtünk el szekvencia-meghatározásra. Egy fajtából összesen négy lehetséges allélt a ‘Zard’ fajtából sikerült azonosítanunk, míg az ‘Orange red’ és ‘Korai zamatos’ fajtából 3-3 allélt azonosítottunk. A ‘Zard’ fajtából két szekvencia tartalmazott azonos hosszúságú intront viszont a **36. ábrán** bemutatott gélképén hosszabb (900bp) allélok (IV: és VI. fragmentumok) két eltérő méretű fragmentumból állnak. Így a ‘Zard’ fajta genomi alléljainak a száma legalább öt, amire elfogadható magyarázat lehet a megszekvenált és eltérő allélként kezelt szekvenciák között az eltérés nem minden esetben valós, vagy a kajszi esetében több mint két kópiában

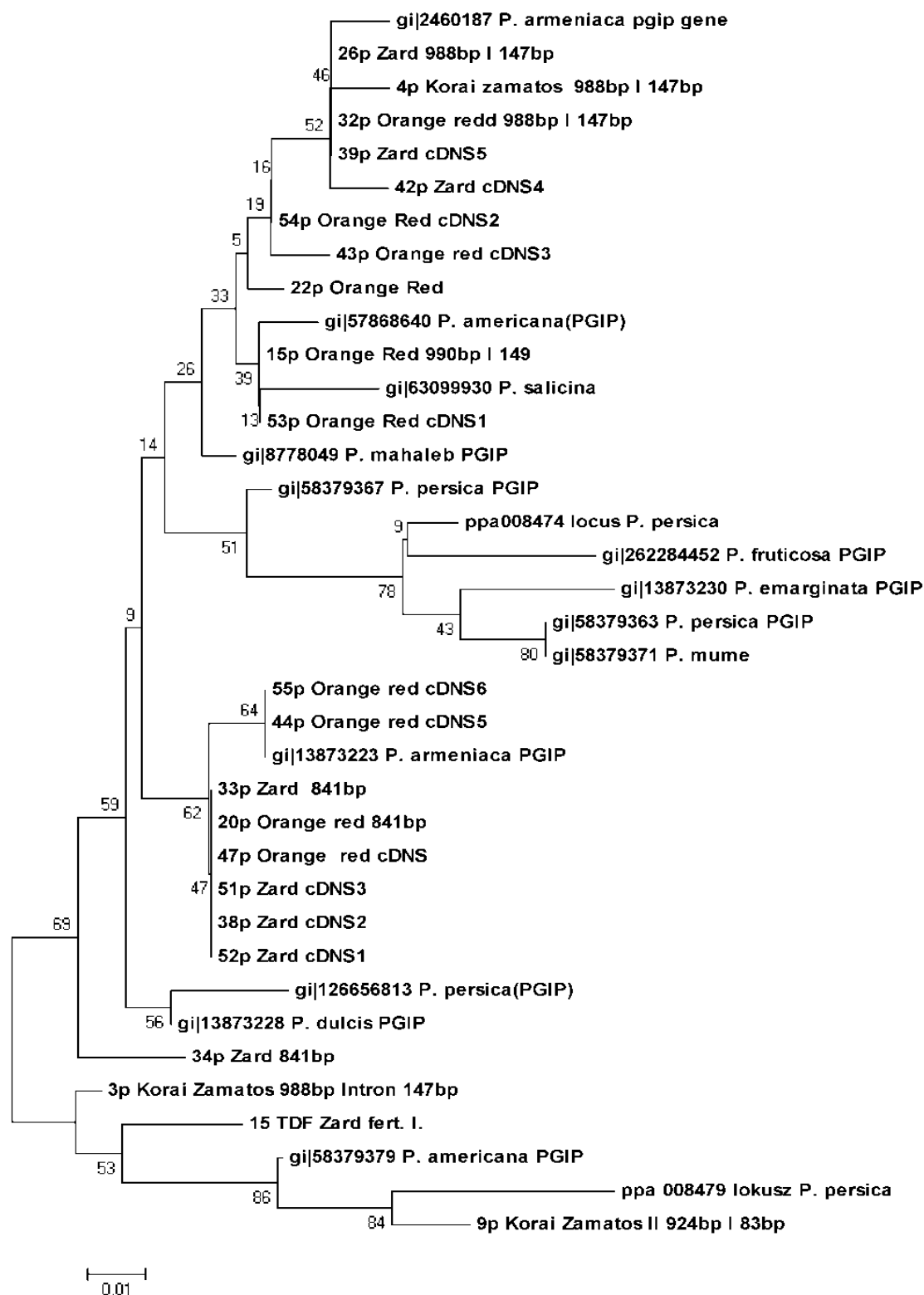
található meg a PGIP lókusznál. A két fajta és a cDNS termékekről készült szekvenciák egyike sem volt azonos az eredeti cDNS AFLP során kapott 15. TDF számú minta szekvenciájával.

A genomi szekvenciák közül a 'Zard' és az 'Orange red' fajta esetében két különböző hosszúságú szekvenciát kaptunk, a 988 bp hosszú termék tartalmazott 147 bp hosszúságú II. fázisú intront, míg a 841 bp hosszúságú termék egy nyílt leolvasási keretet adott. A 'Korai zamatos' fajta esetében a gélből kivágott I. számú fragment méretében megegyezett a két másik fajta 988 bp hosszúságú termékével, II. termék kolóniáiból származó szekvencia egy 83 bp hosszúságú kettes fázisú intront tartalmazott. Ez az intron az őszibarackgenomból származó PGIP gén intronjához képest egy nukleotiddal volt hosszabb. A két cDNS (fertőzött 'Zard I.' és fertőzött 'Orange red') mintáról származó szekvenciák hossza egységesen 841 bp hosszúságú volt.

A két cDNS-ből származó minta esetében 10-10 megszekvenált plazmidról az 'Orange red' esetében hat eltérő szekvenciát azonosítottunk, a 'Zard' esetében öt eltérő nukleinsav-szekvenciájú allélt találtunk. Az alma és őszibarack genomban kép kópiában találhatók meg a PGIP lókusztok, ezért maximálisan négy allélt vártunk. Mindkét cDNS-ből származó szekvenciák esetében ennél többet kaptunk, ezért a szekvenciákat a kromatogrammon ismét ellenőriztük. Az eltérést mutató pozíciókban nem tudtuk a kromatogramok revíziója után sem ezekből a szekvenciákról eldönteni vajon azonos allélt kódolnak-e. Az eltérések a reverz transzkripció és azt követő PCR során is kialakulhattak. Az eltérést mutató nukleotidok ellenőrzése végett szekvencia adatbázisból származó szekvenciák és a saját szekvenciák illesztése alapján megállapítható, hogy a kérdéses pozíciók mindegyikében több eltérő nukleotid található.

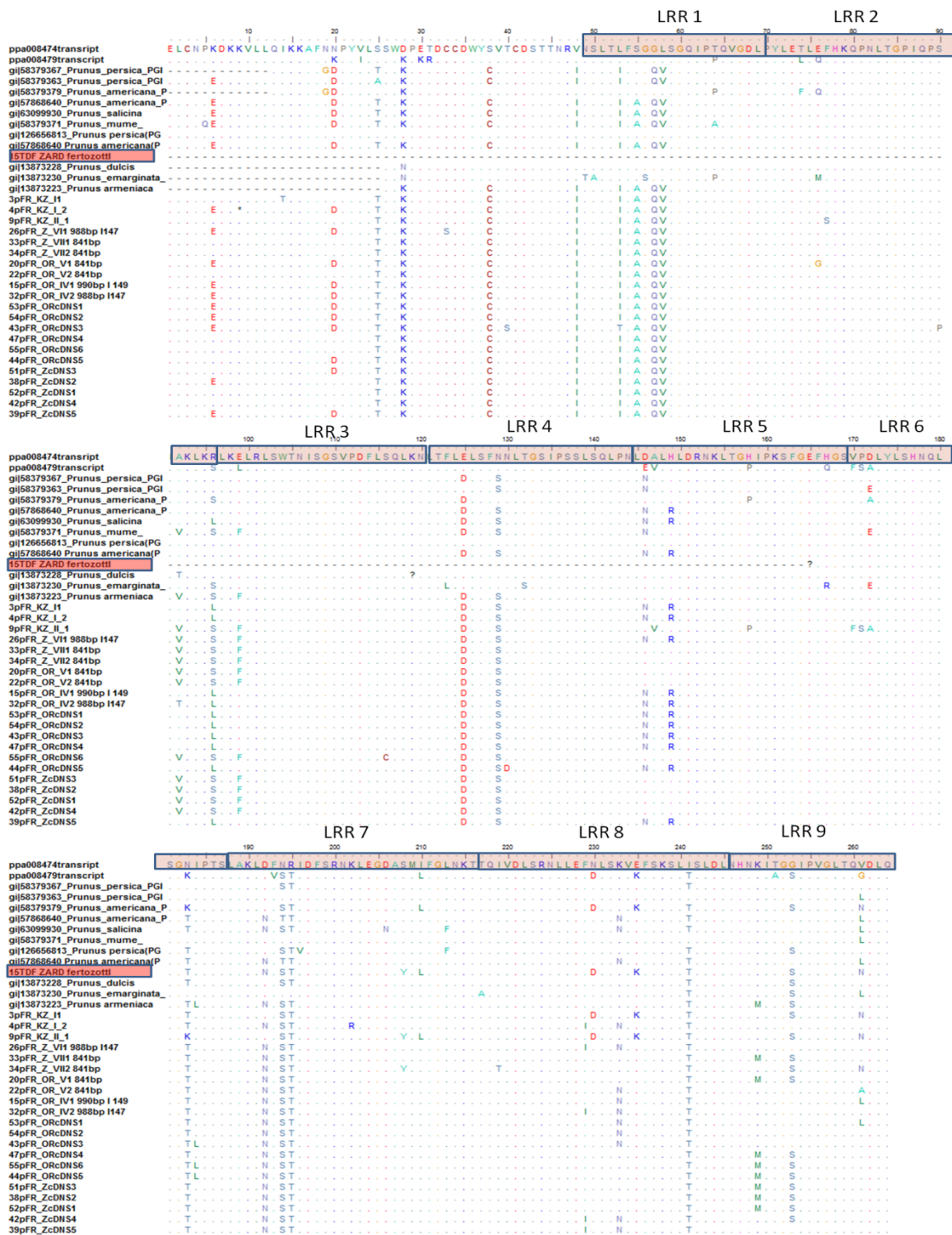
A cDNS-minták PCR analízise alapján megállapítható, hogy a fogékony fajtában egyaránt megjelentek a fertőzés hatására a PGIP gén szekvenciái, habár az expresszió szintjére nem tudtunk következtetni. Eszerint a cDNS AFLP során tapasztalt eltérést, miszerint a 15. TDF csak a 'Zard' fertőzött I. mintákban jelent meg, a PGIP allélok közötti szekvencia eltérés okozta és nem az expressziós különbség. Az AFLP során alkalmazott restrikciós enzimek közül csak a *Tru I* hasító helyét sikerült a PGIP szekvenciákon megtalálnunk, mert a megszekvenált klónok nem tartalmazták a 15. TDF 3' részét, ahol az *Eco RI* hasítása történt. Az adatbázisból kigyűjtött teljes PGIP szekvenciák egyikén sem találtuk meg az *Eco RI* hasító helyet ezért valószínűsíthetjük, hogy a 15. TDF szekvenciája ezen a részen tér el az 'Orange red' és a többi *Prunus* PGIP szekvenciától.

A genomi és kifejeződő kajszi PGIP gének szekvenciájának illesztését elvégeztük. Az illesztésbe bevontuk az összes NCBI adatbázisból található *Prunus* PGIP génszekvenciát és az összes általunk meghatározott eltérő PGIP nukleotidszekvenciát. A filogenetikai törzsfa alapján megállapítható, hogy a legnagyobb hasonlóságot a 15. TDF szekvenciával *P. americana* (gi 58379371) fajból származó és a 'Korai zamatos' (9pFR-KZ\_II\_1) kajszi-fajtából származó rövid intront tartalmazó allél szekvenciák adták (**37. ábra**). Mivel a 'Korai zamatos' fajta az *M. laxa* fertőzéssel szemben fogékony, így 15. TDF és a 'Korai zamatos' szekvencia közötti aminosav-eltéréseket kerestem meg az illesztés alapján. Összesen öt különböző aminosav található a két szekvencia között (**38. ábra**). Az aminosav helyettesítések a 'Korai zamatos' és a 'Zard' fajta szekvenciái között neutrálisnak az aszpargin és aszparginsav ( $N \leftrightarrow D$ ) csere számít, a további blossom mátrix alapján nem konzervatív változások ( $V \leftrightarrow F$ ,  $P \leftrightarrow S$ ,  $D \leftrightarrow A$ ,  $T \leftrightarrow K$ ) a fehérje funkciójának megváltozását okozhatják. Az öt eltérő pozícióban a 'Korai zamatos' fajta szekvenciája négy esetben azonos az őszibarack ppa008479 lókuszon található alléljával. A 15 TDF szekvencia a PGIP génnek mindössze 30 %-át fedi le, így a teljes allél szekvenciájának meghatározása elengedhetetlent a szekvenciák összehasonlításához.



**37. ábra.** A *Prunus* fajokból származó PGIP gének következtetett aminosav szekvenciái szomszéd összevonás eljárással szerkesztett filogenetikai törzsfája. Az általunk meghatározott szekvenciákat számokkal jelöltük. A genomi szekvenciáink mögött az allélok hosszát és az intronok méretét jelöltük. Az adatbázisból származó szekvenciák a gén index és a faj latin nevével kerültek feltüntetésre.





**38. ábra.** *Prunus* fajok részleges PGIP génjének cDNS származtatott aminosav sorrendjének ClustalW szoftverrel készített többszörös illesztése. A PGIP gén LRR ismétlődéseit kék kerettel jelöltük. A cDNS AFLP során meghatározott 15. TDF piros árnyalással tüntettük fel, rövidítések OR: ‘Orange red’, Z: ‘Zard’, KZ: ‘Korai zamatos’.



## 6 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### 6.1 Kajszfajták és közeli rokon diploid *Prunus* fajok fogékonysága a *M. laxa* okozta termőrészpusztulásra

A vizsgált fajok és fajták esetében tapasztalt termőrészpusztulás mértéke alapján megállapítható, hogy a kajszfajták érzékenysége folyamatos eloszlást mutatott. Az átlagos termőrészpusztulás a vizsgált kajszfajták esetében 5-30 % között változott. A kajszfajták ellenállóságát ez alapján, mennyiségi tulajdonságként lehet jellemezni, ami alól a 'Zard' fajta ellenállóképessége képez kivételt. Az adataink összevetése irodalmi adatokkal nem történhet egzakt módon, mert korábban nem történt a kórokozó kártételének idős fajtagyűjteményben felmérése az általunk használt kategóriák alkalmazásával. Erre magyarázatot ad, hogy a *M. laxa* kártétele az ültetvény vagy génbank gyors visszafordíthatatlan leromlását okozza. A fertőzés felvételezésére korábban több módszert is alkalmaztak. Benedek és mts. (1990) az összes fertőzött termőrész arányát százalékosan adta meg. Komar-Tyomnaya és Richter (2000) ötfokozatú érzékenységi csoportokba sorolta a vizsgált fajtákat, de a csoportosítás szempontjait nem közölték. Balan és mts. (1999) a fertőzés gyakoriságát és a fertőzés intenzitását felvételezték és ezen értékek szorzatával határozták meg a fertőzési szintet (Attack level:A.L).

A meggy esetében Rozsnyay (2001) arról számol be, hogy a virágfertőzés mindegyik vizsgált fajtán legalább 40 %-os mértékben előfordult, de az immunisnak tartott 'Bosnyák' és 'Csengődi' fajtákon nem következett be vesszőpusztulás. Ezzel megegyező következtetésre jutottunk a kajszi fajták esetében, mert az ellenálló 'Zard' fajta esetében a virágfertőzés előfordult, míg termőrészpusztulás csak nagyon ritkán.

Egy kecskeméti kajsziültetvényben nyolc magyar fajta egy éves moniliás vesszőfertőzés megfigyelése alapján Benedek és mts. (1990) 9-28 % közötti fertőzöttséget rögzítettek. A vizsgált két ültetvényrész között a 'Gönci magyarkajszi' és 'Ceglédi óriás' fajták esetében több mint 10 %-os eltérést tapasztaltak. A két ültetvényrészben felvételezett fertőzés alapján a 'Mandulakajszi' (12 és 14 %) és 'Ceglédi bíborkajszi' (14 és 9 %) adatai vethetőek össze az általunk mért ellenállósággal. A szigetcsépi ültetvényben felvételezett fertőzöttség alapján felállított érzékenységi sorban a fenti két fajta egymás mellett található 16 és 17 %-os fertőzöttséggel. Amennyiben Benedek és mts. (1990) adataiból a 'Ceglédi óriás' (10 %) és 'Gönci magyarkajszi' (11 %) esetében kizárólag az I. ismétlés adatait tekintjük, az érzékenységi sorunkkal összevetve megállapítható, hogy a 'Ceglédi óriás'

3 %-kal erősebb fertőzést szenvedett a szigetcsépi felmérés során, viszont a ‘Gönci magyarkajszi’ esetében 3 %-kal nagyobb ellenállóságot tapasztaltunk. Az általunk mért erősebb fertőzöttséget a ‘Mandulakajszi’, ‘Ceglédi óriás’, ‘Ceglédi bíborkajszi’ esetében az extenzív ültetvényi körülményekkel, míg a csökkent fogékonyságot ‘Gönci magyarkajszi’ esetében a felhagyott ültetvényben a ‘Gönci magyarkajszi’ alacsony virágszámával magyarázhatjuk.

Balan és mts. (1999) vizsgálataiban 124 kajszifajta és hibrid közül egyetlen hibridet találtak teljesen ellenállónak, 4 fajtát ellenállónak vagy mérsékelten ellenállónak, 14 fajtát fogékony és nagyon fogékony kategóriába sorolnak. A ‘Goldrich’ fajtát a fogékony kategóriába sorolták, ami az általunk mért közel 20 %-os termőrész pusztulással megegyező eredménynek tekinthető.

Komar-Tyomnaya és Richter (2000) a nyikitai csonthéjas génbanki gyűjteményben végzett vizsgálatai alapján a kajszifajtákat egységesen a fogékony kategóriába sorolták. A ‘Sintez’ és ‘Uryuko-alyca’ kajszi és cseresznyeszilva hibridfajták teljes immunitást mutattak a fertőzésre. A *P. dasycarpa* fajták közül ‘Grossa tardiva’, ‘Manaresi’ ‘Tlor Ciran’, ‘Picole precocte’, a plumcot fajták közül a ‘Zamshevy’, ‘Krasny’ fajtákat sorolták az ellenálló kategóriába. A *P. sibirica* faj egyedeit a fogékony kategóriába sorolták, ami a Vácrátóti Botanikus Kertben szibériai kajszikon tapasztalt erős természetes monília fertőzéssel megegyezik. Tzonev és Yamaguchi (1999) a ‘Red June’ és a ‘Sordum’ *P. salicina* fajtákat határozták meg teljesen ellenállónak. A saját eredményeink szerint a két vizsgált japánszilvafajta a ‘Methley’ és ‘Burbank’ teljes immunitást mutatott a három vizsgálati év során. Az 1/33 kajszi és cseresznyeszilva hibrid ellenállósága is megfelel Komar-Tyomnaya és Richter (2000) eredményeinek. Fontos megemlíteni, hogy a *P. dasycarpa* Surányi (2003) szerint a *P. armeniaca* és *P. cerasifera* állandósult hibridje, így tulajdonképpen az 1/33 hibridünkkel pedigreje azonos. Természetesen ebben az esetben a rezisztencia forrása a *P. cerasifera*, amit az ültetvényünkben kijelölt mirabolán alanyon mért 2-3 %-os fertőzés erősít meg. A plumcot fajhibridek a kajszi és japánszilva keresztezésével létrehozott fajták, az ellenállóságot a japánszilva tulajdonságai közül örökölhették.

Tzonev és Yamaguchi (1999) a *P. mume* fajták ellenállóságáról számol be Japánban szerzett tapasztalataik alapján. A két év virágzási adatai szerint *P. mume* egyedek a botanikus kerti megfigyeléseink alapján teljes ellenállóságot mutattak. Két vizsgálati évben

viszont a virágrügyek teljes téli fagykárt szenvedtek, így ezekben az években a kórokozó számára nem állt rendelkezésre fertőzési pont.

A mediterrán régióban ellenállónak tartott ‘Hamidi’, ‘Ivone Liverani’ (Nicotra és mts., 2006, Crossa-Raynaud, 1969) fajtákat a kísérleteink során nem vizsgáltuk, így ezek összehasonlítása az eredményeinkkel nem lehetséges.

Az érzékenységi sor alapján kétféle ellenállóságot tapasztaltunk. Az első esetben a termőrészpusztulás maximum 2-3 %-ot ért el. A *P. salcina*, *P. cerasifera*, *P. dasycarpa*, 1/33 kajszi-szilva hibrid és a *P. armeniaca* ‘Zard’ fajták rendelkeztek ezzel az ellenállósággal. Ezeken a fajtákon a virágfertőzés kialakulása után a termőrészek háncsszövetének néhány mm-es pusztulása ment végbe, amit a háncsszövet megvastagodása zárt le. E genotípusok esetében nem tapasztaltuk a hosszú termőrészek pusztulását a három év során, és az összes termőrészpusztulás nem érte el az 5 %-os szintet. A termőrészpusztulást általában a korona belső felében történt, árnyékolt gyenge növekedésű termőrészekben. A tünetek alapján ez az ellenállóság a fertőzés hatására alakul ki a háncsszövetben, ezért ezt a fertőzés hatására kialakuló aktív rezisztenciának tekintjük.

A kajszi fajták közül a ‘Pisana’, ‘Pannónia’, ‘Venusz’, ‘Magyarkajszi C235’, ‘Gönci magyarkajszi’, ‘Nikitszkij’ esetében a fertőzés nem érte el a 10 %-os termőrészpusztulást. E fajták esetében előfordult a hosszú termőrészek fertőződése, bár jellemzően mindegyik fajta rövid termőnyársakon hozta a virágait. Ez a jelenség az ellenállóság magyarázataként is szolgálhat, mert a rövid termőrészek pusztulása kisebb mértékű veszteséggel jár. A magyarkajszi fajtakörhöz tartozó ‘Pannónia’, ‘Venusz’, ‘Magyarkajszi C235’, ‘Gönci magyarkajszi’, ‘Nikitszkij’ fajták esetében a kis virágszám tovább csökkenti a fertőzés kialakulásának esélyét.

## **6.2 A virágszirom fertőzésére adott reakciók összehasonlítása különböző fajtáknál**

A szirm fokozott fogékonyságára a mikroszkopikus vizsgálatok adtak magyarázatot. A keresztmetszeti felvétel alapján a szirmot összesen két összefüggő egysoros epidermisz sejtsor határolja, ami között egy nagy extracellulárisokat tartalmazó alapszövet található. Az epidermisz nem tartalmaz gázcserenyílásokat, a kórokozó enzimeivel képes a kutikula és a sejtfal áttörésére. Az epidermisz sejteket áttörve egy könnyen kolonizálható nagy intercellulárisokat tartalmazó mezofillum szövetet talál, ahol az extracelluláris

sejtfalbontó enzimeit szabadon terjedhetnek szét, így kialakítva a szíromszövet teljes macerációját.

Az ültetvényben megfigyelt virágfertőzés és a kasztrált virágok fertőződésének elmaradása alapján a kajszli, japánszilva és cseresznyeszilva mesterséges szíromfertőzését végeztük el. Az ültetvényben a fajták virágzásidejének eltéréséből adódó eltérő klimatikus viszonyok kiküszöbölése miatt tartottuk szükségesnek a fajták *in vitro* fertőzését.

A vizsgált kajszifajták szirmai a fertőzést követő 7 órában egységesen a fertőzési csepp körül mutatták a szövet pusztulását. A kajszifajták között 28 órával a fertőzés után tapasztaltunk a legnagyobb eltérést az elpusztult szíromlemez méretében. Ekkor az 'Orange red', 'Gönci magyarkajszli', 'Bergeron', 'Sulmonax', 'Korai zamatos', 'Forum' fajták szirmai teljesen elbarnultak, miközben a 'Marculesti 18/6' és 'Zard' fajták szíromfertőzése nem érte el a szírom felületének 50 %-át. Habár ekkor (28 óra elteltével) jelentős eltérés volt tapasztalható a fajták között, 5 órával később mindegyik kajszifajta szirma legalább 90 %-ban elpusztult. Ezek alapján az eltérés a kajszifajták szíromfogékonysága között nem határozható meg az ellenállóképességet, mert a teljes szíromfertőzés mindegyik genotípusnál kialakult. Az *P. cerasifera* és a 'Zard' kajszifajta esetében tapasztalt ellenállóság alapján viszont az immunis fenotípus gyors tesztjeként szolgálhat a szíromfertőzés. A cseresznyeszilva szirmok mutatták a vizsgált genotípusok közül a legnagyobb ellenállóságot, a teljes szírompusztulásig három nap telt el.

### **6.3 A megporzás és virágfertőzés közti összefüggés vizsgálatának eredményei**

A fertőzés lefolyására széles körben elfogadott hipotézis a *M. laxa* konídiumainak a bibén keresztüli virág fertőzése. Az elképzelés, ahogy egy 1930-ban készült rajz is mutatja, a bibe barnulása alapján feltételezi a kórokozó növénybe történő behatolását (Kerekes, 1930). E szerint a csonthéjas fajok virágfertőzésénél a *M. laxa* konídiumai a bibecsatornán keresztül a pollen csírázásához hasonlóan fejlődnek és az elsődleges virágpusztulás kialakulása után a termőrészek pusztulását okozzák. A hipotézis alapján Tzoneva és Tzonev (1999) arra keresték kísérleteikben a választ, hogy a megporzott bibéken keresztül bekövetkezik-e a virágfertőzés. A kérdésfelvetés alapját a kajszinemesítők körében ismert jelenség a keresztezett ágak ellenállósága adta. Megfigyeléseik szerint a kasztrált és megporzott ágakon nem volt megfigyelhető a fertőzés, de ennek a kontrollját nem végezték el, ami a kasztrált és megporzatlan kezelés lett volna. Helyette a megporzott, de nem kasztrált ágakon tapasztalható 12 % virágfertőzést azzal magyarázták, hogy a megporzás után a bibe

a gomba konídium fejlődését gátló anyagot szintetizált (szabadelvirágzású kontroll ágakon 60 % -os fertőzést mértek). A papírzacskóval és vászonzsákkal izolált, öntermékenyített ágakon ezzel szemben 75 és 95 %-os fertőzést tapasztaltak, ami nem magyarázza a feltételezést, miszerint a fertőzés kizárólag a nem megporzott bibéken keresztül történhet meg, habár a fajtákról nem közölték öntermékenyek-e. Az két fogékony fajtán beállított kísérlet alapján tisztáztuk a megporzás hatását a fertőzésre. A kasztrált és megporzott ágak esetében a virágok 7 %-a fertőződött meg, míg a kasztrált és megporzatlan ágak esetében a virágok 10,5 %-a pusztult el 'Kecs-psár' fajtán. A 'Goldrich' fajtán végzet kísérletben a kasztrált és megtermékenyített 111 virág esetén egyetlen alkalommal, míg a 118 kasztrált és megporzatlan virág esetében egyetlen alkalommal sem történt meg a fertőzés. A 'Kecs-psár' fajtán tapasztalt fertőzés a kasztrálás ellenére is kialakult, ami a fajtán megfigyelt spontán fertőzéssel (virágzást megelőzve fertőződtek a virágrügyek) magyarázható. A 'Goldrich' fajta esetében a fertőzés elmaradását nem a bibék megporzása, hanem az infekciós pontnak tekinthető fogékony virágrészek mechanikai eltávolítása okozta. A megporzás nem volt hatással a virágfertőzés kialakulásának gyakoriságára.

A bibe környékének antifungális hatását tapasztaltuk a gomba fejlődésekor. A táptalajra helyezett bibéből a korábban Halász (2007) által is bemutatott módon, extracelluláris ribonukleázok választódtak ki a táptalajba, amit a *Torula* élesztő RNS-ének festésével mutattunk ki. A táptalaj felületén növe gombamicélium fejlődését gátló zóna mérete, hasonlóan az RNS festéses kimutatással, a bibe körül alakult ki.

A bibéből kiáztatott intercelluláris folyadék a konídiumok csírázását gátolta, illetve a kicsírázott micélium fejlődését teljesen leállította. A dohányból származó 'S-like' ribonukleázok két kórokozó gombának csírafejlődését hasonlóképp gátolták Hugot és mts. (2002) kísérleteiben, ezért feltételezhetjük, hogy a bibében kifejeződő S- ribonukleázok az idegentermékenyítés biztosításán túl a bibe kórokozók elleni védelmében játszik szerepet.

#### **6.4 Mesterséges termőrészfertőzés eredményei**

A kajszfajták és mandulafajták *M. laxa* ellenállóságának vizsgálatára Crossa-Raynaud (1969) közölt egy mesterséges ágfertőzési technikát. A vizsgálataik során a levágott kétéves ágakon sebzéseket ejtettek, amiket *M. laxa* által átszőtt agarkorongokkal fertőztek meg. Eredményeik szerint az ültetvényben tapasztalt fajták fogékonyasága és a mesterséges ágfertőzés során tapasztalt hánccsszövet pusztulás hossza között egyértelmű összefüggés állt fenn. A technikát több kajszinemesítési program során alkalmazták

(Gulcan és mts., 1999, Nicotra és mts., 2006) mint a fenotipizálás felgyorsításának lehetőségét. Ezzel szemben Szügyi és mts. (2012) meggyen végzett kísérletei alapján leírják, hogy a mesterséges vesszőfertőzés során az immunisnak tartott ‘Csengődi’ és az egyik legfogékonyabb meggyfajta az ‘Érdi bőtermő’ esetében azonos hosszúságú termőrész pusztulást tapasztaltak.

Az ültetvényi fertőzések alapján ellenállónak azonosított ‘Zard’ és fogékonynak tartott ‘Kecs-psár’ fajtákon alkalmaztuk a fent említett fertőzési eljárást. A hancsszövet pusztulása mindkét fajta esetében azonos mértékű volt és a fertőzést követő 30. napra a levágott ágak hancsszövetének teljes hosszára kiterjedt a nekrozis. Ezzel megegyező eredményekről számol be Gulcan és mts. (1999) kajszi mesterséges vesszőfertőzésekor. A nyári fertőzést ezek alapján túlságosan provokatívnak találtuk, ezért a vesszőfertőzést ősszel alkalmaztuk az ültetvényben a ‘Zard’ és ‘Korai zamatos’ fajtákon és ezek 48 hibridből álló utódpopulációján. A vesszőfertőzést választottuk az ágfertőzéssel szemben, mert a természetes *M. laxa* fertőzés is ezeken a növényi részeken jelentkezik.

A fertőzés értékelésekor meglepő eredményt kaptunk. A ‘Zard’ fajta esetében a fertőzött szövetek hosszúságának átlaga nagyobb volt, mint a fogékony ‘Korai zamatos’ fajtán mért pusztulás, habár ez az eltérés a nagy szórás miatt nem volt szignifikáns. Ez a megfigyelés teljes mértékben ellentmond Crossa-Raynaud (1969) ágfertőzése során leírt pusztult szövetrészek hosszának felmérésével.

A fertőzött hancsszövet hossza ez alapján nem alkalmas az egyedek ellenállóképességének meghatározásához viszont a fertőzött és ép szövetek határán az ellenálló ‘Zard’ és fogékony ‘Korai zamatos’ fajták esetében eltérést tapasztaltunk. Az ellenálló fajta – ‘Zard’ - esetében a vessző hancsszövet pusztulása éles szegéllyel határolódott el a barna nekrotizált szövetektől. Az ép szövet megvastagodása volt megfigyelhető, míg a fogékony fajta esetében egy elmosódó határ volt az ép és fertőzött szövetek között. E megfigyelés szerint értékeltük a 48 hibridet. Harmincegy egyed mutatta a fogékony és 17 az ellenálló fajtára jellemző reakciót. Az *M. laxa* elleni rezisztencia öröklődésével kapcsolatban korábban egyöntetűen, mint domináns jellegről számolt be Crossa-Raynaud (1969), Gulcan és mts. (1999) és Nicotra és mts. (2006), mert a hibridek túlnyomó része a rezisztencia forrásként alkalmazott szülőhöz hasonlóan ellenálló volt. Természetesen a hibrid család alacsony egyedszáma alapján csak feltételezhetjük az ellenállóság öröklődésének menetét, de feltételezve, hogy a Zard heterozigóta formában hordozza a domináns allélként működő

rezisztenciát, a fogékony és ellenálló utódok aránya 3:1 mendeli monogénis domináns öröklődéshez közelít.

Az ellenálló és a fogékony hibridek vesszőfertőzés hosszának összehasonlítása alapján, az ellenálló egyedek vesszőin látható fertőzési terület egyértelműen rövidebb volt a fogékony utódokhoz képest, habár az egyedeken belüli pusztult háncsszövet hossza nagy eltéréseket mutatott. A vesszőátmérő és az elpusztult szövethossz között nem találtunk korrelációt.

A kajszi esetében több nemesítő és kutató (Crossa-Raynaud 1969, Gulcan és mts., 1999 és Nicotra és mts., 2006) által alkalmazott mesterséges monilia fertőzés eredményei alapján megállapítható, hogy a fertőzési technika során alkalmazott micéliummal átszőtt táptalaj korongok a kórokozónak olyan tápanyagforrást biztosítanak, amely annyira növeli a fertőzés intenzitását, hogy ennek következtében az ellenálló fajták és hibridek esetében fogékony genotípusokkal azonos hosszban alakulnak ki a fertőzés tünetei.

## **6.5 Az ‘Orange red’ és ‘Zard’ fajta mesterséges levélfertőzésének eredményei**

A *M. laxa* kórokozó levélfertőzését figyeltük meg az ültetvényben. Az elpusztult hajtásokon kialakult exogén sztrómákról lefűződő konídiumok a közelükben található fiatal leveleken barna léziókat okoztak, amik később az egész levéllemezre kiterjedtek. A jelenséget már Byrde és Willetts (1977) is megfigyelte, habár mint kártétel nem tarják számottevő jelentőségűnek. Ezek a tünetek nem voltak tapasztalhatók a ‘Zard’ fajta levelein, amire két magyarázat is adható. A ‘Zard’ fajtán a virág és hajtásfertőzés is ritkán fordult elő, így a fertőzési inokulum hiánya miatt nem történt meg a levelek pusztulása. A másik lehetőség, hogy a levél mint zöld növényi rész aktív ellenálló képességgel gátolja meg a konídiumok fertőzését. A kérdés eldöntésére mesterségesen fertőztük meg a levélkéket. A hajtásokról leválasztott levelek fertőzésekor az ‘Orange red’ fajta esetében két nappal a fertőzést követően a levélfelület 30 %-a teljesen nekrotizálódott, míg ekkor a ‘Zard’ esetében még nem volt megfigyelhető a pusztulás. A fertőzést követő 72 órában az összes ‘Orange red’ levél teljesen kolonizálódott, a ‘Zard’ fajta levélkéin is megjelentek a tünetek a fertőzési pont körül. A kísérlet alapján az ellenállóság másik megnyilvánulási formáját mutattuk be, ami a későbbiekben a bizonytalan vessző és ágfertőzésnek felváltására kínál lehetőséget. A levélfertőzés a kajszinemesítés számára a teljes vegetációs időben végezhető gyors teszt lehet, amihez a pontos standardok és paraméterek kidolgozása szükséges.

## 6.6 Az NBS-típusú RGA-k és a monília-ellenállóság kapcsoltsága

Szőlő és alma esetében a funkcionális RGA markerek alkalmazásakor sikerült több növényi rezisztenciával kapcsoltságot kimutatni. A szőlő esetében Di Gaspero és Cipriani (2002) peronoszpóra ellenállósággal, Donald és mts. (2002) lisztharmat rezisztenciával kapcsolatot mutató NBS típusú RGA szekvenciákat azonosított. Az alma ventúria-ellenállósággal kapcsolt RGA szekvenciák meghatározásáról számoltak be Calenge és mts. (2005).

A RGA szekvenciák változékonyságát általában szekvenálás alapján, illetve az RGA szekvenciák környékén található restrikciós hasítóhelyek változékonysága alapján mutatták ki (Calenge és mts., 2005). Munkánk során a kajszfajták NBS RGA szekvenciák polimorfizmusának vizsgálatára az SSCP technikát választottuk. Vizsgálataink során az NBS gének minél szélesebb körének kimutatása érdekében új PCR stratégiát dolgoztunk ki.

Kajszi esetében az NBS-LRR típusú RGA-k izolálásával foglalkozó publikációk csak a TIR-NBS-LRR típusú csoportba tartozó szekvenciákról számoltak be (Soriano és mts., 2005; Baldi és mts., 2004; Lalli és mts., 2005), és arra a következtetésre jutottak, hogy kajszi esetében a két csoport tagjai egyenlőtlen arányban találhatók meg vagy az alkalmazott technika TIR-NBS szekvenciákra volt specifikus.

Ezért elsőként olyan primereket kellett terveznünk, amelyek mind a kétféle NBS szekvenciát amplifikálják a PCR során, ezzel biztosítva az NBS szekvenciák legszélesebb körben történő vizsgálatát. Elsőként izoláltunk a CC típusba tartozó RGA-kat kajsziából. A Soriano és mts. (2005) által alkalmazott technika eredménytelensége nagy valószínűséggel annak tudható be, hogy az általuk alkalmazott degenerált primereket Gentzbittel és mts. 1998-ban mindössze az akkor ismert három *Arabidopsis* szekvencia alapján tervezték. Ezzel szemben az általunk 26 szekvencia alapján tervezett degenerált primerek nagyobb polimorfizmust engednek meg az NBS domén konzervált P-loop és hidrofób régióin. A TIR és CC-NBS-LRR szekvenciák elkülöníthetők az NBS domén bizonyos aminosav-motívumai alapján (Penuela és mts., 2002). Ezt az általunk készített aminosav-illesztés is alátámasztotta. Ilyen specifikus motívum a Kináz II régió N-terminális oldala felé található triptofán, melynek segítségével a CC-NBS-LRR típusú szekvenciákhoz szelektíven kötődő primert (Kin2 F) terveztünk. A szekvenciák ismerete alapján igazolható, hogy a szelektív



Kin2 F és HD R primerekkel végzett semi-nested PCR valóban csak a CC-NBS-LRR típusú szekvenciák felszaporítását eredményezte.

A saját tervezésű primerek lehetőséget biztosítottak mindkét NBS LRR géncsoport vizsgálatára az SSCP analízis során. Az SSCP analízis során háromszoros mennyiségű fragmentumot tudtunk vizsgálni a Soriano és mts. (2005) által alkalmazott primerkombinációval felszaporított fragmentumok számához képest.

A monília ellenálló 'Zard' kajszifajta esetében nem sikerült a PCR termékek SSCP vizsgálatával csak erre a fajtára specifikusan megjelenő fragmentum azonosítanunk, ami természetesen nem zárja ki az ellenállóság kialakításában az NBS-LLR típusú rezisztenciagének szerepét.

## **6.7 Az újonnan azonosított RGA-k molekuláris vizsgálata**

Az adatbázissal való illesztés alapján minden kétséget kizárólag megállapíthatjuk, hogy sikeresen izoláltunk új CC- és TIR- NBS típusú RGA-kat a kajszi 'Goldrich' fajtájából. A 293 *Rosaceae* fajból származó szekvencia (Samuelian és mts., 2008) és 21 annotált rezisztenciagén alapján készített törzsfán a szekvenciáink négy csoportba rendeződtek el. A két főcsoportra osztott fán megfigyelhető volt, hogy a CC-NBS szekvenciákat tartalmazó ágon a 70 %-os bootstrap értékkel létrehozott csoportokban nagyobb arányban találhattuk meg az eltérő nemzetségekből származó szekvenciákat, az elágazásai jelentősen a törzsfá alapi része felé tolódtak el a TIR csoporthoz képest. A TIR csoport szekvenciái a törzsfán nagyobb arányban jelentek meg nemzetségspecifikus csoportokban, és a csoportok elágazódásai terminális elhelyezkedésűek voltak a CC csoporthoz képest. A genomsekvenciák alapján kigyűjtött NBS szekvenciák filogenetikai vizsgálatakor Yang és mts. (2008) hasonló eredményekről számol be a nyár, szőlő, rizs és lúdfű esetében. Ez alapján megállapítható a CC-NBS szekvenciák a vizsgált fajok szétválása előtt már kialakultak, míg a TIR-NBS szekvenciákra fajspecifikus elrendeződésük a fajok kialakulása utáni szekvenciasokszorozódás adhat magyarázatot.

A szekvenciák filogenetikai analízise alapján feltételezhetjük, hogy ezek között a szekvenciák között nem csak hasonlóság áll fenn, hanem evolúciós eredetük is közös. Ezért ezeket a szekvenciákat helyesebb rezisztenciagén-homológoknak nevezni, mivel az analógia evolúciós eredettől független hasonlóságot jelent (Patthy, 2007).

## 6.8 A moniliára fogékony ‘Orange red’ és az ellenálló ‘Zard’ fajták között fertőzés hatására kialakuló génexpressziós eltérések

A két fajta esetében négy primerkombináció alkalmazásával összesen 29, a fertőzésre megjelent fragmentumot azonosítottunk a gélelektroforézis során, amiből 18-nak meghatároztuk a szekvenciáját. Az őszibarack *M. laxa* gyümölcsfertőzésére kialakuló transzkriptomikai változásokat cDNS- AFLP technikával követte nyomon Zubini (2008) doktori munkájában. Primerkombinációnként 50-70 fragmentumokat azonosított mindegyik vizsgált őszibarack mintában. A fertőzés hatására a fragmentumok megjelenése a gélen 20-35 %-ban változott meg. Az általunk alkalmazott négy primerkombináció segítségével nyert fragmentumoknak a becsült száma, mintánként 50-200 darab között változott a primerkombináció függvényében. A fertőzött vesszőkből származó mintákban 10 %-ban kaptunk új fragmentumokat.

Egy szekvencia esetében a külső fertőzést bizonyító *Pseudomonas* szaprofág baktérium szekvenciájával találtunk hasonlóságot, annak ellenére, hogy a vesszők fertőzés melletti ép részéből izoláltuk az RNS-t. Zubini (2008) munkájában a 339 TDF szekvencia a fele mutatott növényi génekkel azonosságot, 40 %-a *Pseudomonas* fajokból származott és 10 %-a gomba eredetű volt. Erre magyarázat lehet, hogy a gyümölcsfertőzés során nem különül el élesen a fertőzés határa, így az ép és a fertőzött gyümölcsminták közötti mRNS-ek eltérésének felét nem a növényi választ biztosító gének, hanem gomba és baktérium gének adták.

A 18 szekvencia közül csak 11-et találtunk meg az őszibarack genomban, amire magyarázatot adhat a túl rövid (100 bp körüli) fragmentumok direktszekvenálása.

Az egyik azonosított fragmentum, amely 15. TDF a ‘Zard’ fertőzött I. mintákból származott, homológiát mutat a növényvilágban széles körben megtalálható poligalakturonáz gátló fehérje (PGIP) szekvenciájával. A gyümölcsfertőzés vizsgálatából származó eredmények alapján Fielding (1981) beszámol egy poligalakturonáz gátló fehérjéről, ami fertőzés hatására jelenik meg a gyümölcsökben (alma, szilva és őszibarack), és képes a *Monilinia* fajok poligalakturonáz-aktivitását nagymértékben gátolni.

A PGIP enzim specifikusan képes eltérő növénypatogén gombafajok poligalakturonáz gátlására, amit elsőként Albersheim és Anderson, (1971) kísérleteiben bizonyított. A *Venturia*-fogékony és ellenálló körték PGIP fehérjéi összehasonlításakor Faize és mts.

(2003) megfigyelték, hogy az ellenálló fajtából izolált PGIP enzim 2-3 szoros gátlást okoz a *Venturia* PG-zal szemben.

A PGIP gén expressziójáról megállapítottuk, hogy sem az ellenálló sem a fogékony fajta fertőzeten mintáiban nem volt jelen. A fertőzés hatására az ellenálló és fogékony kajszi fajták vesszőjében több PGIP allél jelent meg. *Arabidopsis* esetében Ferrari és mts. (2003), almánál Yao és mts. (1999), bab esetében Oliveira és mts. (2010) számolnak be, hogy gombafertőzés hatására többszörösre növekedett a PGIP gének kifejeződése a megtámadott szöveti részben.

A két fajtában ('Zard' és 'Orange red') a PGIP allélok száma öt és hat volt. a várt négygel szemben, ezért azt feltételezzük, hogy a nukleotid eltérésének egy része a reverz transzkripció és PCR reakció során hibásan alakult ki. A várt négy allélt az őszibarack és alma genomon meghatározott PGIP gén két – két paralóg kópiája alapján feltételezzük, de a hat allélt még esetlegesen megmagyarázhatja, ha a PGIP gén a kajszi genomon három kópiában lenne jelen. A cDNS AFLP során meghatározott 15. TDF szekvenciát nem sikerült megtalálnunk a megszekvenált klónok között. Ezért további primerek tervezés és kísérletek szükségesek a 15. TDF szekvenciájának meghatározásához.

Leckie és mts. (1999) szerint egyetlen aminosav csere a bab PGIP génjében új kórokozó elleni gátlás kialakulásáért volt felelős, így további kísérleteink során elsőként genomi DNS-ből kívánjuk meghatározni a fajták valós PGIP szekvenciáját, így elkerülve a reverz transzkripció során kialakuló mutációkat. A cDNS AFLP során meghatározott PGIP allél (15.TDF) öröklődését és kapcsoltságát az ellenálló fenotípushoz a 'Korai zamatos' x 'Zard' fenotipizált egyedein kívánjuk bizonyítani.

## 7 Új tudományos eredmények

1. A moniliás termőrész pusztulás bonitálása alapján harmincegy kajszifajta közül a 'Zard' fajta nagyfokú, a termőrészek hánccsszövetében kialakuló válaszreakción alapuló monilia rezisztenciát mutatott.
2. Bebizonyítottuk, hogy a korábbi nézetekkel ellentétben a kajszi esetében a fertőzés nem a bibén keresztül történik. A virágfertőzés kialakulására nincs hatással a bibe megporzása.
3. Kimutattuk, hogy a bibe szövetében képződő ribonukleáz aktivitású extracelluláris váladék a *M. laxa* konídiumok csírázását és micéliumának növekedését gátolja.
4. Megállapítottuk, hogy a 'Zard' és 'Korai zamatos' fajták keresztezéséből származó hibridek között a mesterséges vesszőfertőzés hatására a 'Zard' fajtára jellemző szöveti válaszreakciók jelentek meg, ami a rezisztencia örökölhetőségére utal.
5. Kialakítottunk egy szelekciós rendszert, amely a bizonytalan vesszőfertőzés helyett a szíromlevelek és levelek mesterséges fertőzése révén lehetőséget ad a fajták gyors fenotipizálására.
6. A kajszi esetében elsőként izoláltunk CC-NBS-LRR RGA szekvenciákat. A NBS RGA szekvenciák és a monilia ellenállóság között nem sikerült összefüggést találnunk.
7. A hánccsszövet-transzkriptomban azonosítottunk egy, a PGIP génhez nagy hasonlóságot mutató szekvenciát, mely a moniliafertőzés hatására, és specifikusan az ellenálló fajtában jelent meg.

## 8 Összefoglalás

A doktori dolgozatom a kajszi virágzáskori moniliás betegségével szembeni ellenállóság vizsgálatainak eredményeit foglalja össze. A 31 kajszifajta fogékonyságát határoztuk meg természetes fertőzés bonitálásával három egymást követő év során. Megbízható rendszert dolgoztunk ki a fajták összehasonlítására, a genotípusok ellenállóságát az elpusztított termőrészek arányával jellemeztük. Két *P. salicina* fajtáról, *P. cerasifera* és *P. dasycarpa* fajok egyedei esetében teljes ellenállóságot állapítottunk meg. A kajszi fajták közül a ‘Zard’ fajta ellenállósága kimagasló volt. A magyarkajszi fajtakör esetében megfigyelt ellenállóság a fajták alacsony virágszámával és a hosszú termőrészek teljes hiányával magyarázható, ami az extenzív ültetvényi körülmények hatására alakult ki.

Két fajta esetében összehasonlítottuk a megporzott és megporzatlan bibék ellenálló képességét a kórokozó támadásával szemben, és megállapítottuk, hogy a bibe teljes immunitását nem befolyásolja a megporzás. A kajszi bibéből származó szekrétaum *in vitro* körülmények között megakadályozta a micélium növekedését. Feltételezhető, hogy a gátlóhatás a ribonukleáz enzimek jelenlétével magyarázható.

Megállapítottuk, hogy a virág fertőzése során a szirmok és porzósálak szolgálnak infekciós pontként. A szirm szöveti felépítése magyarázatot ad a nagy intercelluláris járataival és az epidermisz sejtek vékony sejtfalával a kórokozó gyors terjedésére. A gomba micélium a vacoköblön keresztül a vesszők hánccsszövetébe jut.

A szirmok mesterséges fertőzése alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált 12 fajta esetében az eltérő fogékonyságot nem a szirm ellenállósága biztosítja, habár a fajták között tapasztaltunk eltérést, a fertőzést követő 45 órára mindegyik kajszifajta szirma teljes egészében elpusztult.

A ‘Zard’ és ‘Korai zamatos’ fajták és ezek 43 hibridjének mesterséges vesszőfertőzése alapján megállapítottuk, hogy a vesszőfertőzés hossza nincs összefüggésben az egyedek ellenállóságával. Az ellenálló ‘Zard’ fajtán élesen elhatárolódott az ép és fertőzött szövetrész. Az élő hánccsszövet a fertőzést megvastagodva vette körül. Az utódok között 13 esetben tapasztaltunk, ehhez hasonló ellenálló szöveti választ.

Kifejlesztetünk egy NBS-LRR rezisztenciagén analógok mindkét csoportját kimutató PCR eljárást, amivel kajszi esetében elsőként mutattunk ki CC-NBS-LRR szekvenciákat. A korábban alkalmazott és az általunk tervezett primerek felhasználásával hét

fogékony és egy ellenálló fajta RGA szekvenciáinak összehasonlító vizsgálatát SSCP technika alkalmazásával végeztük el. Az ellenálló fajta esetében nem sikerült egyedi fragmentumot meghatároznunk.

A 'Zard' fajta természetes virágfertőzését követően a virágkocsány körül a hancsszövet néhány milliméteres pusztulása után a fertőzés leállt, a hancsszövet a fertőzött szövet körül megvastagodott. Ez alapján az 'Orange red' és 'Zard' fajták eltérő hancsszövet válaszreakcióját vizsgáltuk meg cDNS-AFLP technika alkalmazásával. A 'Zard' fajta fertőzött mintáiból sikerült kimutatnunk egy nekrotróf gombakórokozó fejlődését gátló növényi poligalakturonáz gátló fehérje szekvenciájával nagy hasonlóságot mutató cDNS szakaszt. A szekvencia a *Prunus americana*, *Prunus mahaleb* és *Prunus salicina* fajok PGIP szekvenciáival 95 %-os azonosságot mutatott. A fertőzés hatására a fogékony fajtában is kimutatható volt a PGIP gének expressziója, ez alapján feltételezzük, hogy a PGIP allélok közötti eltérés biztosítja a 'Zard' fajtára jellemző ellenálló képességet.

Munkánk során sikerült a kajszi moniliás betegségével szemben ellenálló kajszi-fajtát meghatároznunk. Ez a fajta biztosíthatja a monilia ellenállóságot a kajszi nemesítés számára. A 'Zard' fajta korona habitusa, hosszan tartó mélynyugalmi állapota, a monilia ellenállósága alapján a vizsgált kajszi fajtáktól jelentősen eltér, ezért ez alapján feltételezzük a fajta interspecifikus eredetét.

## 9 Summary

The resistance of apricot against blossom blight caused by *Monilinia laxa* was studied in this thesis. The research is summarized as follows:

Sensitivity of 31 apricot cultivars was determined based on evaluation of natural infection performed in 3 consecutive years. A reliable system was established for comparison of the cultivars. The resistance of genotypes was characterized by the ratio of intact and destroyed fruit sets. Absolute *M. laxa* immunity was found in two cultivars of *P. salicina* and some specimens of *P. cerasifera* and *P. dasycarpa* species. Among apricot cultivars a similar immunity was demonstrated only by 'Zard'. The resistance of the Magyarkajsi cultivar group was found to derived from the low number of flowers and the complete lack of long fruitshoots which is typical in extensive orchards.

We clarified that in the apricot breeding the resistance of the crossed branches doesn't derive from pollination process. We compared the resistance of pollinated and non-pollinated pistils were compared and no difference was found. The secretum from the apricot pistil inhibited the *M. laxa* hyphal elongation *in vitro*. Presumably the inhibition effect can be explained by the presence of ribonuclease enzymes.

In the blossom infection process the fungi penetrate through petals and stamens. The petal's histology with its huge intercellulars and thin cellwall of the epidermic cells explains the rapid spread of *M. laxa* myceliums. The patogen can easily enter the phloem through the receptacle.

Artificial infection of the petals of 12 apricot cultivars resulted in complete colonization of the tissues in 45 hours post infection. Some differences were detected in the speed of the colonization among the cultivars however it can not be the source of resistance since in 45 hours all the cultivars – including the resistant ones – have been destroyed.

Based on the artificial shoot infection of 'Zard', 'Korai zamatos' and their 43 hybrids no correspondence was found between the lenght of destroyed shoot and the resistance of the individuals. In case of 'Zard' the intact and infected tissues were strictly separated. The infection was isolated from the healthy tissues by a thickened phloem. This type of tissue response was detected on 13 progenies.

We have A PCR method was developed for the detection of both groups of NBS-LRR resistance gene analogs. With this method we were able to detect CC-NBS-LRR RGA in apricot genome. SSCP polymorphism of RGA sequences of 7 sensitive and one resistant apricot cultivars were compared. In the case of the resistant cultivar no unique fragment was found.

Following the natural infection of 'Zard' flowers a limited destruction was found in the tissue surrounding the peduncle however in a short time the infection was completely inhibited, the phloem around the infected tissues has been thickened. cDNA AFLP technique was used for following the different response of 'Orange red' and 'Zard' cultivar to *Monilinia* infection.

cDNA AFLP technique research resulted in a unique transcript derived fragment (TDF) which shows similarity with plant poligalacturonase inhibiting protein (PGIP). This TDF appeared only in the infected 'Zard' samples. The highest identity rate (more than 95%) of this TDF nucleotide sequence was found to the PGIP sequences of the *Prunus americana*, *Prunus mahaleb* and *Prunus salicina* species. As a result of infection the PGIP gene were expressed in both cultivars. It may be hypothesized that the differences in sensitivity are caused by the PGIP alleles.

As a result of our research we were able to identify an apricot cultivar – namely 'Zard' – resistant to *M. laxa* shoot infection. That cultivar may provide the source of *M. laxa* resistance in apricot breeding. Special traits of 'Zard' like habit of crown, outstanding winter hardiness, long peduncle and monilia resistance suggest the interspecific origin of the cultivar.



## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani konzulensemnek Dr. Pedryc Andrzej egyetemi tanárnak a munkám során nyújtott támogatásáért, ami nélkül nem készülhetett volna el dolgozatom.

A munka során nyújtott segítségért hálával tartozom a Genetika és Növénynevelés Tanszék mindenkori kollégáinak. Köszönöm Dr. Deák Tamás 'szobatársamnak' a bioinformatika alapjainak elsajátításában nyújtott segítségét. Köszönöm Bacsikainé Pap Annának, Tóth Veronikának, Millei Ágnesnek, Zaheri-A Sabourannak a labormunkákban nyújtott segítségét. Köszönöm Hermán Ritának azt a nagyon sok háttér munkát, ami nélkül nem tudtam volna munkámat végezni. Köszönöm Dr. Pfeiffer Péternek, Dr. Szikriszt Bernadettnek a laborban, Lendvay Bertalannak a statisztikai elemzéseknél nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Hegedűs Attilának a publikációk elkészítésénél nyújtott támogatását és a dolgozat javítását. Köszönöm Benyóné Dr. György Zsuzsának a dolgozat megírásában és javításában történő segítségét és a biztatását. Köszönöm Dr. Halász Júlia gödöllői vonatút alatt adott bátorítását a doktori munka elkezdéséhez.

Köszönöm Róth Fruzsina hallgatóm szorgalmas, odaadó munkáját, és Földi Tímeának az SSCP technika alkalmazásához nyújtott segítségét.

Feleségemnek köszönöm a végtelen türelmét és kitartását.

## 10 Mellékletek

### 1. Irodalomjegyzék

1. Abu-Goukh, A. A., Greve, L. C., Labavitch J. M. (1983): Purification and partial characterization of 'Bartlett' pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiol. Plant. Pathol.*, 23: 111–122.
2. Agrawal, K. M., Bahl, L. O. P. (1968): Glycosidases of *Phaseolus vulgaris* Isolation and general properties. *J. Biol. Chem.*, 243: 103-111.
3. Agrios, G. N. (1997): *Plant pathology*. Academic Press, Inc., California. 257.
4. Agüero, C., Uratsu, S., Greve C., Powell A., Labavitch, J., Meredith, C., Dandekar A. M. (2005): Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Mol. Plant Pathol.*, 6: 43–51.
5. Albersheim, P. (1965): The substructure and function of the cell wall. In: J. Bonner and J. E. Varner, eds., *Plant Biochemistry*. Academic Press, Inc., New York. 151-186.
6. Albersheim, P., Anderson, J. (1971): Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1815-1819.
7. Albersheim, P., Jones, T. M., English, P. D. (1969): Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 7: 171-194.
8. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410.
9. Andersen, J., Lübberstedt, T. (2003): Functional markers in plants. *Trends Plant Sci.*, 11: 557-514.
10. Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.
11. Arts M. G., Hekkert B., Holub E. B., Beynon J. L., Stiekema W. J., Pereira A. (1998): Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11: 251– 258.
12. Balan, V., Toma, S., Oprea, M. (1999): Reaction of apricot phenotypes from national collection to the *Monilinia laxa* (Aderh. et Ruhl.) Honey inoculum. *Acta Hort.*, (ISHS) 488: 667-670.
13. Baldi P., Patocchi A., Zini E., Toller C., Velasco R., Komjanc M. (2004): Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 231–239.
14. Bassam, B. J., Gresshoff, P. M. (2007): Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 2: 2649-2654.
15. Benedek, P., Nyéki, J., Vályi, I. (1990): Csonthéjas gyümölcsfajták érzékenysége a fontosabb kórokozókkal és kártevőkkel szemben - a fajtaspecifikus növényvédelmi technológia kidolgozása. *Növényvédelem*, 26: 12-31.

16. Bergmann, C. W., Ito, Y., Singer, D., Albersheim, P., Darvill, A. G. (1994): Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors and fungal infection. *Plant J.* 5: 625-634.
17. Byrde, R. J. W., Fielding, A. H., William, S. A. H. (1960): The role of oxidised polyphenols in the varietal resistance of apples to brown rot. In *Phenolics in Plants in Health and Disease*, 95-99. Edited by J. B. Pridham. Oxford: Pergamon Press.
18. Byrde, R. J. W., Fielding, A. H. (1968): Pectin methyl-trans-eliminase as the maceration factor of *Sclerotinia fructigena* and its significance in Brown Rot of apple. *J. Gen. Microbiol.*, 52: 287-298.
19. Byrde, R. J. W., Willetts, H. J. (1977): The brown rot fungi of fruit. Their biology and control. Pergamon Press, Oxford 171.
20. Carter, C., Thornburg, R. W. (2004): Is the nectar redox cycle a floral defence against microbial attack? *Trends Plant Sci.* 9: 320–324.
21. Calenge, F., Van der Linden, C. G., Van de Weg, W. E., Schouten, H. J., Van Arkel, G., Denancé, C., Durel, C. E. (2005): Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 110: 660-668.
22. Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L., Salvi, G., Bergami, M. (1987): Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, 85: 631–648.
23. Cervone, F., Hahn, M. G., De Lorenzo, G., Darvill, A., Albersheim, P. (1989): Host-pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenicity factor into an elicitor of plant defence responses. *Plant Physiol.*, 90: 542-548.
24. Collins, N. C., Webb, C. A., Seah, S., Ellis, J. G., Hulbert, S. H., Pryor A. (1998): The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 11: 968–978.
25. Creusot F., Macadre C., Ferrier-Cana E., Riou C., Geffroy V., Seignac M., Dron M., Langin T. (1999): Cloning and molecular characterization of three members of the NBS-LRR subfamily located in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris*. *Genome*, 42: 254-264.
26. Crossa-Raynaud, P. H. (1969): Evaluating resistance to *Monilia laxa* (Aderh. & Ruhl.) Honey of varieties and hybrids of apricot and almonds using mean growth rate of cankers on young branches as a criterion of susceptibility. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 94:282-284.
27. Dangl, J. L., Jones, J. D. G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infections. *Nature* 411: 826-833.
28. De Lorenzo, G., Ito, Y., D'Ovidio, R., Cervone, F., Albersheim, P., Darvill, A. G. (1990): Host-pathogen interactions XXXVII. Abilities of the polygalacturonase-inhibiting proteins from four cultivars of *Phaseolus vulgaris* to inhibit the endopolygalacturonases from three races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 36: 421-435.
29. Decroocq, V., Foulongne, M., Lambert, P., Gall, O., L., Mantin, C., Pascal, T., Schurdi-Levraud, V., Kervella, J. (2005): Analogues of virus resistance gene map to

- QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Mol. Genet. Genomics*, 272: 680-689.
30. Di Gaspero, G., Cipriani, G. (2002) Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor. Appl. Genet.*, 106: 163–172.
  31. Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K., A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., Cervone, F. (2003): The crystal structure of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100: 10124–10128.
  32. Donald, T. M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A. F., Bouquet, A., Thomas, M. R., Dry, I. B. (2002): Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 610–618.
  33. Dondini, L., Costa, F., Tataranni G., Tartarini, S., Sansavini, S. (2004): Cloning of apricot RGAs (Resistance Gene Analogs) and development of molecular markers associated with Sharka (PPV) resistance. *J. Hort. Sci. Biotechn.*, 79: 729-734.
  34. Evert R. F. (2006): *Esau's plant anatomy*. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 3rd edition. 76-82.
  35. Faize, M., Sugiyama, T., Faize, L., Ishii H. (2003): Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from Japanese pear: possible involvement in resistance against scab. *Physiol. Mol. Plant. Path.*, 63: 319–327.
  36. Federici, L., Di Matteo, A., Fernandez-Recio, J., Tsernoglou, D., Cervone, F. (2006): Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends. Plant. Sci.* 11: 65–70.
  37. Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, M., Cervone, F., De Lorenzo, G. (2003): Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *The Plant Cell*, 15: 93-106.
  38. Fielding, A., H. (1981): Natural inhibitors of fungal polygalacturonases in infected fruit tissues. *J. Gen. Microbiology*, 123: 377-381.
  39. Fisher, M. L., Anderson, A. J., Albersheim, P. (1973): A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*. *Plant Physiol.*, 51: 489-491.
  40. Flor, H. H. (1955): Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathol.*, 45: 680-685.
  41. Gardiner, S. E., Bus, V. G. N., Rusholme, R. L., Chagné, D., Rikkerink, E. H. A. (2007): Apple In: Kole C, eds. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, Volume 4 Fruits and Nut. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-53.
  42. Gentzbittel, L., Mouzeyar, S., Badaoui, S., Mestries, E., Vear, F., DeLabrouhe, D. T., Nicolas, P. (1998): Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 519–525.
  43. Ghuysen, J. M. (1968): Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32: 425-464.
  44. Glits M. (2000): Gyümölcsfák betegségei. In: Glits M., Folk Gy. *Kertészeti növénykórtan. 3. átdolgozott kiadás*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 210.

45. Goodstein, M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, M., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D. S. (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic. Acids Res.*, 40 :1178-1186.
46. Govers, F., Angenent, G. C. (2010): Fertility goddesses as trojan horses. *Science*, 330: 922-923.
47. Gulcan, R., Misirli, A., Demir, T. (1999): A research on resistance of 'Hacihaliloglu' apricot variety against *Monilinia* (*Sclerotinia laxa* Aderh et Ruhl) through cross pollination. *Acta Hort.*, (ISHS) 488: 675-677.
48. Halász, J. (2007): A Kajszi önmeddőségét meghatározó S-allél-rendszer molekuláris háttere. Doktori (PhD) Értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest.
49. Hayes, A., J., Saghai Maroof, M., A. (2000) : Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1279–1283.
50. Hilwig, M., S., Liu, X., Liu, G., Thornburg, R. W., MacIntosh G. C. (2010): Petunia nectar proteins have ribonuclease activity. *J. Exp. Bot.* 6 : 2951–2965.
51. Harada, Y., Nakao, S., Sasaki, M., Sasaki, Y., Ichihashi, Y., Sano, T. (2004): *Monilia mumeicola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.*, 70: 297–307.
52. Honey, E. E. (1936) North American species of *Monilinia*. Occurrence, grouping and life-histories. *Am. J. Bot.*, 23: 100-106.
52. Holb, I. J. (2003): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) I. Important features of their biology. (Review), *Int. J. Hort. Sci.*, 4: 23-36.
53. Hugot, K., Ponchet, M., Marais, A., Ricci, P., Galiana, E. (2002): A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15(3): 243-250.
54. International Rice Genome Sequencing Project (2005): The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.
55. Jakucs, E., Vajna, L. (2003): A gombák ökológiájának általános kérdései. In: Jakucs E., Vajna, L. (szerk.). *Mikológia*. Bp. Agroinform K. 239-244.
56. Jallion, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., és mts. (2007): The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449: 463-467.
57. Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006): The plant immune system. *Nature*, 444: 323-328.
58. Jones, T. M., Anderson A. J., Albersheim, P. (1971): Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, 2: 153-166.
59. Joobeur, T., King, J., Nolin, J., Thomas, E., Dean, R. (2004): The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J.*, 39: 283–297
60. Joubert, D., A, Kars, I, Wagemakers, L., Bergmann, C., Kemp, G., Vivier, M. A., van Kan, J. A. L. (2007): A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for in vitro interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 392-402.

61. Kajava, A. V. (1998): Structural Diversity of Leucine-rich Repeat Proteins. *J. Mol. Biol.* 277: 519-527.
62. Kanazin, V., Marek, L. F., Shoemaker, R. C. (1996): Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 11746–11750.
63. Karr, A., L., Albersheim, P. (1970): Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a "wall-modifying enzyme". *Plant Physiol.* 46: 69-80.
64. Kerekes, L. (1930): A köd. *Növényvédelem*, 4: 117-118
65. Kessler, A. S., Shimosato-Asano, H., Keinath, N. F., Wuest, S., Ingram, G., Panstruga, R., Grossniklaus, U. (2010): Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science* 330: 968-971.
66. Kobe, B., Deisenhofer, J. (1995): Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5: 409–16.
67. Komar-Tyomnaya, L., D., Richter, A., A. (2000): Wild species and distant hybrids of apricot are the sources of resistance to *Monilia laxa* and high content of biologically-active substances in fruits. *Acta Hort.*, (ISHS) 538: 147-150.
68. Kövics, Gy. (2000): *Növénybetegségek okozó gombák névtára*. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 81., 158.
69. Lalli, D. A., Decroocq, V., Blenda, A. V., Schurdi-Levraud, V., Garay, L., Le Gall, O., Damsteegt, V., Reighard, G. L., Abbott, A. G. (2005): Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in *Prunus*: a resistance map for *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1504–1513.
70. Leckie, F., Mattei, B., Capodicasa, C., Hemmings, A., Nuss, L., Aracri, B., De Lorenzo, G., Cervone F. (1999): The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed b-strand/b-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *EMBO*, 18:9 2352–2363.
71. Leister, D., Kurth, J., Laurie, D., A., Yano, M., Sasaki, T., Devos, K., Graner, A., Schulze-Lefert, P. (1998): Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 370–375.
72. Leister, D. (2004): Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trend. Genet.*, 20: 116-122.
73. McHale, L., Tan, X., Koehl, P., Michelmore, R. W. (2006): Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.*, 7: 212-222.
74. McNeill, J., Turland, J. N. (2011): Major changes to the code of nomenclature. Melbourne, July 2011. *Taxon* 60: 1495–1497.
75. Mehlenbacher, S., Cocu, V., Hough, L. F. (1990): Apricot (*Prunus*). *Acta Hort.* 290: 65-110.
76. Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., Young, N. D. (1999): Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.*, 20: 317–332.

77. Ngugi, H. K., Sherm, H. (2004): Pollen mimicry during infection of blueberry flowers by conidia of *Monilinia vaccinii-corymbos*. *Physiol. Mol. Plant. Path.* 3: 113–123.
78. Nicotra, A., Conte, L., Moser, L., Fantechi, P., Barbagiovani, I. (2006): Breeding programme for *Monilia laxa* (Aderh. & Ruhl.) Resistance on apricot. *Acta Hort.*, (ISHS) 701: 307-311.
79. Oliveira, M. B., Nascimento L. B., Junior, M. L., Petrofeza, S. (2010): Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene family during *Sclerotinia sclerotiorum* (*Sclerotiniaceae*) infection. *Genet. Mol. Res.*, 2: 994-1004.
80. Patthy L. (2007):. Protein evolution. 59-62. Oxford, UK: Blackwell.
81. Pedryc, A. (2003): A kajszi nemesítése. 53–84. In: Péntes B., Szalai L. Kajszi. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest.
82. Penuela, S., Danesh, D., Young, N. D. (2002): Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of nonTIR NBS-LRR genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 261-272.
83. Powell, A., Van Kan J., Have A. T., Visser J., Greve L. C., Bennett A. B., Labavitch J. M. (2000): Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 13: 942–50.
84. Qiang, X., Xiaopeng, W., Xiuxin, D. (2007): Phylogenetic and evolutionary analysis of NBS-encoding genes in *Rosaceae* fruit cops. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44: 315-324.
85. Reisch, B., J., Pratt, C. (1996): Grapes, In: Janick J, Moore JN (eds) *Fruit Breeding. Vol II. Vine and small fruit*. Wiley, New York USA, 297-369.
86. Rozsnyay, Zs. (2001): Megyajták monilia ellenállósága. *Kertészet és Szőlészet*, 51-52: 15.
87. Samuelian, S., K., Baldo, A. M., Pattison, J. A., Weber, C. A. (2008): Isolation and linkage mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and classification among Rosaceae NBS-LRR genes. *Tree Genet. Genomes*, 4: 881-896.
88. Schumacher, J., Randles, J. W. (1983): A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.*, 135: 288-295.
89. Schrauwen, J., Linskens, H. F. (1972): Ribonucleases in styles. *Planta* 102: 277-285.
90. Shen, K. A., Meyers, B. C., Nurul Islam-Faridi, M., Chin, D. B., Stelly, D. M., Micheltmore, R. W. (1998): Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11: 815–823.
91. Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. Vos Dissection, P. (1998): Dissection of the fusarium I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell*, 6: 1055–1068.
92. Soriano, J. M., Vilanova, S., Romero, C., Llácer, G., Badenes, M. L. (2005): Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 110: 980–989.

93. StatSoft, Inc., Tulsa OK (2007): STATISTICA (data analysis software system), Version 8., www.statsoft.com.
94. Stotz, H., Contos, J., Powell, A., Bennett, A., Labavitch, J. (1994): Structure of an inhibitor of fungal polygalacturonase from tomato. *Plant Mol. Biol.*, 25:4 607-617.
95. Stotz, H., Powell, A. L. T., Damon, S. E., Greve, L. C., Bennett, A. B., Labavitch J. (1993): Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv. Bartlett. *Plant Physiol.*, 102: 133–138.
97. Surányi, D. (2003): A kajszi jelentősége, termesztésének története és helyzete. In: Péntes B. és Szalay L (szerk.). *Kajszi*. Bp. Mezőgazda Kiadó 11-29.
98. Szügyi, S., Rozsnyai, Zs., Apostol, J. (2012). Betegségellenálló meggyhibridek jellemzése. *Agrofórum* 43: 28-31.
99. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.
100. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673–4680.
101. Toubart, P., Desiderio, A., Salvi, G., Cervone, F., Daroda, L., De Lorenzo, G. (1992): Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant J*, 2: 367–73.
102. Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., és mts. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*. *Science*, 313: 1596-1604.
103. Tzonev, R., Yamaguchi, M. (1999): Resistance in some *Prunus* species in Japan against blossom blight, caused by *Monilinia laxa* (Ehr.): *Prunus armeniaca* var. *ansu* Maxim., *Prunus armeniaca* L., *Prunus mume* Sieb. et Zucc. and interspecific hybrids among *Prunus* species. *Acta Hort.*, (ISHS) 488: 649-654.
104. Tzoneva, E. and Tzonev, R. (1999): Blossom blight caused by *Monilinia laxa* (Ehr.) - A conception on infection mechanism. *Acta Hort.* (ISHS) 488: 711-714.
105. Velasco, R. mts. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 10: 833-839
106. Velasco, R és mts. (2007): A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS ONE*, 12: e1326.
107. Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A. G., Llácer, G., Badenes, M. L. (2003): An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 239–247.
108. Walker-Simmons, M., Hadwiger, L., Ryan, C., A. (1983): Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 194-199



109. Wan, C. Y., Wilkins, T. A. (1994): A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.*, 223: 7-12.
110. Weaver, L. O. (1950): Effect of temperature and relative humidity on occurrence of blossom blight of stone fruits. *Phytopathol.*, 40: 1136-1153.
111. Wood, R. (1960): Pectic and cellulolytic enzymes in plant diseases. *A. Rev. Plant Physiol.* 11: 299-309.
112. Vuylsteke, M., Peleman, J. D., Michiel, J. T., Van Eijk, M. J. T. (2007): AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Prot.*, 6: 1401-1413.
113. 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.
114. 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.
115. Yao, C., Conway, W., Ren, R., Smith, D., Ross, G., Sams, C. E. (1999): Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol. Biol.*, 39: 1231-1241.
116. Zhou, T., Wang, Y., Chen, J. Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., Shen, J., Tian, D. (2004): Genome-wide identification of NBS genes in rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS genes. *Mol. Gen. Genomics*, 271: 402-415.
117. Zubini, P. (2008): Variaton in peach fruit susceptibility to *Monilinia laxa* and gene expression. Phd disertation, University of Bologna



## 2. Melléklet

A filogenetikai törzsfá 327 NBS domén következtetett aminosav szekvenciájának illesztése Neighbor-Joining eljárás alapján. A törzsfán szereplő szekvenciák: általunk meghatározott 13 kajszli RGA szekvencia, Samuelian és mts. (2008) által összegyűjtött 293 *Rosaceae* családból származó szekvencia, és 21 annotált R gén különböző növényfajokból. Az egy nemzetségből származó csoportokat külön számmal és a nemzetség nevével jelöltük. Az ágak végén nagyobb mint 70 % bootstrap értékkel rendelkező csoportokat, TIR illetve nonTIR (syn CC) és római számmal jelöltük. A ágak színei a következő nemzetségeket jelölik: barna- *Rubus*, piros – *Prunus*, szürke – *Fragaria*, narancs – *Pyrus*, zöld – *Malus*, rózsaszín – *Rosa*, fekete - nem *Rosaceae* fajok.