

Kutató: Dr. Galli Zsolt tudományos munkatárs

**Cím: ALMAFAJTÁK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE ÉS REZISZTENCIAGÉN
MARKEREK AZONOSÍTÁSA**

Bevezetés

A kutatás témája – amint az a pályázat címéből is kitűnik – két fő területre osztható. Elsőként a Magyarországon megtalálható kereskedelmi- és tájfajták molekuláris elkülönítését tűztük ki célul. Olyan „molekuláris ujjlenyomatot” terveztünk minden egyes fajtára kidolgozni, mellyel egyértelműen – gyorsan és viszonylag olcsón – elkülöníthetővé válik az összes többi fajtától. Ezzel nemcsak az egyes alma genotípusok – vegetációs periódustól független – elkülönítése és azonosítása válik egyszerűbbé és megbízhatóbbá, hanem az igen hosszadalmas nemesítési munkát is felgyorsíthatjuk. Lehetővé válik a hibridviszonyok egyszerű nyomonkövetése, ismeretlen esetekben akár a szülői partnerek azonosítása is. Az egyes genotípusok molekuláris elkülönítése nagymértékben megkönnyíti és gyorsítja a keresztezéses nemesítést, mivel az utódpopuláció már néhány leveles állapotban vizsgálható és szelektálható. A felnevelésből már ilyen korai állapotban kizárhatók azok az egyedek, amelyek esetleg idegen vagy önbeporzásból származnak, illetve nem hordozzák a kívánt rezisztencia gén(ek)e(t) stb. A tartós rezisztencia kialakítása, az egyes rezisztencia gének piramidálása, a fő géneken kívül kisebb hatású gének bevitele a legértékesebb genotípusokba megbízható molekuláris markerek nélkül nem megvalósítható. Ezenkívül a jövőben a fajták védelmében is egyre fontosabb szerep hárul ezekre a markerekre.

A kutatás másik felében olyan molekuláris markereket terveztünk azonosítani, melyek a különböző betegségek iránti ellenállóságot/toleranciát biztosító ún. rezisztencia génekkel szoros kapcsolatban állnak. A rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek segítségével ugyanis korai szelekció végezhető a keresztezési populációban a rezisztencia gén jelenlétére, mellyel a nemesítési idő jelentős mértékben csökkenthető. Ez különösen fontos, mivel a betegség fogékonyságra illetve toleranciára/rezisztenciára irányuló fenotípusos kiértékelés meglehetősen nehezen kivitelezhető. Ilyen rezisztenciagén analóg markerek azonosítása és térképezése nagy valószínűséggel felhasználható a markerre alapozott szelekción kívül a már korábban azonosított rezisztencia gének megtalálásához, szekvenálásához és klónozásához, valamint új, eddig ismeretlen rezisztencia gének és QTL-ek felfedezéséhez is. Ez utóbbi azonban – főleg idő hiánya miatt – csak távolabbi célkitűzéseink között szerepel.

A kutatás során elért eredmények

Almafajták molekuláris elkülönítése

A különböző almafajták „molekuláris ujjlenyomatának” előállítására a legmegfelelőbb genetikai elemeknek a mikroszatellitek tekinthetők, vagy más néven egyszerű tandem elrendeződésű szekvencia ismétlődések (Simple Sequence Repeats: SSR). Az ismétlődő elemek száma minden növényfaj genotípusai között – így almában is – nagymértékű variabilitást mutat (Goulão & Oliveira 2001, Hokanson *et al.* 2001, Liebhard *et al.* 2002, Laurens *et al.* 2004), multiallélikus, kodomináns marker. Összesen 106 almafajtának (66 kereskedelmi és 40 tájfajta) mikroszatellit mintázatát határoztuk meg egy bázispárnyi pontossággal hat lókuszon (CH03g07, CH04e03, CH04g10, CH05c02, CH05d11, CH05e03). Ehhez a tavasszal gyűjtött fiatal levelekből nagy tisztaságú DNS-t izoláltunk DNeasy® Plant Mini Kittel (Qiagen), majd ezeket templátként alkalmazva PCR reakciókat indítottunk Cy-5 fluoreszcens festékkel jelölt SSR primereket alkalmazva. A termékeket előzetesen 1,2%-os

agaróz gélen választottuk el, majd a szükséges mértékben hígítottuk őket (akár 30 szorosra!). Az amplifikált allélek pontos méretét ALFexpress-II DNS analizátor (Amersham BioSciences) készülékben határoztuk meg. Minden PCR reakciót és allélméret meghatározást (a DNS izolálástól kezdve!) legalább egyszer megismételtünk.

Mind a hat primer-párral sikerült megbízható és ismételhető mikroszatellit alléleket felszaporítanunk az összes fajta esetében; a kapott nagyfokú polimorfizmus alapján alkalmasnak bizonyultak a fajták megkülönböztetésére. Összesen 82 polimorf allélt detektáltunk (átlag 13,7 allél / lókus) és a markerek átlagos heterozigotitása is igen magasnak (0,8) bizonyult. Az ismételt PCR reakciók és futtatások allélméretei minden esetben megegyeztek.

Annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott tájfajta allélmintázata mind a 6 lókus esetében megegyezzen (PI: Probability of Identity) $2,53 \times 10^{-5}$ -nek adódott, ami 1 : 39.525 aránynak felel meg, ami a genotípusok számát figyelembe véve szinte lehetetlennek mondható. Ez az érték a kereskedelmi fajták esetében – annak ellenére, hogy ebben az esetben 40 %-kal több genotípus szerepelt – $1,79 \times 10^{-4}$ -nak adódott (1 : 5586). Ez is bizonyítja, hogy a mikrosatellit markerek milyen nagyszerűen felhasználhatók almafajták elkülönítéséhez, valamint azt is, hogy milyen hatalmas genetikai variabilitás van a tájfajtákon belül. Remélhetőleg a jövőben sikerül minél jobban kiaknáznunk a tájfajták kínálta genetikai sokféleséget az almafajtáinak előállításánál. Az almanemesítés legfontosabb célkitűzése ugyanis a fogyasztói igények kielégítése (főleg tetszetős és piacos fajták előállítása) mellett a gombabetegségeknek (lisztharmat, varasodás) és bakteriális betegségeknek (tűzelhalás) ellenálló/rezisztens fajták előállítása. Az ehhez szükséges genetikai háttér az alma vadfajtaiból és tájfajtaiból lehet megszerezni. A vadfajokkal történő keresztezés és szelekció azonban nagyon időigényes folyamat, mivel a kedvezőtlen jellegek eltávolítása miatt sokszori visszakeresztesésre van szükség. A tájfajták némelyikének kiváló a gyümölcsminősége és betegség ellenállósága. Alkalmazkodtak az adott tájegység sajátosságaihoz, talaj- és klimatikus viszonyaihoz. Nemesítési alapanyagként történő felhasználásuk a jövőben egyre inkább előtérbe kerülhet, ezért is tartottuk fontosnak ilyen nagyszámú tájfajta bevonását a vizsgálatainkba.

Az almafajták elkülönítésének további részletezésére nem térek ki, mivel ezekből az eredményekből már megjelentek a publikációk:

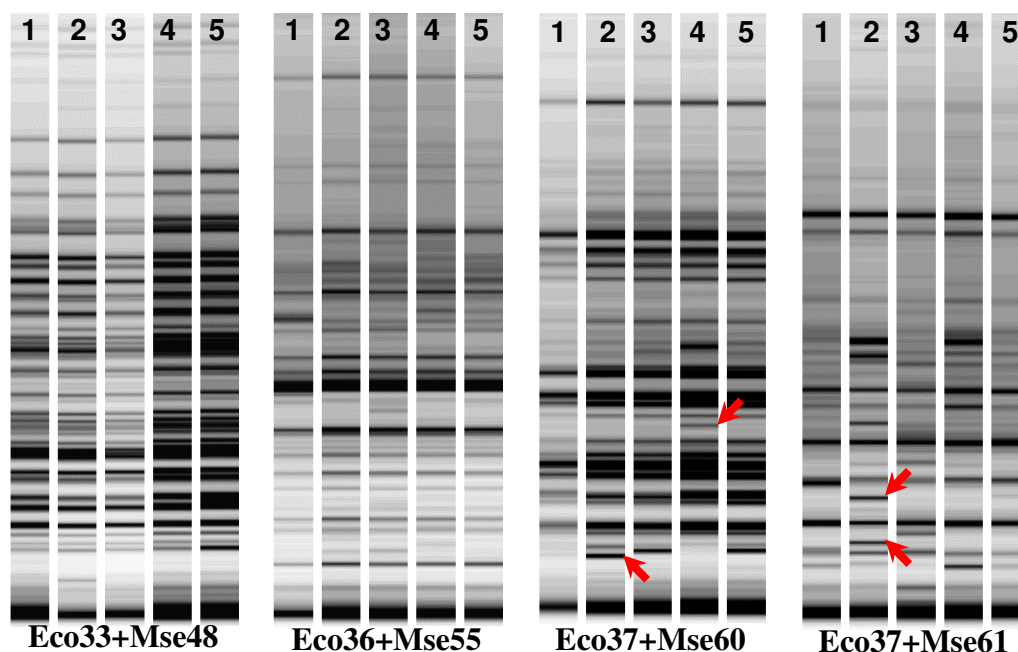
- **Wichmann B., Galli Z., Molnár S., Galbács Z., Kiss E., Szabó T., Heszky L.** (2007) Molecular identification of old Hungarian apple varieties. *Int. J. Hort. Sci.* 13 (3): 37-43.
- **Galli Z., Halász G., Kiss E., Dobránszki J., Heszky L.E.** (2005) Molecular Identification of Commercial Apple Cultivars with Microsatellite Markers. *HortScience* 40 (7):1974-1977.

A publikációkra alapozva létrehoztuk a Magyar Alma Mikrosatellit Adatbázist (MAMA), melyet a Szent István Egyetem honlapjáról a következő linken lehet elérni:

<http://www.mkk.szie.hu/dep/gent/genetika.htm> Itt bemutatásra kerül az összes vizsgált almafajta alléllösszetétele minden mikrosatellit markerrel, fajta szerinti és markerek szerinti keresési lehetőséggel, angol és magyar nyelven. A honlapon az OTKA támogatását is feltüntettük.

A különböző alma genotípusok tehát mikrosatellit markerekkel elkülöníthetőknél bizonyultak egymástól, azonban a fajta belüli rügymutások ezzel a technikával is megkülönböztethetetlenek maradtak. Így nem sikerült elkülöníteni az Elstar, Gala, Golden Delicious, Idared, Jonathan és Starking fajtákörökön belül az alapfajtákat és szomatikus mutánsait egymástól (Galli *et al.* 2005). A rügymutások közötti genetikai különbségek ugyanis annyira csekélyek, hogy az eddig kipróbált RAPD, AFLP, SSR stb. technikákkal nemcsak nekünk nem sikerült „rügymutáns-specifikus” markereket azonosítanunk, hanem a világon még senkinek sem. Mi is próbálkoztunk AFLP technika bevetésével, a rügymutások

között tudunk is polimorfizmust detektálni (példaként lásd 1. ábra). A polimorf AFLP fragmentumokból átkonvertált SCAR markerek azonban nem bizonyultak alkalmasnak a rügymutások elkülönítésére, a velük kimutatható különbségek egyediek és nem genotípus-specifikusak. Sajnos ezeket az eredményeket ezért nem is tudjuk lepublikálni.



1. ábra: Gala rügymutások AFLP mintázata négy szelektív primerkombinációt alkalmazva. A nyilak a feltételezett genotípus specifikus fragmentumokat jelölik, melyeket a gélből kivágtunk, szekvenáltuk őket és SCAR markereket terveztünk (nincs a szövegben részletezve). A SCAR markerek azonban egyed-specifikusnak bizonyultak. 1: Golden Delicious, 2:Goldenir (Lysgolden), 3: Golden Reinders, 4: Golden Spur, 5: Gibson Golden Delicious

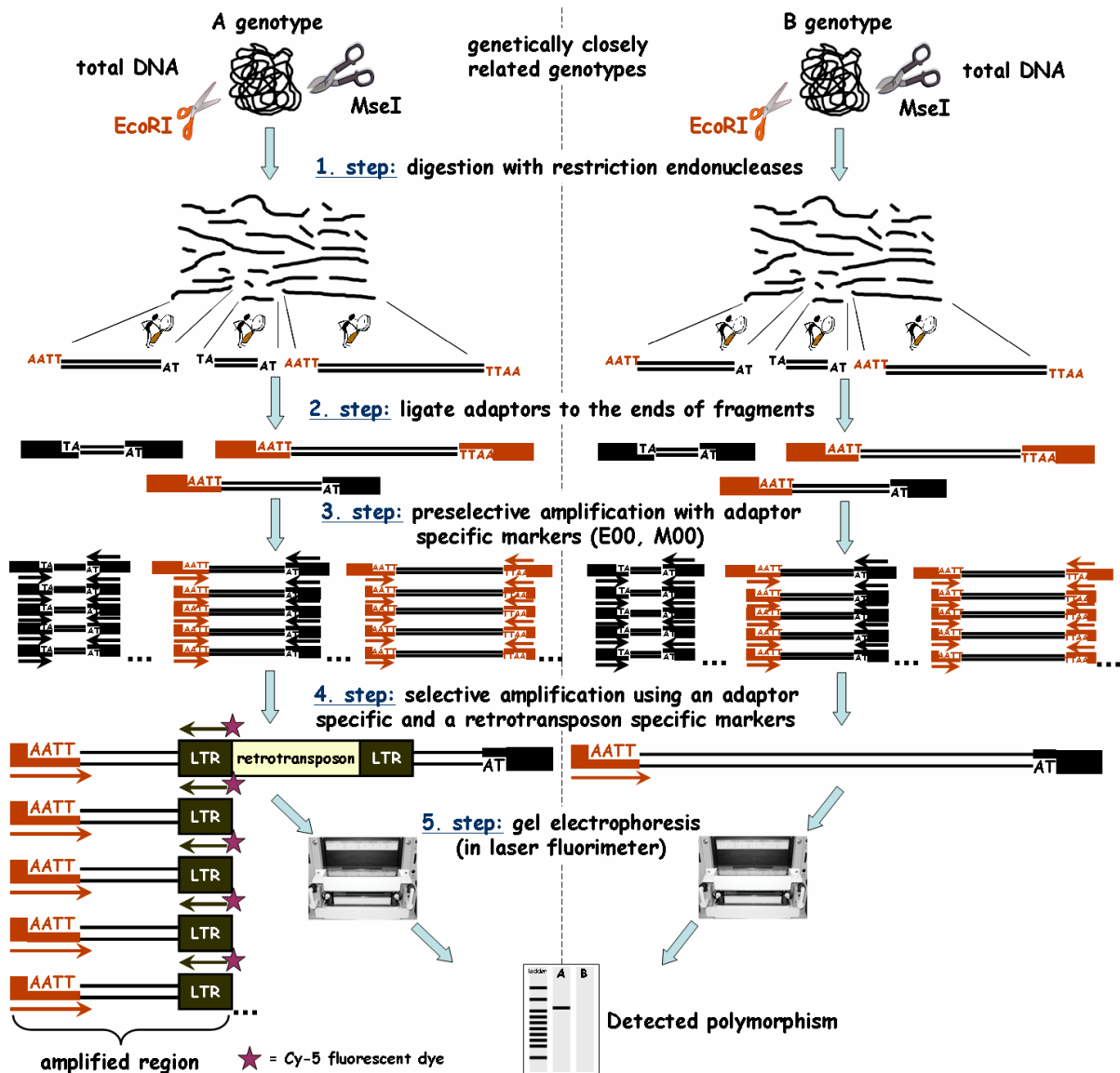
A probléma megoldásához ezért egy új módszert vetettünk be, az ún. S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) technikát, amellyel a retrotranszpozonokat határoló DNS szekvenciák közötti polimorfizmusok mutathatók ki. Az eddigi kutatások ugyanis bebizonyították (Sunako *et al.* 1999, Yao *et al.* 2001, Kobayashi *et al.* 2004), hogy a rügymutások genetikai változásait a legtöbb esetben olyan virális eredetű retrotranszpozonok okozzák, melyek képesek RNS transzkriptumukat DNS-sé konvertálni a reverz transzkriptáz enzim segítségével, majd azt a genomba integrálni, de (már) nem képesek az adott genomot elhagyni és más sejteket fertőzni. Az S-SAP módszer kifejlesztésével lehetővé vált, hogy a retrotranszpozonok genomon belüli áthelyeződéseiből származó polimorfizmusokat képesek legyünk detektálni, amelyek a legtöbb esetben maguknak a kedvező jellegekkel bíró rügymutásoknak a kialakulásához vezettek.

Ezt a technikát elsőként Waugh *et al.* dolgozták ki árpában 1997-ben, majd később bizonyítást nyert, hogy a növényfajok széles körén belül alkalmazható pl. *Aegilops* fajokban (Nagy *et al.* 2006), articsókában (Acquadro *et al.* 2006), cashew dióban (Syed *et al.* 2005), citromban (Breto *et al.* 2001), tökféléken belül (Lou & Chen, 2007), lucernában (Porceddu *et al.* 2002), és még almában is (Venturi *et al.* 2006). Egészen mostanáig Venturi *et al.* közleménye az egyetlen, amelyben almafajtákon belüli (Gala és Braeburn) néhány rügymutás molekuláris elkülönítéséről számolnak be.

A pályázat keretén belül mi is ezt a módszert próbáltuk ki elsőként a Jonathan alapfajta és 5 rügymutásának molekuláris elkülönítéséhez. Az ezen a területen elért eredményeink az International Journal of Horticultural Science c. folyóirat következő számában fognak megjelenni:

- Galli Z., Wichmann B., Molnár S., Galbács Zs., Kiss E., Szabó T., Heszky L. (2008) Test of the utility of apple retrotransposon insertion patterns for molecular identification of 'Jonathan' somatic mutants. *Int. J. Hort. Sci.* 14

Mivel azonban az eredmények még nem jelentek meg, a következőkben részletesen ismertetem őket. Külön kitérek a módszer bemutatására is, mivel az S-SAP technikát elsőként mi adaptáltuk ALFexpress-II lézer fluoriméterre.



2. ábra: A sequence-specific amplified polymorphism (S-SAP) technika általunk kidolgozott változatának szematikus ismertetése. Részletesen lásd a szövegben.

Először genomi DNS-t izoláltunk a Jonathan alapfajtából és öt rügymutánsának: Jonathan M41, Szatmárcsekei Jonathan, Csány1 Jonathan, Watson Jonathan és Red Jonathan 5-5 fájának fiatal leveleiből. Mintánként 500 ng totál DNS-t emésztettünk 5-5 egység EcoRI és MseI enzimmal 1 órán keresztül a következő pufferben (10 mM TRIS-acetát pH 7.5, 10 mM magnézium acetát, 50 mM kálium acetát, 5 mM DTT, 5 ng/l BSA) (Vos *et al.* 1995) 20 µl-es végtérfogatban. 20 µl ligációs mixet (50 pmol MseI és 50 pmol EcoRI adapterek, 2U T4 ligáz and 1X ligáz puffer) adtunk a mintákhoz és egy éjszakán át 16° C-on tartottuk őket. Az első PCR preamplifikációt az adapterekre specifikus primerekkel (E00: 5'- GAC TGC GTA

CCA ATT C – 3’, M00: 5’ – GAT GAG TCC TGA GTA A – 3’) végeztük 20 µl-es végtérfogatban, amely a következő összetevőket tartalmazta: 15-15 ng E00 és M00 primerek, 0.2 mM dNTP, 1.125 mM MgCl₂, 1X PCR puffer és 1.2 U Taq DNS polimeráz (WestTeam). A Perkin Elmer 9600-as PCR készülékben a következő programot alkalmaztuk: 10 ciklusban 94 °C (20 mp), 65⇒56 °C touchdown 1°C/ciklus (30 mp), 72 °C (1 perc), és további 25 ciklus 94 °C (20 mp), 56 °C (30 mp), 72 °C (1 perc).

Összesen három ‘Ret-LTR’ primert (Ret-LTR1: 5’ – AAA TGG AGT GAC AGA CGG GT – 3’, Ret-LTR2: 5’ – GGA GGG TTT TGA GGG ATG TG – 3’, Ret-LTR3: 5’ – CCT TCG GGA TGG GGT GTG TC – 3’) terveztünk az almában eddig azonosított retrotranszpozonok (génbanki számaik: AJ291492, DQ898280, AM167520) long terminal repeat (LTR) régióira. A primerek Cy-5 jelölést kaptak, és ezeket alkalmaztuk az S-SAP vizsgálatainkban egy AFLP primerrel kombinációban. (lásd. 2. ábra.) Az első PCR reakció termékeit hússzorosára hígítottuk és ezekből 4 µl-t használtunk a szelektív amplifikációhoz amelyhez tehát egy jelölt Ret-LTR primert és egy adapter specifikus primert alkalmaztunk kombinációban, mely utóbbi, három szelektív nukleotidot tartalmazott a 3’ végén (Mse-48: 5’ – ~ CAC – 3’ or Mse-55: 5’ – ~ CGA – 3’ or Mse-60: 5’ – ~ CTC – 3’ or Mse-61: 5’ – ~ CTG – 3’ or Eco-33: 5’ – ~AAG – 3’ or Eco-36: 5’ – ~ACC – 3’ or Eco-37: 5’ – ~ACG – 3’ or Eco-44: 5’ – ~ATC – 3’). A reakciókörülmények megegyeztek a preszelektív amplifikációnál leírtakkal. A felszaporodott fragmentumokat ALFexpress-II DNS analizátor segítségével értékeltük ki.

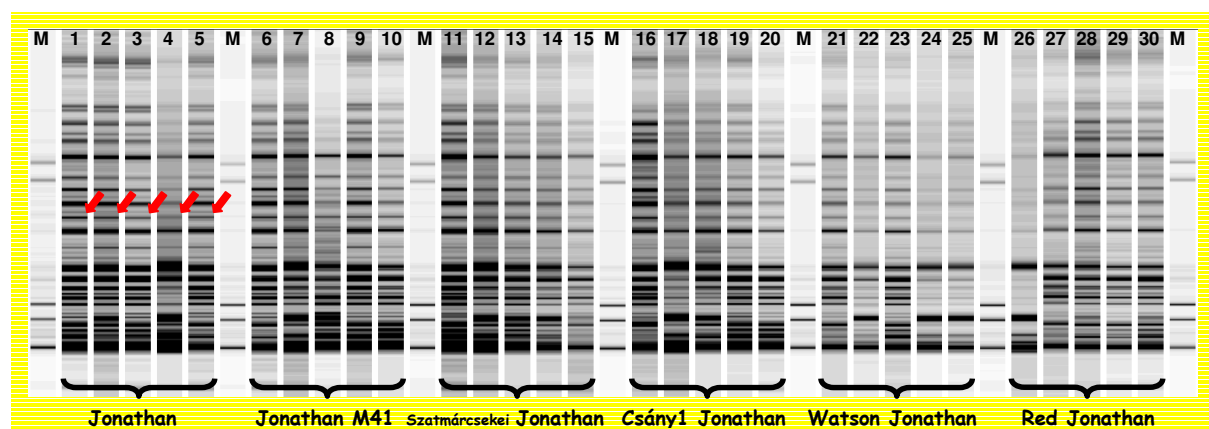
Összesen 24 primerkombináció (3 Ret-LTR × 8 adapter specifikus primer) termékét elemeztük és értékeltük a Jonathan rügymutánsok elkülönítéséhez. A különböző primerkombinációkkal elvégzett reakciók 13-71 fragmentumot eredményeztek (1. táblázat), ami azt jelzi, hogy a vizsgált retrotranszpozonok száma az alma genomjában meglehetősen nagy lehet. Mindössze egy kombinációval (Eco-33 és Ret-LTR2) sikerült polimorfizmust detektálnunk, mellyel a Jonathan alfajta megkülönböztethető a rügymutánsaitól (3. ábra). Az összes többi esetben a genotípusok egymástól elkülöníthetetlenek maradtak (példaként lásd. 4. ábra), még egyedi szintű polimorfizmust sem tudtunk kimutatni.

1. táblázat: A különböző primerkombinációkkal felszaporított S-SAP fragmentumok száma Jonathan szomatikus mutánsok esetében

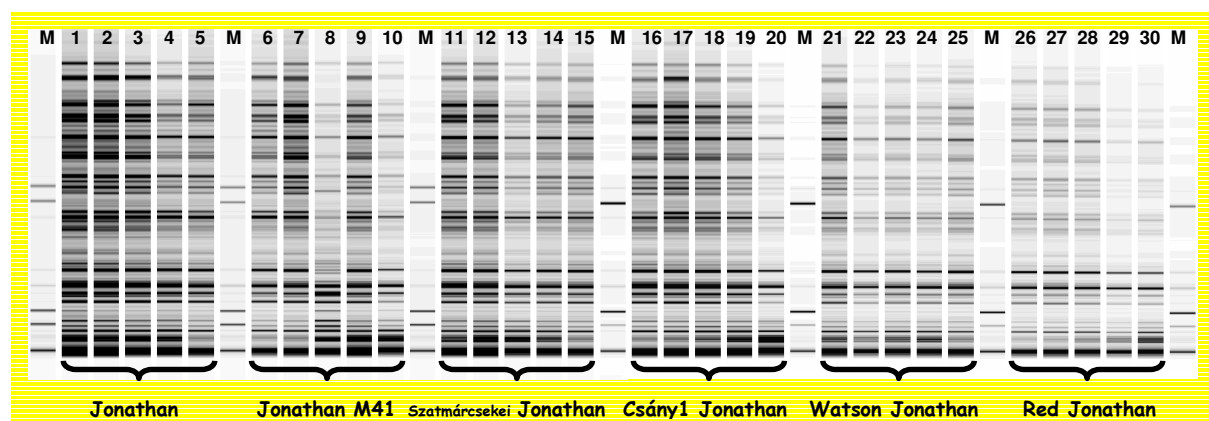
Primerkombináció	fragmentumok	Primerkombináció	fragmentumok
Ret-LTR1 + MseI-48	21	Ret-LTR2 + EcoRI-33	35
Ret-LTR1 + MseI-55	16	Ret-LTR2 + EcoRI-36	38
Ret-LTR1 + MseI-60	30	Ret-LTR2 + EcoRI-37	45
Ret-LTR1 + MseI-61	27	Ret-LTR2 + EcoRI-44	46
Ret-LTR1 + EcoRI-33	36	Ret-LTR3 + MseI-48	32
Ret-LTR1 + EcoRI-36	24	Ret-LTR3 + MseI-55	17
Ret-LTR1 + EcoRI-37	32	Ret-LTR3 + MseI-60	31
Ret-LTR1 + EcoRI-44	27	Ret-LTR3 + MseI-61	39
Ret-LTR2 + MseI-48	19	Ret-LTR3 + EcoRI-33	71
Ret-LTR2 + MseI-55	13	Ret-LTR3 + EcoRI-36	43
Ret-LTR2 + MseI-60	23	Ret-LTR3 + EcoRI-37	33
Ret-LTR2 + MseI-61	24	Ret-LTR3 + EcoRI-44	40

A polimorfizmus hiánya feltehetően annak köszönhető, hogy ez idáig csak három retrotranszpozon szekvencia ismert almából; illetve elképzelhető, hogy a mozgékony elemeknek egy másik csoportja okozta a mutációkat.

Jelenleg az egyetlen talált polimorf fragmentum SCAR markerré történő konvertálása még folyamatban van. A szekvenálás bizonyította, hogy a polimorfizmust valóban retrotranszpozon okozta.



3. ábra: A Jonathan alapfajta és 5 rügymutánsának S-SAP eredménye az Eco-33 és a Ret-LTR1 (Cy-5 jelölt) primereket alkalmazva a szelektív amplifikációhoz. A nyilak a polimorfizmust jelzik.



4. ábra: A Jonathan alapfajta és 5 rügymutánsának S-SAP eredménye az Eco-33 és a Ret-LTR2 (Cy-5 jelölt) primereket alkalmazva a szelektív amplifikációhoz.

A bemutatott technikával sem sikerült tehát a Jonathan rügymutánsokat elkülöníteni egymástól, meggyőződésünk azonban, hogy más fajok esetében – melyeknél jóval több retrotranszpozon szekvencia már rendelkezésre áll – adaptálható lehet a módszer nagyon közeli genotípusok/rügymutánsok elkülönítésére.

Rezisztenciagén analóg markerek azonosítása

Ezen a területen végzett kutatásaink legfontosabb célkitűzése olyan rezisztenciagénekkel szoros kapcsolatba hozható markerek azonosítása, amelyek közvetlenül felhasználhatók a rezisztencianemesítésben a rezisztenciagén(ek) jelenlétének illetve hiányának pontos és megbízható detektálásával. Távlabbi célkitűzésünknek tekintjük természetesen maguknak a rezisztenciagéneknek a klónozását és izolálását is.

A területen elért eredményeink publikálása referált folyóiratban még folyamatban van, ez idáig egy konferencián foglaltuk össze őket:

- Wichmann B., Galli Z., Balázs D., Molnár S., Galbács Z., Kiss E., Szabó T., Heszky L. (2007) Rezisztenciagén analóg markerek azonosítása almában. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, november 7-8 Budapest, Összefoglalók: 218-219 oldal.

Az alma rezisztencianemesítésének legfontosabb célkitűzése a két legjelentősebb gombabetegséggel, a lisztharmattal (kórokozó: *Podosphaera leucotricha*) és a varasodással (kórokozó: *Venturia inaequalis*) valamint a tűzelhalással (kórokozó: *Erwinia amylovora* baktérium) szemben rezisztens fajták előállítására. A legújabb stratégiák közé tartozik a rezisztenciagén analóg (RGA) kapcsolt markerek kifejlesztése és alkalmazása.

Napjainkig, több mint 60 növényi rezisztenciagént izoláltak különböző növényfajokból (Xiao, 2006), almából eddig egyet (*HcrVf2*, Belfanti *et al.* 2004). Az első legfontosabb észrevétel, amelyet a rezisztencia génekkel kapcsolatban első ránézésre tehetünk, hogy több mint 40 közülük olyan fehérjéket kódol mely *NBS* (Nucleotide-Binding Site) -*LRR* (Leucine-Rich Repeat) motívumokat tartalmaz (Hammond-Kosack & Jones, 1997, Dangl & Jones, 2001). Ezek további két nagyobb osztályra különíthetők el. Az első csoportba azok tartoznak, melyek olyan *N*-terminális domént tartalmaznak, amely nagyon hasonlít a *Drosophila Toll*, és az emberi *Interleukin-a* (*TIR*) transzmembrán receptorok citoplazmatikus szignál doménjeire. A második osztály, amely rendelkezik egy ún. „feltekeredett spirál” (CC: *coiled coil*) *N*-terminális doménnel.

NBS-LRR típusú géneket bőségesen tartalmaznak a növényi fajok. Például az *Arabidopsis*-ban becslések szerint legalább 150 különböző *NBS-LRR* gén létezik, s ez a genom több mint 1 %-a, a rizs genom pedig több mint 500 *NBS-LRR* gént tartalmaz (Goff *et al.* 2002).

A különböző növények sokféle patogénnel szembeni rezisztenciagénjei tehát nagyfokú strukturális konzervativizmust mutatnak. A konzervált régiókat felkutatva és rájuk degenerált primereket tervezve sok növényfajból sikerült már a rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt ún. RGA (*resistance gene analog*) markereket létrehozni (Aarts *et al.* 1998, Collins *et al.* 1998, Leister *et al.* 1998, Shen *et al.* 1998, Mago *et al.* 1999, Deng *et al.* 2000, Noir *et al.* 2001, Vicente & King 2001, van der Linden *et al.* 2004). Sok ilyen szekvencia térképezésre is került és bebizonyosodott róluk, hogy szoros kapcsolatban állnak az ismert rezisztenciagénekkel (Meyers *et al.* 1999, Timmerman-Vaughan *et al.* 2000, Meyers *et al.* 2003).

Almában a rezisztencia szempontjából legjobban tanulmányozott betegség kétségtelenül az alma varasodása, amelyet a *Venturia inaequalis* patogén gomba okoz. Ezidáig legalább 12 fő gént feltételeznek, hogy hatással van a rezisztencia kialakításában (Williams és Kuc 1969, Lespinasse 1989, Durel *et al.* 2000, Hemmat *et al.* 2002, Patocchi *et al.* 2003, Tartarini *et al.* 2003). A legtöbbjük már térképezve is lett néhány centiMorgan-nyi távolságra molekuláris markerektől. Ennek ellenére még csak egyetlen rezisztenciagént sikerült almából izolálni, a *HcrVf2* gént (Belfanti *et al.* 2004).

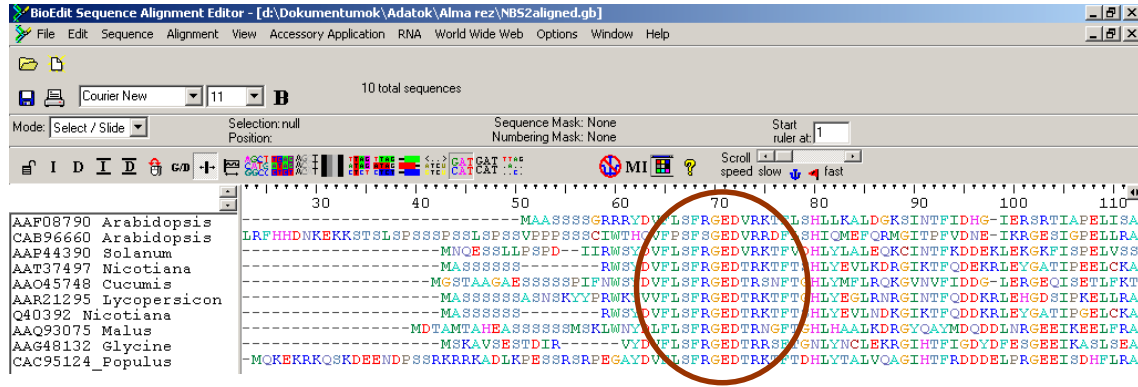
Az alma lisztharmat elleni rezisztencia kialakításában szerepet játszó néhány fő gént már szintén sikerült azonosítani és térképezni (Alston 1983, Evans & James 2003), a gének izolálása azonban még várat magára.

Rezisztenciagén analóg markerek azonosításáról almában eddig három publikáció számol be (Baldi *et al.* 2004, Belfanti *et al.* 2004, Calenge *et al.* 2005). Az első esetben 28, a másodikban pedig legalább 50 *NBS/LRR* típusú RGA-t izoláltak, azonban a polimorfizmus hiánya miatt közülük csak 18-at sikerült térképezni. A legutóbbi publikációban (Calenge *et al.* 2005) 43 fragmentumot azonosítottak az *NBS* doménre tervezett degenerált primerekkel, a szekvenálás után 23 marker bizonyult RGA-nak. A térképezés során a legtöbb marker cluster-ekbe tömörült, a már azonosított lisztharmat és varasodás elleni rezisztenciagének köré csoportosulva. *SCAR* markerré azonban – amellyel a markerhez kapcsolt szelekció a legkönnyebben elvégezhető – még egy RGA sem lett konvertálva.

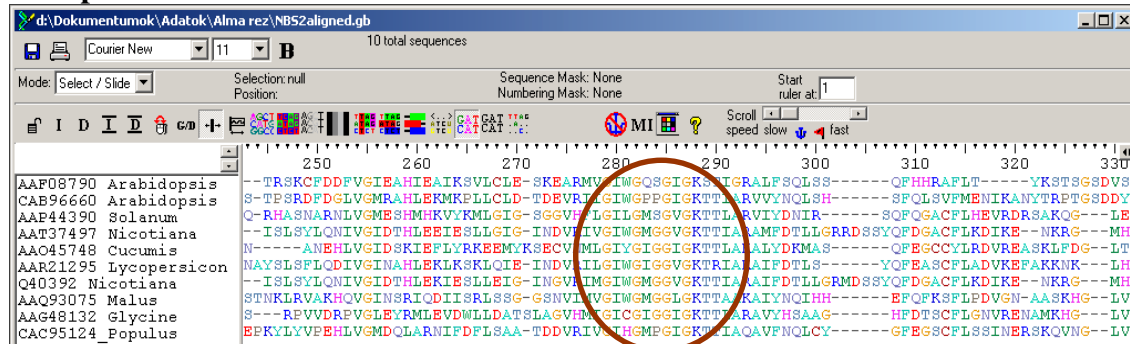
Az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) génbankból kigyűjtöttük a különböző növényfajokból eddig izolált rezisztenciagének szekvenciát. Az aminosav és nukleotid

szekvenciákat a BioEdit számítógépes programban rendeztük össze. Kiválasztottuk a legkonzerváltabb régiókat (5. ábra), amelyek az összes növényfajon belül kis eltéréseket mutatnak az aminosav szekvenciáikban, és degenerált primereket terveztünk a nukleotidszekvenciáik alapján.

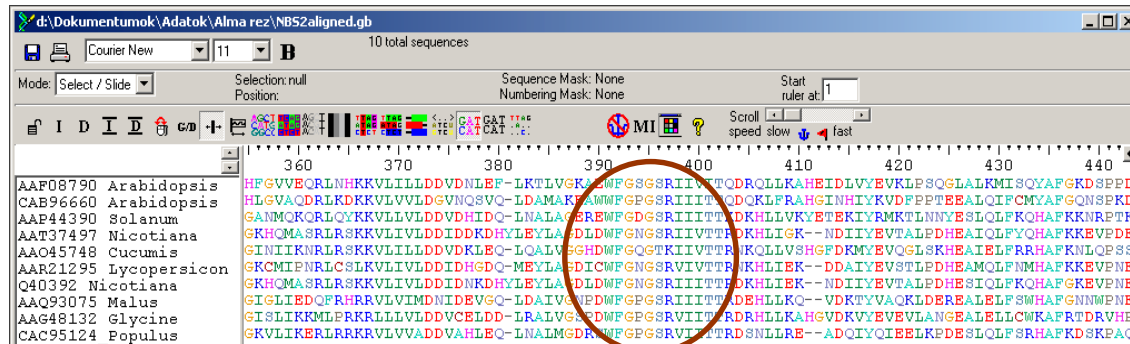
TIR



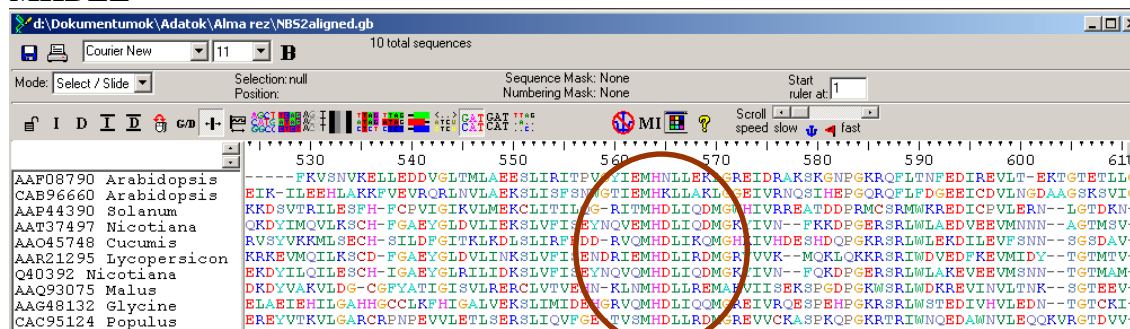
P-loop



WFGPG



MHDLL

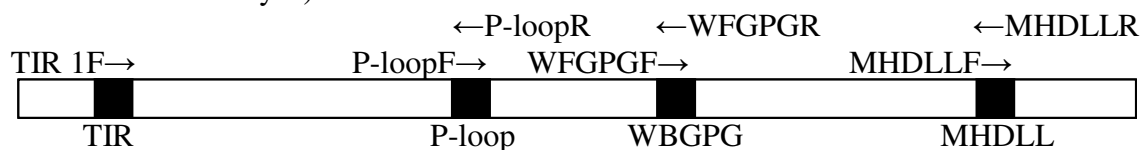


5. ábra: Ismert rezisztenciagének általunk talált legkonzerváltabb régiói (részlet).

A tervezett degenerált primerek elnevezése és szekvenciái a következők:

NÉV:	SZEKVENCIA
TIR1F:	5' – TYY TVA GTT TYA GAG GWG AAG A – 3'
P-loopR:	5' – TTG TYT THC CNA HKC CDC CHA T – 3'
P-loopF:	5' – ATD GGH GGM DTN GGD AAR ACA A – 3'
WFGPG-R:	5' – AYT CTR CTD CCN KBA CCA AAC CA – 3'
WFGPG-F:	5' – TGG TTT GGT VMN GGH AGY AGA RT – 3'
MHDLL-R:	5' – CCA TWT STY KDA DYA ADT CRT GCA T – 3'
MHDLL-F:	5' – ATG CAY GAH TTR HTH MRA SAW ATG G – 3'

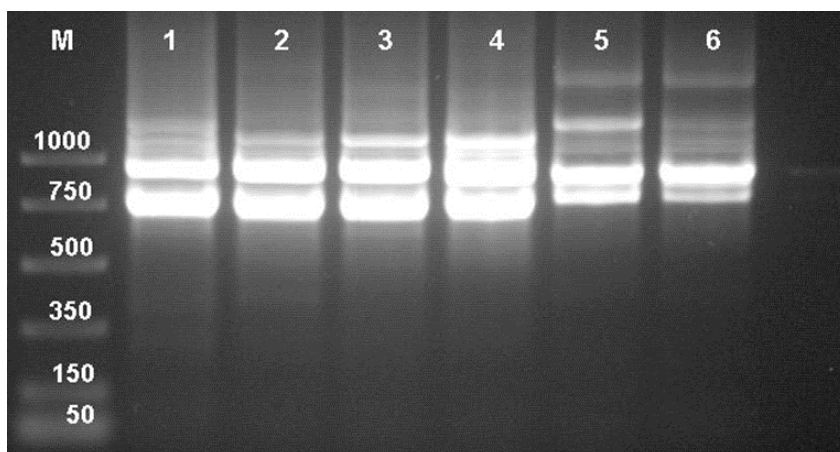
Az általunk tervezett primerek tapadása lineáris sorrendben (az ábra nem méretarányos):



Az MHDLL-Forward primer azt a célt szolgálja, hogy az ebben a régióban már azonosított rezisztenciagén analóg marker 3' vége felé tovább tudjunk haladni és így remélhetőleg a teljes gént megkapni.

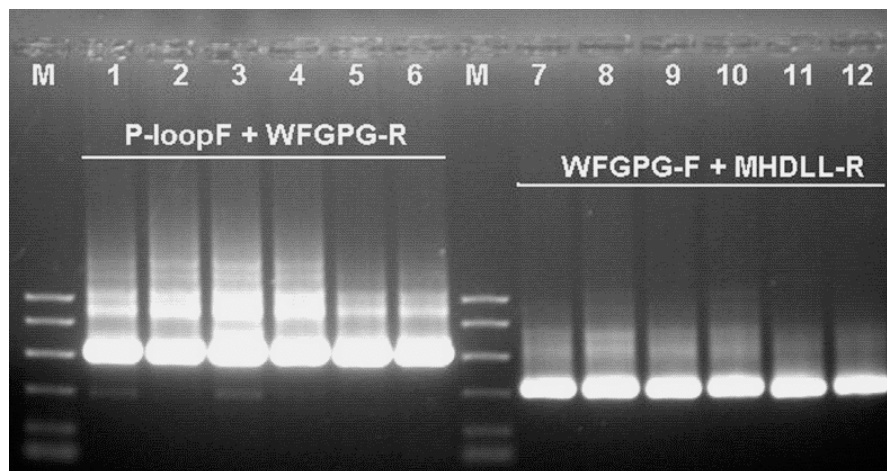
Ezekkel a primerekkel mind a TIR-NBS-LRR, mind a CC-NBS-LRR típusú rezisztenciagénekből lehet szekvenciákat felszaporítani.

A primerek tervezését követően PCR reakciókat indítottunk rezisztens, illetve fogékony alma és szőlő genotípusokból izolált DNS-t templátként alkalmazva (6. és 7. ábrák). A szőlőt azért alkalmaztuk ebben a vizsgálatban, mert egyrészt bizonyítani kívántuk, hogy a degenerált primereink más növényfajokban is alkalmazhatók RGA-k azonosítása céljából, másrészt pedig intézetünk a szőlő molekuláris kutatásával is intenzíven foglalkozik. A szőlőben kapott eredményekről itt nem számolunk be részletesen.



6. ábra: PCR reakció eredménye a TIR1F és P-loop-R degenerált primereket alkalmazva alma (4db) és – referenciaként használt – szőlő (2db) mintákon. M: PCR molekulatömeg marker, 1: Liberty, 2: Gala, 3: Red Rome Van Well, 4: Reanda, 5: Rotundifolia, 6: Cardinal. A Reanda (alma) és a Rotundifolia (szőlő) genotípusok a legtöbb bakteriális és gombás betegséggel szemben rezisztensek, míg a többi fajta fogékonyak tekinthető.

Mivel közismert, hogy a növényi genomokban akár több száz ilyen típusú szekvencia is létezik, arra számítottunk, hogy esetleg sikerül olyan fragmentumokat kapnunk, amelyek csak a rezisztens genotípusban jelennek meg. Ezt a méretbeli különbséget azonban agaróz gélen nem sikerült kimutatnunk, nagy kópiaszámú azonos méretű fragmentumokat kaptunk a betegségre leginkább rezisztens és fogékony genotípusokban egyaránt.



7. ábra: PCR reakció eredménye a P-loop-F és WFGPG-R (1-6) illetve a WFGPG-F és MHDLL-R (7-12) degenerált primereket alkalmazva alma (4) és szőlő (2) mintákon. A minták sorrendje a 6. ábrán bemutatottal megegyező.

Az ábrákból az is kitűnik, hogy a szekvenciák mérete növényfajonként változhat (6. ábra), de meg is egyezhet (7. ábra), illetve, hogy a reakció több típusú szekvenciát is eredményezhet, nyilvánvalóan intron(ok) jelentésének illetve hiányának a következményeként.

A felszaporított fragmentumok méretéből arra következtethetünk, hogy az első két primerpárt alkalmazva intron régió(k) is felszaporításra került(ek), míg a WFGPG-F és MHDLL-R primereket használva az intron nélkül számított ≈ 530 bp méretű fragmentumot kaptuk mind az alma, mind a szőlő esetében.

Az alma mintákból a degenerált primerekkel felszaporított fragmentumokat pGEM T-easy vektorba klónoztuk. A ligáláshoz közvetlenül a PCR termékét használtuk, hogy lehetőleg az összes típusú (azaz azonos méretű, de szekvenciális különbségeket hordozó) fragmentumot sikerüljön klónoznunk. Több mint 100 egyedi kolóniát azonosítottunk kolónia-PCR-rel, melyekből plazmid izolálást követően az inszertet szekvenáltuk. Néhány szekvencia olyan stop kodont, vagy kereteltolódásos mutációt tartalmazott, amely az aminosav szekvencia felborulásához vezetett, ezért ezeket a későbbi munkából kizártuk. A szekvenciák kiértékelését és BLAST analízisét követően összesen 24 olyan feltételezhetően alma RGA-t azonosítottunk, melyek nagy hasonlóságot mutattak más növényfajokban már leközölt RGA-kal és tartalmazták a funkcionális doméneket (lásd pl. 8. ábra). Az új szekvenciákat, az NCBI génbankban leközöltük.

A 8. ábrán bemutatott szekvenciák feltételezhetően TIR-NBS-LRR típusú génekhez tartoznak, mivel az RNBS-A-TIR motívum felfedezhető bennük. A többi fel nem sorolt szekvencia az ú.n. non-TIR-NBS csoport tagjai. Az összes 24 szekvencia tartalmazza viszont a P-loop, GLPL, kináz 2 és kináz 3 funkcionális motívumokat. Referenciaként egy dohányból izolált rezisztenciagén szekvenciáját is feltüntettük (Konagaya *et al.* 2004).

Minden RGA szekvencia alapján specifikus primer-párokat terveztünk, hogy a szekvenciákat SCAR markerekké konvertáljuk. Az eredmények kiértékelése még folyamatban van, a készülő publikációban fogunk róluk beszámolni.

	<u>RNBS-A-TIR</u>	<u>Kináz-2</u>	<u>Kináz3a</u>	<u>RNBS-C</u>
RGA01	FEFQIFLADVRSNVEKGGPLHLQKQLL-29aa	LLVLDDVN-17aa	GSRVLITTRD-12aa	SEVEGLNDDSLQLFSWNAF
RGA02	FKFKSFLADVSNNTSKHGLVLYLQKTLV-27aa	RVLVIMDN-19aa	ESRIITTTQD-12aa	YRLHEMNEEEALELFSWHAF
RGA03	-----MVSLQEQLL-29aa	KVLVVVDD-19aa	GSRIITTRD-12aa	YKAQGMTDDEAFELLSWHAF
RGA06	FLDDVSNVTSKHG-LVYLQEKLSVIL-24aa	VLVIDNI-18aa	GSRIITTRN-12aa	YPLREMKKREALELFSWHAF
RGA08	FLDNVSEKDLVVSQKKLVSILKQTKP-21aa	LVIDNVD-17aa	GSRIITTTQD-14aa	YPLKEMNDEEALKLFSWHPF
RGA09	FEGSSFLANVREVCCKDGI VHLQKQLL-30aa	LLVLDDVD-17aa	GSRVVVTRD-12aa	YEVKPLTQDEALFLSRKAF
RGA22	FEGKSLFSKVRREESMVKLQNLCDIL-26aa	LIVVDDID-17aa	GSRIIVTRD-12aa	CLAQTMNEEEALQLLSWRAF
RGA24	FEGSCFLSSVGESSMTDKGLAKLQKTL-32aa	LVLDDVND-17aa	GSRIITTRD-13aa	YEVEKLNDEHSELELFSWNAF
N	FLKDIKEN--KRG-MHSLQNALSELL-25aa	LIVLDDID-18aa	GSRIITTRD-10aa	YEVTPALPDHESIQLFKQHAF

8. ábra: Almából izolált rezisztenciagén analóg szekvenciák funkcionális elemeinek összehasonlítása egymással, valamint egy dohányból izolált ismert rezisztencia génnel (N: Konagaya *et al.* 2004).

Problémák a kutatás során

Az Újfehértói Kutató Intézet utóbbi években tapasztalható létbizonytalanságának köszönhetően nem alakulhatott ki az a szoros együttműködés, melyet a pályázat benyújtásakor terveztünk. Ennek tudható be, hogy az általunk azonosított RGA-k térképezése még nem valósulhatott meg, mivel megfelelő keresztezésből származó térképezési populáció nem állt időben rendelkezésünkre.

Irodalomjegyzék

- Aarts N, Metz M, Holub E, Staskawicz BJ, Daniels MJ, Parker JE (1998) Different requirements for *EDS1* and *NDRI* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10306-10311.
- Acquadro A, Portis E, Moglia A, Magurno F, Lanteri S (2006) Retrotransposon-based S-SAP as a platform for the analysis of genetic variation and linkage in globe artichoke. *Genome* 49(9):1149-1159.
- Alston FH (1983) Progress in transferring mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance from *Malus* species to the cultivated apple. In: Integrated control of pome fruit diseases. IOBC (WPRS) Bull 8:87-95.
- 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.
- Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarini S, Patocchi A, Barbieri M, Zhu J, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Gessler C, Sansavini S (2004) The *Her Vf2* gene From a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:886-890.
- Calenge F, Faure A, Goerre M, Gebhardt C, Van de Weg WE, Parisi L, Durel C-E (2005) A QTL analysis reveals both broadspectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94:370-379.
- Collins NC, Webb CA, Seah S, Ellis JG, Hulbert SH, Pryor A (1998) The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant Microbe Interact* 11:968-978.
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Deng Z, Huang S, Ling P, Chen C, Yu C, Weber CA, Moore GA, Gmitter FG Jr (2000) Cloning and characterization of NBSLRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theor Appl Genet* 101:814-822.
- Durel CE, van de Weg WE, Venisse JS, Parisi L (2000) Localisation of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the PrimaxFiesta cross. In: Integrated control of pome fruit diseases. IOBC-WPRS Bull 23:245-246.
- Evans KM, James CM (2003) Identification of SCAR markers linked to PI-w mildew resistance in apple. *Theor Appl Genet* 106:1178-1183.
- Galli Z, Halász G, Kiss E, Dobránszki J, Heszky LE (2005) Molecular Identification of Commercial Apple Cultivars with Microsatellite Markers. *HortScience* 40 (7):1974-1977.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92-100

- Leister D, Kurth J, Laurie DA, 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 USA* 95:370–375.
- Goulão L, and CM Oliveira** (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122:81-89.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD** (1997) Plant Disease Resistance Genes. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:575-607.
- Hemmat M, Brown SK** (2002) Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. *J Am Soc Hortic Sci* 127:365-370.
- Hokanson SC, WF Lamboy, AK Szewc-McFadden, and JR McFerson** (2001) Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118:281-294.
- Kobayashi S, Goto-Yomomoto N, Hirochika H** (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304:982.
- Konagaya K, Matsushita Y, Kasahara M, Nyunoya H** (2004) Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *J. Gen. Plant Pathol.* 70:221-231.
- Laurens F, CE Durel, and M Lascostes** (2004) Molecular characterization of French local apple cultivars using SSRs. *Acta Hort.* 663:639-642.
- Liebhart R, L Gianfranceschi, B Koller, CD Ryder, R Tarchini, E Van De Weg, and C Gessler** (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10:217-241.
- Mago R, Nair S, Mohan M** (1999). Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet* 99:50–57.
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral B, Young ND** (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20:317–332.
- Meyers BC, Griego A, Kuang H, Michelmore R** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809-834.
- Nagy ED, Molnar I, Schneider A, Kovacs G, Molnar-Lang M** (2006) Characterization of chromosome-specific S-SAP markers and their use in studying genetic diversity in *Aegilops* species. *Genome*, 49(4):289-296.
- Noir S, Combes M-C, Anthony F, Lashermes P** (2001) Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol Genet Genom* 265:654–662.
- Lespinasse Y** (1989) Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. Genes, resistance mechanisms, present work and prospects. In: *Integrated control of pome fruit diseases*. IOBC-WPRS Bull 2:100-115.
- Lou QF, Chen JF** (2007) Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits. *Genome* 50(9):802-810.
- Patocchi A, Bigler B, Koller B, Liebhart R, Kellerhalls M, Gessler C** (2003) Mapping of *Vr2*, a third apple scab resistance gene of Russian seedling (R12740-7A) P450. *Plant and animal genomes XI conference*, San Diego
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, Marconi G, Bertoli FB, Veronesi F** (2002) Development of S-SAP markers based on an LTR-like sequence from *Medicago sativa* L. *Mol. Genet. Gen.* 267(1):107-114.
- Shen KA, Meyers BC, Islam-Faridi MN, Chin DB, Stelly DM, Michelmore RW** (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.
- Sunako T, Wakako S, Senda M, Akada S, Ishikawa R, Niizeki M, Harada T** (1999) An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119:1297-1303.
- Syed NH, Sureshsundar S, Wilkinson MJ, Bhau BS, Cavalcanti JJV, Flavell AJ** (2005) Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development in cashew (*Anacardium occidentale* L.) *Theor. Appl. Genet.* 110(7):1195-1202.
- Tartarini S, Gennari F, Pratesi D, Palazetti C, Sansavini S, Parisi L, Fouillet V, Durel C-E** (2003) Characterization of a race 6 scab resistance gene from Italian germplasm. *Proceedings of the Eucarpia symposium on fruit breeding and genetics*, Angers
- Timmerman-Vaughan GM, Frew TJ, Weerden NF** (2000) Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 101:241–247.
- van der Linden CG, Wouters DC, Mihalka V, Kochieva EZ, Smulders MJM, Vosman B** (2004) Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor Appl Genet* 109:384-393.
- Venturi S, Dondini L, Donini P & Sansavini S** (2006) Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers. *Theor. Appl. Genet.* 112:440-444.

- Vicente JG, King GJ** (2001) Characterisation of disease gene-like sequences in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet* 102:555–563.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T van de, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M** (1995) AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407-4414.
- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BB, Powell W** (1997) Genetic distribution of *Bare-1-like* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphism (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.* 253:687-694.
- Wichmann B, Galli Z, Molnár S, Galbács Z, Kiss E, Szabó T, Heszky L** (2007) Molecular identification of old Hungarian apple varieties. *Int. J. Hort. Sci.* 13 (3): 37-43.
- Williams EB, Kuc J** (1969) Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annu Rev Phytopathol* 7:223-246.
- Xiao S** (2006) Current perspectives on molecular mechanisms of plant disease resistance. In: Teixeira da Silva (ed.), "Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues" (1st ed.) *Global Science Books, UK*. pp 317-333.
- Yao JL, Dong YH, Morris B** (2001) Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1306-1311.