Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

ALMAFAJTÁK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE ÉS REZISZTENCIAGÉN ANALÓGOK AZONOSÍTÁSA

Doktori Értékezés

Készítette: **Wichmann Barnabás**

Témavezetők: **Dr. Heszky László** egyetemi tanár, akadémikus
SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Dr. Galli Zsolt, tudományos munkatárs
Syngenta Seeds Kft, Ócsa

Gödöllő
2010

Doktori iskola: Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Heszky László
egyetemi tanár, MTA r. tagja
SZIE Genetika és Biotechnológia Intézet

Tudományága: Növénytermesztés, kertészet tudományok

Program: Növénygenetika és biotechnológia

Programvezető: Dr. Heszky László
egyetemi tanár, az MTA r.tagja
SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet

Témavezetők: Dr. Galli Zsolt
tudományos munkatárs, PhD
Syngenta Seeds Kft, Ócsa

Dr. Heszky László
egyetemi tanár, az MTA r. tagja
SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet

…… ……
Dr. Galli Zsolt Dr. Heszky László
társtémavezető társtémavezető

…….
Dr. Heszky László
doktori iskola vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK **3**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **5**

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS **6**

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **9**

2.1. REZISZTENCIA GÉNEK ÉS GÉN ANALÓGOK 9
2.1.1. Rezisztenciagének (R) és típusaik *9*
2.1.2. Rezisztencia gén analógok és markerek *12*
2.1.2.1. Alma lisztharmat (Podosphaera leucotricha) *14*
2.1.2.2. Alma ventúriás varasodás (Venturia inaequalis) *17*
2.1.2.3. Alma tűzelhalás (Erwinia amylovora) rezisztencia *22*
2.2. ALMAFAJTÁK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA 26
2.2.1. Almafajták vizsgálata mikroszatellit markerekkel *26*
2.2.2. Almafajták vizsgálata SSR markerekkel *27*
2.3. RÜGYMUTÁNSOK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS MARKEREKKEL 30
2.3.2. Azonosított retrotranszpozonok *32*

3. ANYAG ÉS MÓDSZER **34**

3.1. VIZSGÁLT FAJTÁK, KLÓNOK ÉS GENOTÍPUSOK 34
3.1.1. Az RGA vizsgálatok fajtái *34*
3.1.2. A magyar alma génbank gyűjtemény vizsgált fajtái és tájfajtái *35*
3.1.3. Rügymutánsok *36*
3.1.3.1. Jonathan fajtakör *36*
3.1.3.2. Starking Delicious fajtakör *37*
3.1.3.3. Golden Delicious fajtakör *37*
3.1.3.4. Gala csoport *38*
3.1.3.5. Elstar csoport *38*
3.1.3.6. Idared csoport *38*
3.2. DNS IZOLÁLÁS A NÖVÉNYMINTÁKBÓL 39
3.3. REZISZTENCIÁHOZ KAPCSOLHATÓ MOLEKULÁRIS MARKER KERESÉS 40
3.3.1. Degenerált primerek tervezése *40*
3.3.2. PCR reakció degenerált primerekkel *40*
3.3.3. A fragmentumok klónozása plazmid vektorba *41*
3.3.4. Kompetens sejtek transzformálása *41*
3.3.5. A rekombináns baktériumok tesztelése – kolónia PCR *41*
3.3.6. Plazmid izolálás *42*
3.3.7. Szekvenálás és a szekvenciák kiértékelése *42*
3.3.8. SCAR markerek tervezése és tesztelésük *42*
3.4. PCR ALAPÚ TECHNIKÁK 44
3.4.1. Mikroszatellit analízis *44*
3.4.1.1. Az allélméretek meghatározása ALF-expressII készülékben *45*
3.4.1.2. Klaszter analízis és PIC és C érték számítások matematikai képletei *45*
3.4.2. S-SAP technika *46*

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK **49**

4.1. REZISZTENCIA GÉN ANALÓGOK (RGA) VIZSGÁLATA: 49
4.1.1. Rezisztencia génekre tervezett degenerált primerek tesztelése *49*
4.1.2. A degenerált primerekkel felszaporított fragmentumok *53*
4.1.3. A fragmentumok klónozása *54*
4.1.4. Az ARGA 1-12 primerekkel kapott DNS fragmentumok szekvenciájának értékelése és SCAR markerek tervezése *56*
4.1.5. Saját és az irodalomban közölt Malus RGA szekvenciák bioinformatikai elemzése *80*
4.1.6. SCAR markerek tesztelése *81*
4.2. ALMAFAJTÁK MOLEKULÁRIS UJJLENYOMAT VIZSGÁLATA SSR MARKEREKKEL 85
4.2.1. A génbank gyűjtemény vizsgált tételeinek allélszáma és allélmérete *85*
4.2.2. A génbank gyűjtemény vizsgált tételeinek genetikai variabilitása *90*

4.2.3. A génbank gyűjtemény tájfajtáinak és a kereskedelmi fajtáknak molekuláris összehasonlítása *93*
4.2.4. A génbank gyűjtemény és a kereskedelmi fajták közös dendrogramja *93*
4.2.5. A magyar génbank vizsgált genotípusainak elkülönítése európai standard SSR markerekkel *97*
4.2.6. A magyar génbank 37 genotípusának a 6 saját és a 8 európai markerekkel kapott dendrogramjainak összehasonlítása *103*
4.2.7. Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis kialakítása *106*
4.3. RÜGYMUTÁNSOK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE 107
4.3.1. SSR markerek alkalmazása *107*
4.3.2. AFLP technika alkalmazása *110*
4.3.3. S-SAP technika alkalmazása *111*

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 115

5.1. RGA MARKEREK AZONOSÍTÁSA ÉS TESZTELÉSE: 115
5.2. ALMA GENOTÍPUSOK MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE: 115
5.3. RÜGYMUTÁNSOK GENETIKAI ELKÜLÖNÍTÉSE: 116

6. ÖSSZEFOGLALÁS 117

7. SUMMARY 124

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 129

9. IRODALOMJEGYZÉK 130

MELLÉKLETEK 143

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP: Amplified Fragmet Length Polymorphism
ARGH: Apple Resistance Gene Homolog
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
C: Confusion probabilities
CC: Coiled Coil (két egymás köré tekeredő α-hélix)
CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
DARE: Durable Apple Resistance in Europe
EAGMAP: European Apple Genome Mapping
GLPL: Gly-Leu-Pro-Leu motívum
He: Heterózis érték
HiDRAS: High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture
HR: Hiperszenzitív Rezisztencia
INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Franciaország
IPTG: isopropil beta -D- thiogalactopyranoside
IRAP: Inter-Retrotransposon Polymorphism
KIN: Kináz domén
LB: Luria-Bertani Medium
LG: Linkage Group
LINE: Long Interspersed Elements
LRR: Leucine-Rich Repeat (leucingazdag ismétlődő szekvencia)
LTR: Long-Terminal Repeats
MAS: Marker Assisted Selection
MBK: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő
MIS: Mildew Immune Selection
NBS: Nucleotide-Binding Site
NCBI: National Center for Biotechnology Information
PCR: Polimerase Chain Reaction
PIC: Polymorphic Information Content
PI: Probability of Identity
QTL: Quantitative Trait Loci
R: Rezisztencia gén
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
REMAP: Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA: Resistance Gene Analog
RGH: Rezisztencia Gene Homolog
RLK: Receptor Like Kinase
RLP: Receptor Like Protein
SCAR: Sequence Characterised Amplified Regions
SSR: Simple Sequence Repeats
SINE: Short Interspersed Elements
SOC: Super Optimal Catobolite
SPSS: Statisztikai Program
S-SAP: Sequence-Specific Amplified Polymorphism
SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism
TIR: Toll és Interleukin-1 receptorral homológ régió
UPGMA: Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Means

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A nemes alma (*Malus x domestica* Borkh.) rendszertanilag a rózsavirágúak (*Rosales*) rendjén belül, a rózsafélék (*Rosaceae*) családja, almafélék (*Pomoideae*) alcsaládjának, alma (*Malus*) nemzetségébe tartozik. Ploidfokát tekintve a legtöbb alma fajta diploid (2n=34). Kromoszóma száma n=17. A termesztett alma nem botanikai faj, hanem kultúrfaj. Fajtái eltérő vadfajokra és ezek kereszteződéseire vezethetők vissza (Bödecs L.-né és Tomcsányi 1979).

Az európai fajták létrejöttében elsősorban a paradicsomi alma (*Malus paradisiaca*), az európai vadalma (*M. sylvestris*), az erdélyi vadalma (*M. dasyphylla*), a kaukázusi alma (*M. orientalis*) és a korai vadalma (*M. praecox*) játszhatott szerepet. Az ázsiai almafajtáknak más őseik vannak (pl. *M. prunifolia, M. baccata*). Az almafajtákat ezért nagymértékű heterozigótaság és jelentős genetikai variabilitás jellemzi. A botanikusok azt is hangsúlyozzák, hogy a kaukázusi, közép-ázsiai és európai fajtakeletkezési központok egymástól függetlenül alakultak ki.

A legrégibb alma-maradványok a Heilbronn melletti Böckingenből, Kr.e. 5000 tájáról származó paradicsomi alma magvak (Pethő és Karádi 1978). Földrajzi szempontból Forsline *et al.* (1994) valamint Lamboy *et al.* (1996) Kazahsztánt és ezen belül is Alma Ata-t (Almák atyja) jelölik meg géncentrumként. A korábbi irodalom, azonban sok más régiót is megjelöl. Vannak, akik Nyugat-Ázsiát, Közép-Ázsiát, a Közel-keletet vagy Szibériát tartják az alma géncentrumának (Zeven és Zhukovsky 1975, Zeven és de Wet 1982). Surányi (1998) a korábbi elméleteket Terpó (1974) nyomán módosítva tizenkét géncentrumot határoz meg.

Négy évvel a szőlő genom szekvenálása után az alma teljes genom szekvenciáját 2010-ben fejezték be. Haploid genommérete: 7,423 x 10^6 bp, nagyjából 57000 kódoló szekvenciát (gént), azonosítottak (Velasco *et al.* 2010).

A világon 2009-ben 4,957 millió hektáron összesen 71,7 millió tonna almát termeltek. Kína járt az élen több mint 2 millió hektárral, és több mint 31 millió tonnányi termés mennyiséggel (FAOSTAT). Európa almatermése megközelítőleg 16 millió tonna volt, 1,25 millió hektáron. Magyarországon 2009-ben 36644 hektáron termesztettek almát,

össztermés pedig 575368 tonna volt. Az adatok alapján ezzel a mennyiséggel Európában a 7. almatermesztő ország vagyunk, megelőzve többek között Spanyolországot, Romániát és Ausztriát (FAOSTAT 2010). Hazánkban csak a szőlőtermő területe nagyobb az almáénál, azonban termés mennyiség tekintetében, 25 ezer tonnával megelőzi a szőlő 550 ezer tonnás 2009-es évi hozamát Az elmúlt évben hazánk termelt 894 ezer tonna gyümölcsnek (szőlő nélkül) több mint 60%-át tette ki az alma (FAOSTAT 2010).

A gyümölcstermesztésben, napjainkban a különböző kórokozók és kártevők jelentős termésveszteséget okozhatnak. A vegyszeres növényvédelem fontos és bizonyos esetekben elengedhetetlen, azonban egyre inkább megfogalmazódik az igény, a környezet vegyszerterhelésének mérséklését biztosító, illetve az emberi egészséget nem veszélyeztető technológiák nagyobb arányú bevezetése iránt. Ezekben, a törekvésekben kiemelt szerephez jut a rezisztencianemesítés, melynek célja a betegségeknek és kórokozóknak ellenálló/rezisztens fajták előállítása.

Az almanemesítés fontos célkitűzései közé tartoznak az öntermékenyülés, az ökotolerancia, termőképesség, termésbiztonság, szállíthatóság, tárolhatóság és gyümölcsminőség javítása mellett számos betegséggel szembeni ellenállóság kialakítása. Ez utóbbinak fő célkitűzéseit a két legjelentősebb gombabetegséggel, a lisztharmattal (*Podosphaera leucotricha*) és a varasodással (*Venturia inaequalis*) valamint a bakteriális tűzelhalással (*Erwinia amylovora*) szemben rezisztens fajták előállítása jelenti. Ezt a célt szolgálják a legújabb molekuláris stratégiák, mint például a rezisztencia gén analóg (RGA) kapcsolt markerek kifejlesztése és alkalmazása.

A kutatásaink első célkitűzése olyan RGA markerek azonosítása és tesztelése volt, az általunk vizsgált genotípusokon, melyek alkalmasak a rezisztenciagén(ek) jelenlétének, illetve hiányának kimutatására.

Indoklás:

A különböző növények, patogénekkel szembeni rezisztencia génjei nagyfokú strukturális konzervativizmust mutatnak, ezek az ún. Nucleotide-Binding Site (NBS) vagy az Leucine-Rich Repeat (LRR) szekvenciák. Az ilyen típusú szekvenciákra tervezett primerek lehetőséget adnak a rezisztencia génekhez kapcsolt markerek azonosítására az alma genomban.

Második célunk olyan módszer kidolgozása, illetve fejlesztése volt, mely alkalmas „molekuláris ujjlenyomat” készítésére az általunk vizsgált minden egyes fajtára, továbbá felhasználásával azok származása (pedigré) meghatározható.

Indoklás:

Az almafajták egyre növekvő száma (több mint 15 ezer fajta a világon) megköveteli az egyes genotípusok egyértelmű és pontos azonosíthatóságát és elkülöníthetőségét más klónoktól, fajtáktól, stb. E célra felhasználható markerek két nagy csoportját a morfológiai, valamint a napjainkban már egyre elterjedtebben alkalmazott molekuláris markerek jelentik. A morfológiai markerek fenotípusosan megjelenő, öröklődő tulajdonságok gyakran nem elég informatívak és megbízhatóságukat a környezet jelentősen befolyásolhatja. A molekuláris markerek nagy előnye, hogy megjelenésüket környezeti és episztatikus hatások nem befolyásolják, számuk korlátlan, mivel elvileg a genom valamennyi allél formája és azok kombinációi alkalmasak az azonosításra.

Harmadik célunk olyan molekuláris markerek és technikák keresése és tesztelése volt, melyekkel esetleg sikeresen lehetne rügymutációt nagy valószínűséggel kiváltó retrotranszpozonok jelenlétét, helyét a genomban detektálni**.**

Indoklás:

Új fajták kiinduló alapanyagai rügymutációk is lehetnek. Ezek a mutációk olyan fenotípusos változásokat eredményezhetnek, mint a gyümölcs színe vagy alakja, a fa mérete és alakja, elágazási hajlam, stb. A rügymutánsok az alapfajta klónjainak tekinthetők, melyek csak egy, vagy néhány gén mutáns allélváltozatában különböznek az alapfajtától, illetve egymástól. A fajtakörön belüli rügymutánsok közötti genetikai különbségek tehát annyira csekélyek, melyek napjainkig nem tették lehetővé elkülönítésüket, molekuláris markerekkel (pl. RAPD, AFLP, SSR stb.). A különbségek detektálása érdekében ezért az AFLP és SSR markereket, valamint egy új megközelítést (S-SAP) is bevontunk vizsgálatainkba, mely a retrotranszpozonokat határoló DNS szekvenciák közötti polimorfizmus kimutatására alkalmas, ezáltal lehetőséget adhat a fajtakörök egyes klónjainak molekuláris elkülönítésére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Rezisztencia gének és gén analógok

2.1.1. Rezisztenciagének (R) és típusaik

Növények esetében két, könnyen elkülöníthető természetes védelmi rendszer működik a kórokozók felismerése és ellenük való védekezés során (Jones és Dangl 2006).

Az **első csoport** az ún. eredendő vagy általános rezisztencia, mely azon veleszületett tulajdonságokat foglalja magában (bizonyos fokú kémiai, mechanikai védelem) amelyek akkor is jelen vannak és működnek, ha a növény teljességgel kórokozómentes, steril környezetben fejlődik. A morfológiai és anatómiai bélyegeken kívül a növények számos másodlagos anyagcsereterméket is termelnek, melyek mikroba gátló hatásúak.

A **második csoportot** az adaptív (szerzett) rezisztencia mechanizmusai jelentik. Ide tartoznak a kórokozó molekuláris jeleinek felismerésével és a jelátvitelt követő molekuláris válaszreakciókkal kapcsolatos mechanizmusok. Maga a rezisztencia, a patogén avirulencia (*Avr*) gén lókusza, valamint a növényi rezisztencia lókusz specifikus interakcióinak folyamán alakul ki (Dangl és Jones 2001).

A ’gén-gén szembeni’ hipotézis szerint – amely a legfontosabb specifikus rezisztenciaformát jelenti (Flor 1971) – a gazdaszervezetben meglévő rezisztenciagén által termelt fehérje, a patogén *Avr* gén által termelt fehérjét, közvetlenül ismeri fel. Ennek hatására a jelátviteli mechanizmuson keresztül a sejtmagban különböző gének átírása következik be, biztosítva a növényi válaszreakció alternatív lehetőségeit.

A nem közvetlen receptor-ligand kapcsolat esetén növényi rezisztencia fehérje saját, a kórokozó által valamilyen megváltoztatott növényi fehérjével lép kapcsolatba. Ez utóbbi a ’guard’ (őrző) (Dangl és Jones 2001; Chisholm 2006) hipotézis. Evolúciós szempontból a növény számára az utóbbi út az előnyösebb, mert a patogén evolúciója gyorsabb, s a gyorsabban változó patogén eredetű *Avr* fehérjét nehezebb felismernie az R-gén által termelt receptornak, mint a saját növényi eredetű fehérjét, amelyet az *Avr* fehérje módosít a fertőzés során.

Az **R gének** a védekezés és patogén felismerés elleni funkciók beindításáért felelősek. Ezt a kapcsolatot először Flor (1971) figyelte meg, mikor a lenen a lenrozsda

(*Melampsora lini*) fertőzést vizsgálta. Abban az esetben, amikor a domináns rezisztenciagén volt jelen a lenben, valamint a domináns *AvrL* gén a kórokozóban, akkor a kapcsolat inkompatibilis volt. Az *Arabidopsis thaliana* esetében a *Pseudomonas syringae pv. maculicola* elleni rezisztenciát az *RPM1* gén kódolja (Nimchuk *et al.* 2003). Abban az esetben, ha a növény az *RPM1* receptorral rendelkezett, akkor képes volt védekezni a kórokozó ellen. Abban az esetben viszont, amikor a növény-patogén kapcsolatból akár az *RPM1* receptor, akár az *AvrRpm1* elicitor hiányzott, a betegség kialakult a növényben.

A legtöbb R-*Avr* kapcsolatban azonban még kevés adat áll rendelkezésre a molekuláris felismerés mechanizmusa vonatkozásában. A dohány mozaik vírus *Tobacco mosaic virus* esetében például, az N gén által meghatározott rezisztencia során, az *Avr*-determináns egy 126 kDa replikáz fehérje 50 kDa helikáz doménje (Marathe *et al.* 2002). A folyamat során az N gén terméke ATP közvetítésével kapcsolódik egy helikáz doménhez. Az így keletkező N fehérje (ADP/N) konformációja megváltozik, s ezáltal válik alkalmassá a rezisztenciához vezető jelátviteli rendszerkövetkező elemével való reakcióra (Ueda *et al.* 2006).

A védelmi útvonalból napjainkig számos elem került meghatározásra. Számos rezisztenciagént klónoztak különböző növényfajokból (Xiao 2006). Felépítésük alapján a többségük leucin gazdag ismétlődésű szekvenciát tartalmaz a C terminális végükön (Nimchuk *et al.* 2003). Hosszúságukban változatosak, valamint patogén és/vagy biokémiai jelek felismerésében vesznek részt. Jellemzőjük továbbá a szerin/treonin protein-kinázok kisebb előfordulási mennyisége. Ezek a kinázok felelősek a rezisztencia kialakításában részt vevő fehérjék közötti kölcsönhatások létrejöttéért, ezért ritkább előfordulásuk feltételezhetően az elicitorokkal szembeni fajlagosságnak köszönhető. Ezek a domének a napjainkig klónozott rezisztenciagének legnagyobb részében (70%) szintén megtalálhatók, és ezek az erősen konzerválódott régiók, elrendezésüket tekintve szigorú sorrendben követik egymást.

Maguk a **receptor fehérjék** két nagy csoportba sorolhatóak, az intracelluláris receptorok, melyek a citoplazmában helyezkednek el és az LRR doméneken kívül, tartalmazhatnak nukleotid-kötő doméneket is. Ebben az esetben a kórokozó felismerését követően a nukleotidkötő régió kötődik a különböző jelátviteli molekulákhoz, aktiválva őket. Az NBS motívumok olyan receptorokkal is kapcsolatban állhatnak, mint a Toll vagy az interleukin-1 (TIR). A receptorok másik nagy csoportja az extracelluláris

receptorok. (Hammon-Kosack és Parker 2003). A különböző rezisztenciagének eltérő elicitorokkal léphetnek kölcsönhatásba, azonban az így elindított rezisztenciát indukáló jelátviteli folyamatok nagyfokú hasonlóságot mutatnak (Király 2004, Gáborjányi és Király 2007). Számos egyéb feltehetően igen fontos szerepet játszó domént írtak le a napjainkig vizsgált rezisztenciagénekben. Ilyen motívumok például az adenozin-trifoszfát és guanozin-trifoszfát-kötő fehérjék, mint a P-loop (kináz-1a) és a kináz-2, valamint olyan putatív transzmembrán domének mint a kináz-3a, valamint Gly--Leu--pro--Leu (GLPL).

Ezekre a funkcionális motívumokra tervezett markerekkel **számos rezisztenciagént azonosítottak** napjainkig. Vizsgálatainkban mi is ezekre a konzervatív motívumokra terveztünk primereket, valamint az ellenőrzések során is ezek meglétét vizsgáltuk. 2006 októberéig összesen 63 növényi rezisztenciagént izoláltak és klónoztak különböző növényfajokból (Xiao 2006, McHale 2006). A **1. táblázatban** a bizonyítottan (izolált és klónozott) rezisztencia géneknek tekinthető eredményeket tűntettük fel. Az elmúlt évek eredményeit a többi növény fajnál nem tartottuk szükségesnek felsorolni, mivel almából napjainkig csak egyetlen rezisztencia gént (*HcrVf2)*, klónoztak (Belfanti *et al.* 2004, Malnoy *et al.* 2008).

HcrVf2 izolált rezisztencia gén az rezisztenciagének első csoportjába tartozik, amely receptor-szerű fehérjéket (RLP) kódolnak, egy extracelluláris LRR domént, és egy C-terminális membrán receptort tartalmaznak. Hasonló rezisztencia gént először a burgonyából (*Cf2/4/5/9*) izolálták, ahol rezisztenciát biztosít a *Cladosporium fulvum* kórokozó gomba ellen (Jones *et al.* 1994, Hammond-Kosack és Jones 1997). Azonosították továbbá az *Arabidopsis-ban* (*RPP27*), ahol a *Peronospora parasitica* ellen nyújt védelmet (Tor *et al.* 2004).

1. Táblázat: A különböző növényfajokból izolált rezisztenciagének (Xiao, 2006 nyomán).

Év	Gén	Növényfaj	Patogén	Fehérje típus	Hivatkozás
1992	*Hm1*	Kukorica	*Helminthosporium maydis* (race 1)	eR	Johal and Briggs 1992
1993	*Pto*	Paradicsom	*Pseudomonas syringae* p.v. *tomato* (*avrPto*)	Kinase	Martin *et al.* 1993
1994	*RPS2*	Arabidopsis	*Pseudomonas syringae* p.v. *maculicola* (*avrRpt2*)	CC-NBS-LRR	Bent *et al.* Mindrinos *et al.* 1994
1994	*N*	Dohány	Mosaic virus	TIR–NBS–LRR	Whitham *et al.* 1994
1994	*Cf-9*	Paradicsom	*Cladosporium fulvum* (*avr9*)	RLP	Jones *et al.* 1994
1995	*RPM1*	Arabidopsis	*Pseudomonas syringae* p.v. *maculicola* (*avrRpm1*)	CC-NBS-LRR	Grant *et al.* 1995
1997	*Hs1(pro-1)*	Cukornád	*Heterodera schachtii Schmidt* variant of	RLP	Cai *et al.* 1997
1996	*Cf-2*	Paradicsom	*cladosporium fulvum* (*avr2*)	RLP	Dixon *et al.* 1996
1995	*Xa-21*	Rizs	*Xanthomonas oryzae* p.v. *oryzae* (all races)	RLK	Song *et al.* 1995
1995	*L6*	len	len rozsda	TIR–NBS–LRR	Lawrence *et al.* 1995
1997	*Cf-4*	Paradicsom	*cladosporium fulvum* (*avr4*)	RLP	Thomas *et al.* 1997
1997	*mlo*	Árpa	*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (all races)	seven-TM	Buschges *et al.* 1997
1997	*M*	Len	len rozsda	TIR–NBS–LRR	Anderson *et al.* 1997
1998	*RPP8*	Arabidopsis	*Peronospora parasitica*	CC-NBS-LRR	McDowell *et al.* 1998
1998	*Cf-5*	Paradicsom	*Cladosporium fulvum* (*avr5*)	RLP	Dixon *et al.* 1998
1998	*RPP1*	Arabidopsis	*Peronospora parasitica*	TIR-NB-LRR	Botella *et al.* 1998
1998	*RPP8*	Arabidopsis	*Peronospora parasitica*	CC-NB-LRR	McDowell *et al.* 1998
1998	*I-2*	Paradicsom	*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*	CC-NBS-LRR	Simons *et al.* 1998
1998	*Mi-1.2*	Paradicsom	root knot nematode	CC-NBS-LRR	Milligan *et al.* 1998
1998	*Xa1*	Rizs	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	CC-NBS-LRR	Yoshimura *et al.* 1998
1998	*RPS5*	Arabidopsis	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrPphB*)	CC-NBS-LRR	Warren *et al.* 1998
1999	*Bs2*	Paprika	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*avrBs2*)	CC-NBS-LRR	Tai *et al.* 1999
1999	*Rx*	Burgonya	Burgonya virus X	CC-NBS-LRR	Bendahmane 1999
1999	*Rp1-D*	Kukorica	*Puccinia sorghi* (rust)	CC-NBS-LRR	Collins *et al.* 1999
1999	*Pib*	Rizs	*Magnaporthe grisea*	CC-NBS-LRR	Wang *et al.* 1999
1999	*RPS4*	Arabidopsis	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrRps4*)	TIR–NBS–LRR	Gassmann *et al.*
1999					
2000	*Asc-1*	Paradicsom	*Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* (AAL toxin)	eR	Brandwagt *et al.* 2000
2000	*Pi-ta*	Rizs	*Magnaporthe grisea* (*avrPita*)	CC-NBS-LRR	Bryan *et al.* 2000
2000	*FLS2*	Arabidopsis	Multiple bacteria (flagellin)	RLK	Gomez-Gomez and Boller 2000
2000	*RPP13*	Arabidopsis	*Peronospora parasitica*	CC-NBS-LRR	Bittner-Eddy 2000
2000	*HRT*	Arabidopsis	turnip crinkle virus	CC-NBS-LRR	Cooley *et al.* 2000
2000	*Sw-5*	Paradicsom	tospovirus	CC-NBS-LRR	Brommonschen 2000
2001	*Mla1*	Árpa	*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (resp. race 1)	CC-NBS-LRR	Zhou *et al.* 2001
2001	*Mla6*	Árpa	*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (resp. race 6)	CC-NBS-LRR	Halterman *et al.* 2001
2001	*Ve1*	Paradicsom	*Verticillium albo-atrum* variant of	RLP	Kawchuk *et al.* 2001
2001	*Ve2*	Paradicsom	*Verticillium albo-atrum* variant of	RLP	Kawchuk *et al.* 2001
2001	*RPW8.1*	Arabidopsis	Multiple powdery mildew species	TM-CC	Xiao *et al.* 2001
2001	*RPW8.2*	Arabidopsis	Multiple powdery mildew species	TM-CC	Xiao *et al.* 2001
2001	*PBS1*	Arabidopsis	*Pseudomonas syringae* (*avrPphB*)		Swiderski 2001
2002	*R1*	Burgonya	*Phytophthora infestans* (race 1)	CC-NBS-LRR	Ballvora *et al.* 2002
2002	*RPP4*	Arabidopsis	*Peronospora parasitica*	TIR–NBS–LRR	van der Biezen 2002
2002	*Dm3*	Káposzta	*Bremia lactuca*	CC-NBS-LRR	Shen *et al.* 2002
2002	*RRS-1*	Arabidopsis	*Ralstonia solanacearum* (race 1)	TIR-NBS-LRRNLS-WRKY	Deslandes *et al.* 2002
2002	*Rpg1*	Árpa	*Puccinia graminis* f.sp. *tritici* variant of	RLK	Brueggeman 2002
2002	*RCY1*	Arabidopsis	cucumber mosaic virus	CC-NBS-LRR	Takahashi 2002
2002	*Hero*	Paradicsom	*Globodera rostochiensis* and *G. pallida* (nematode)	CC-NBS-LRR	Ernst *et al.* 2002
2002	*Y-1RB*	Burgonya	Burgonya virus Y	TIR–NBS–LRR	Vidal *et al.* 2002
2003	*(Rpi-blb1)*	Burgonya	*Phytophthora infestans*	CC-NBS-LRR	Song *et al.* 2003
2003	*Erecta*	Arabidopsis	*Ralstonia solanacearum*; *Plectosphaerella cucumerina*	RLK	Godiard *et al.* 2003
2003	*Lr21*	Búza	Leaf rust	CC-NB-LRR	Huang *et al.* 2003
2004	*Xa26*	Rizs	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)	RLK	Sun *et al.* 2004
2004	*At1/At2*	Sárgadinnye	*Pseudoperonospora cubensis*	eR	Taler *et al.* 2004
2004	*RPP27*	Arabidopsis	*Peronospora parasitica*	RLP	Tor *et al.* 2004
2004	*Mla7/10/13*	Árpa	*blumeria graminis* f.sp. *hordei* (race 7/10/13)	CC-NBS-LRR	Halterman 2004
2004	*Pm3B*	Búza	*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*	CC-NBS-LRR	Yahiaoui *et al.* 2004
2004	*Bs4*	Paradicsom	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*)	TIR–NBS–LRR	Schornack 2004
2004	***HcrVf2***	**Alma**	***Venturia inaequalis***	**RLP**	**Belfanti et al. 2004**
2004	*Fom-2*	Sárgadinnye	*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*	CC-TIR–NBS–LRR	Joobeur *et al.* 2004
2004	*RAC1*	Arabidopsis	*Albugo candida* isolate *Acem1*	TIR–NBS–LRR	Borhan *et al.* 2004
2005	*Xa27*	Rizs	*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*	two α helices	Gu *et al.* 2005
2005	*R3a*	Burgonya	*Phytophthora infestans*	CC-NBS-LRR	Huang *et al.* 2005
2005	*RFO1*	Arabidopsis	*Fusarium* wilt	variant of RLK	Diener 2005
2005	*Rpi-blb2*	Burgonya	*Phytophthora infestans*	CC-NBS-LRR	van der Vosse 2005

2.1.2. Rezisztencia gén analógok és markerek

A különböző növényfajok rezisztenciagénjeinek termékei nagyfokú strukturális konzervativizmust mutatnak. Az NBS domén konzervatív régióira tervezett degenerált primerekkel több növényfajból sikerült a rezisztencia génekhez kapcsolt ún **RGH, vagy**

más elnevezés szerint, RGA markereket találni. Nevezéktanuk alapján a továbbiakban, csak RGA megnevezést használunk.
Napjainkig különböző növényfajokban találtak RGA-kat: burgonya (Leister *et al.* 1998), *Solanum caripense* (Grube *et al.* 2000, Trognitz és Trognitz 2005), szója (Kanazin *et al.* 1996, Yu *et al.* 1996, Graham *et al.* 2002), *Arabidopsis thaliana* (Aarts *et al.* 1998), kukorica (Collins *et al.* 1998), búza, rízs, árpa és egyéb gabonafélék (Chen *et al.* 1998, Mago *et al.* 1999, Pan és Wendel 2001), citrus (Deng *et al.* 2000), kávé (Noir *et al.* 2001), káposzta (Vicente és King 2001), cukornád (Rossi *et al*. 2003), alma (van der Linden *et al.* 2003; Baldi *et al.* 2004).

Az azonosított szekvenciák egy részének térképezésre is sor került, mely bizonyította, hogy szoros kapcsolatban állnak az ismert rezisztenciagénekkel és **QTL-ekkel**: árpa (Meyers *et al.* 1999), borsó (Timmerman-Vaughan *et al.* 2000), repce (Fourmann *et al*. 2001), (Huettel et al., 2002; Rajesh *et al.* 2004); szója (Penuela *et al.* 2002), kukorica (Quint *et al.* 2003), szőlő (Di Gaspero és Cipriani 2003), cukorrépa (Hunger *et al.* 2003), *Pinus monticola* (Liu és Ekramoddoullah 2003), napraforgó (Radwan *et al.* 2004), kakaó (Clement *et al.* 2004), búza (Dilbirligi *et al.* 2004); *Avena strigosa* (Irigoyen *et al*, 2004), cirok és cukornád (McIntrye *et al.* 2005), görögdinnye (van Leeuwen *et al.* 2005), földimogyoró (Yuksel *et al.* 2005).

NBS-LRR típusú géneket nagy számban azonosítottak a különböző növényfajokban, pl. az *Arabidopsis thaliana* 149, míg az rízs 480 különböző NBS-LRR gént hordoz (Meyers *et al*. 2003; Yang *et al.* 2008). Szőlőben és nyárban 535 és 416 NBS kódoló gént azonosítottak (Yang *et al.* 2008), ebből 459 valamint 330 NBS-LRR kódoló gén volt. A fennmaradó 76, illetve 86 gén nem tartalmazott LRR doméneket. Újabban 330 NBS kódoló gént detektáltak a *Medicago truncatula* genom részleges (58%-os) szekvenálása során (Amelie-Torregrosa *et al.* 2008).

Rezisztenciagénekhez szorosan kapcsolt molekuláris markereknek nagy jelentőségük van a kutatásban és a gyakorlatban egyaránt. Segítségükkel, pl. korai szelekció végezhető egy keresztezési populációban a rezisztenciagén jelenlétére. Ez különösen fontos, mivel a betegség fogékonyságra illetve toleranciára/rezisztenciára irányuló fenotípusos értékelés sokkal később és általában nehezen végezhető el. A tartós rezisztencia kialakítása, a rezisztenciagének piramidálása, a fő géneken kívül kisebb

hatású gének bevitelének bizonyítása, megbízható molekuláris markerek nélkül nehézségekbe ütközik.

Alma esetében is terveztek már degenerált primereket konzervatív régiókra. Az NBS régió P-loop, kinase-2 és GLPL motívumaira sikerült 30 alma RGA-t klónozni és jellemezni (Baldi *et al.* 2004). A ’Fiesta’ és ’Discovery’ fajták és kapcsoltsági térképek, és a konzervált régiókra tervezett 27 primer pár felhasználásával összesen 18 RGA térkép pozícióját sikerült is meghatározták. Calenge *et al.* (2005) módosított megközelítést (nucleotide-binding profilozás) alkalmaztak az RGA-k detektálásához. Olyan adapter primert használtak, mely az NBS kódoló régiójához kötődik. Az NBS-hez kapcsolódó markerek alkalmazása számos fajta esetében lehetővé tette a polimorf markerek kifejlesztését (Van der Linden *et al.* 2004). ’Discovery’ x ’TN10-8’ utódaiból 3 enzim/primer kombinációjának tesztelése során 52 polimorf marker alkalmazása során 43 primert sikerrel térképeztek (Lee *et al.* 2003). A polimorf mintázatok szekvenálását követően, 23 szekvencia mutatott homológiát a már ismert R génekkel illetve RGA-val. A további elemzésük rávilágított arra, hogy a 23 szekvencia az NBS domén régióból származik, amely azért is nagyon fontos, mivel a szekvencia adatbázisokban fellelhető RGA legnagyobb része NBS eredetű. A térképezés során a legtöbb marker klaszterekbe tömörült, a már azonosított lisztharmat és varasodás elleni rezisztencia gének köré csoportosulva.

2.1.2.1. Alma lisztharmat (Podosphaera leucotricha)

A lisztharmat az egyik legveszélyesebb alma betegség. Több mint 20 peszticid van alkalmazásban az Európai kereskedelmi fajták esetében, a varasodás és lisztharmat betegség megelőzésére (Mac Hardy 1996). A fertőzött növényi részeken kialakuló „lisztes” bevonatot nevezzük lisztharmatnak, ami a gomba konídium-tartóinak és azokon lefűződő konídiumoknak a tömege. Annak ellenére, hogy a lisztharmat gombák faj specifikusak, a tüneteik a legtöbb növényen hasonlók. Egy gombafaj csak egy gazdanövényt vagy rokonfajait képes megfertőzni, mint például az alma lisztharmat kórokozója (*Podosphaera leucotricha*) az almán kívül nagyon ritkán a körtén, birsen és a naspolyán fordulhat elő.

Aderhold (1902) már a 20. század elején megfigyeléseket végzett a lisztharmat elleni valamilyen fokú rezisztenciát biztosító fajtákkal. A rezisztens fajták és klónok előállítása fontos célja volt a klasszikus nemesítési programoknak a 20. században (Kovács 1984, Laurens 1999). A lisztharmat elleni rezisztencia kialakítására két fő forrást használtak. A poligénikus rezisztencia a *Malus x domestica*-ból, monogenikus rezisztencia pedig a vad *Malus* fajokból, illetve dísz *Malus* típusokból származik. A *Malus robust Pl-1* és a *Malus zumi Pl-2* voltak az első képviselői ezeknek a géneknek, (Knight és Alston 1968). Ezeket követték a ’White Angel’-ből származó *Pl-w* (Gallott *et al.* 1985; Simon és Weeden 1991), a ‘D12’-ből származó *Pl-d* (Visser és Verhaegh 1976, 1980; James *et al.* 2004) MIS származó *Pl-m* (Dayton 1977) gének.

A rezisztencia kialakításhoz, **kapcsolt molekuláris markerek** kifejlesztése jelenti a legracionálisabb utat, mely lehetőséget nyújt számunkra, hogy a szóban forgó rezisztencia gének jelenlétét folyamatosan tesztelhessük a nemesítés során. A fontosabb lisztharmat rezisztencia gének esetében a molekuláris markerek már rendelkezésre állnak: *Pl-1* (Markussen *et al.* 1995; Dunemann *et al.* 2007), *Pl-2* (Seglias és Gessler 1997; Dunemann *et al.* 1999; Gardiner *et al.* 1999; Caffier és Laurens 2005; Caffier és Parisi 2007), *Pl-m* (Gardiner *et al.* 2002), *Pl-w* (Evans és James 2003), *Pl-d* (James *et al.* 2004; James és Evans 2004) (**2. táblázat**). Eddigi tudásunk alapján *Pl-m* és *Pl-2* gének egymással kapcsoltak, amely kapcsoltság akár allélikus is lehet (Gardiner *et al.* 2003). Napjainkig több gént használtak fel almában, melyek azonban később már nem biztosították a rezisztenciát, ilyenek voltak például lisztharmat esetében, a *Pl-m* (Lespinasse 1983) és a *Pl2* gének (Caffier és Laurens 2005, Vaffier és Parisi 2007). A molekuláris markerek kifejlesztésének első lépése azoknak a géneknek (QTL) az azonosítása és térképezése, melyek részt vesznek a rezisztencia kialakításában. Ezt követően lehet azokat felhasználni különböző célokból, mind szántóföldi, mind faiskolai utódokon. (Stankiewicz-Kozyl *et al.* 2005).

Két nagy Európai projekt az EAGMAP (King *et al.* 1991) és a DARE (Lespinasse *et al.* 2000) foglalkozott az alma genotipizálásával, melyekben a lisztharmat rezisztencia genetikai hátterét is vizsgálták. Az elmúlt tíz évben számos rezisztencia gén került térképezésre annak érdekében, hogy könnyebbé tegye MAS használatát, megbízható és többszörös rezisztencia kialakítása során (Gardiner *et al.* 2007, Bus *et al.* 2010).

Az íze és zamata miatt közkedvelt ’Jonathan’ alapfajta olyan fogékony a lisztharmatra, hogy 10-14 naponta permetezésre van szüksége. A fertőzésre különösen fogékony még a ’Parker pepin’ és az ’Idared’ is. Lisztharmatra való érzékenysége miatt a ’Cox narancs renet’ és a ’Gravensteini piros’ fajta már teljesen eltűnt a kereskedelmi forgalomból.

2. Táblázat: Lisztharmat rezisztenciához kapcsolt molekuláris markerek

Rezisztencia lókusz, **Kromoszóma (LG)**	**Forrás**	**Marker típus**	**Hivatkozás**
Lókusz: *Pl-1*; **LG12**	Idared x 78/18-4	CAPS	Lesemann and Dunemann 2006
Lókusz: *Pl-2*; **LG11**	Royal Gala X A689-24	RAPD-SCAR	Gardiner *et al.* 2003
Lókusz: *Pl-d*; **LG12**	Fiesta x A871-14	SSR	James *et al* 2004
Lókusz: *Pl-m*	Fuji X MISop 93.051 G02-054	SCAR	Gardiner *et al* 2003
Lókusz: *Pl-w*; **LG8**	White Angel; Prima X Fiesta	Izoenzim	Batlle and Alston 1996
Lókusz: *Pl-w*; **LG8**	D12 x White Angel	SSR, SCAR	Evans and James 2003
A679-2 térképen: **LG3, 5, 16** Iduna térképen: **LG2, 3, 5, 7, 8, 9**	Iduna X A679-2	SSR	Kellerhals *et al.* 2000
U211 térképen: **LG2, LG3, LG4** Idared térképen: **LG3**	Idared x U211	AFLP, SSR	Stankiewicz-Kosyl *et al.* 2005
LG1, 2, 8, 10, 14, 17	Discovery x TN10-8	AFLP, SSR	Calenge and Durel 2006

2.1.2.2. Alma ventúriás varasodás (Venturia inaequalis)

A rezisztencia szempontjából legjobban tanulmányozott betegség az almában a varasodás, amelyet a *Venturiaceae* családba tartozó *Venturia inaequalis* patogén gomba okoz. A kórokozó nemcsak a leveleket, hanem a gyümölcsöt is megtámadja. A kártétel nyomán, a levélen először 5-10 mm átmérőjű, kerek, halványzöld, a levél színe felé kidomborodó foltok mutatkoznak, majd a foltokon barna, bársonyos konídiumtartó

„gyep” tör elő. A levélfolt szürkésbarna színű lesz, majd elhal. A fiatal gyümölcsön először apró, majd a gyümölcs fejlődésével, méretében egyre növekvő sötétbarna foltok láthatók. Később a foltok elparásodnak, varasak lesznek. A gyümölcs féloldalassá válik, enyhén berepedezik.

Az almafa-varasodással szemben rezisztens fajták előállítása több évtizedes múltra tekint vissza. Az első varasodás-rezisztens fajták előállítását célzó kísérletek már a 20. század elején elkezdődtek (Aderhold 1902). Az USA-ban ez a munka az 1920-as években kezdődött, a ’*Malus floribunda* 821’ × ’Rome Beauty’ keresztezéssel. Hough (1944), illetve Hough és Shay (1952) kísérletei bizonyították, hogy a *Malus* fajok a varasodással szembeni rezisztencia hordozói. Ezeknek a fajoknak génjeit használták fel a klasszikus keresztezésekre alapozott nemesítésnél.

A jelenleg termesztett varasodás rezisztens fajták előállítása során forrásként a legnagyobb arányban a *M. floribunda* 821-et (*Vf*) klónt használják (Crosby *et al.* 1992). A varasodás rezisztens fajták első generációja 1970-1981 között jelent meg a köztermesztésben (USA, Kanada, Franciaország, Németország, Románia, korábbi Csehszlovákia). A ’Prima’, ’Priam’, ’Querina’ (’Florina’), ’Freedom’, ’Liberty’, ’Macfree’, ’Priscilla’, ’Nova Easygro’, ’Redfree’, ’Jonafree’, ’Gavin’, ’Sir Prize’ fajták és társaik először nagy reményt keltettek a termesztők körében. Hamarosan azonban kiderült, hogy a rossz szállíthatóság (pl. ’Sir Prize’), a kisméretű gyümölcsök (pl. ’Priam’), a rossz tárolhatóság (pl. ’Prima’), a lisztesedő, kásásodó gyümölcsök (pl. ’Priscilla’), a gyümölcsfarákra, a fitoftórás kéregrothadásra való érzékenység (pl. ’Prima’, ’Priscilla’, ’Priam’, ’Sir Prize’) miatt, tartós sikerre ezek a fajták nem számíthattak, és nem vehették fel a piaci versenyt a hagyományos, kiváló minőségű fajtákkal (Silbereisen, 1985; Palara *et al.* 1987).

Kisebb-nagyobb poligénes varasodás rezisztenciával sok régi fajta is rendelkezik. A rezisztenciájuk azonban nem stabil, mert nem minden helyen és feltétel között biztosítja az ellenállóságot. Ez attól is függ, hogy a kórokozó melyik rassza van jelen. A poligénikus rezisztenciájú fajták közül az Antonovkát találták leginkább megbízhatónak (Brown 1975; Virscek-Marn *et al*, 1994). Bár Silbereisen (1985) azt is megjegyzi, hogy az ’Antonovka’ azért alkalmatlan rezisztenciaforrásként, mert a kedvezőtlen gyümölcstulajdonságait is örökíti.

A varasodással szemben stabilan rezisztens és kiváló termesztési – valamint kereskedelmi tulajdonságokkal rendelkező fajták nemesítőire még komoly feladatok várnak. Ezt támasztják alá azok az újabb eredmények, amelyek mind a rezisztencia tartósságával, mind a gyümölcsminőség javításával kapcsolatosak. Előtérbe került a kórokozó különböző rasszainak problémája is. Chevalier és Lespinasse (1991) arról számolt be, hogy a *Vm*-rezisztencia kevésnek bizonyult a kórokozó újabb rassza ellen, és a *Vf*-rezisztencia, amelyet a *M. micromalus* szolgáltat, a kórokozó 5. rassza ellen nem volt hatásos. Az előbbi szerzők elsőként vizsgálták, hogy sejttani, szövettani szempontból milyen összefüggés van a növényi válasz és a kórokozó különféle rasszai között.

Lespinasse *et al.* (1979) korábban felhívta a figyelmet arra, hogy a V_f génen alapuló rezisztencia is bármikor megszűnhet, a kórokozó alkalmazkodása következtében. Brown (1975) ezért is utalt arra, hogy célszerű lenne a monogénes és poligénes rezisztencia kombinálása az utódokban. Az újabb eredmények ezt az igényt megerősítik. Fischer *et al.* (1994) úgy találta, hogy a *Malus floribunda* rezisztens utódainak egy részénél később következett be a rezisztencia mértékének csökkenése. A legtartósabb rezisztenciát a *Vf* + *Vr*; *Vf* + *Va*; *Vr* + *Va* gének kombinációja adta a keresztezések során.

A kórokozó Moldáviában azonosított egyik rassza esetében bizonyították, hogy a köztudottan stabil rezisztenciájú ’Prima’ fajtát is képes fertőzni. A kórokozó rasszainak száma a jövőben várhatóan nőni fog, abban az esetben, ha az ültetvényekben kizárólag varasodás rezisztens fajtákat fognak telepíteni.

Az újabb nemesítési programoktól a tartósan varasodás rezisztens és egyben kiváló áruértékű almafajták megjelenése várható (Fischer 1994; Janse *et al.* 1994).

A rezisztencia kialakításában **jelenleg 16 fő gént azonosítottak napjainkig**, (Williams és Kuc 1969, Lespinasse 1989, Bénaouf és Parisi 2000, Durel *et al.* 2000, Hemmat *et al.* 2002, Patocchi *et al.* 2003, Tartarini *et al.* 2003, Gessler *et al.* 2006, Bus *et al.* 2009, Patocchi *et al.* 2009, Soriano *et al.* 2009). Az első főbb varasodás-rezisztencia géneket a kis gyümölcsű ázsiai *M. Floribunda* 821 (*Vf*), *M. pumila* R12740-7A (*Vr*, *Vh2*, *Vh4*), *M. baccata jackii* (*Vbj*), *Hansen’s baccata* #2’ (*Vb*), Pl172623 (*Va*), *M. micromalus* 245-38 (*Vm*) valamint a *M. astrosanguinea* 804 (*Vm*) fajtákban találták meg (Williams

és Kuc 1969; Lespinasse *et al.* 1989). További rezisztencia gén források közé sorolhatók a *'Golden Delicious'* (*Vg*), *GMAL 2473* (*Vr2*), *'Durello di Forli'* (*Vd*) valamint, a *M. sylvestris W193B* (*Vh8*) fajták (Durel *et al*. 2000, Tartarini *et al.* 2003; Patocchi *et al.* 2004; Bus *et al.* 2004, 2005a, 2005b) (**3. táblázat**).

3. Táblázat: Varasodás rezisztenciához kapcsolt molekuláris markerek

Rezisztencia lókusz, **Kromoszóma (LG)**	**Forrás**	**Marker típus**	**Hivatkozás**
Lókusz: Va; **LG1**	Antonovka PI172623, Fortune x PRI 1841-11; NY489 x PRI 1841-11	RAPD, SCAR	Hemmat *et al*. 2003
Lókusz: Vb; **LG1**	Hansen's Baccata #2; Empiere x Hansen's Baccata #2	RAPD, SCAR	Hemmat *et al*. 2003
Lókusz: Vb; **LG12**	Golden Delicious x Hansens baccata#2	SSR	Erdin *et al.* 2006
Lókusz: Vd; **LG10**	Durello di Forli x Fiesta	RAPD	Tartarini *et al.* 2004
Lókusz: Vbj; **LG2**	*Malus baccata jackii*; A722-7 x Golden Delicious	SCAR	Gygax *et al*. 2004
Lókusz: Vd; **LG10**	Durello di Forli	RAPD	Tartarini *et al.* 2004
Lókusz: Vf; **LG1**	Markers tested in Florina x Nova Easygro progenyand 55 cultivars or selections	SSR	Vinatzer *et al.* 2004
Lókusz: Vfh	M. floribunda 821		Bénaouf és Parisi 2000
Lókusz: Vg; **LG12**	Golden Delicious; Prima x Fiesta	RFLP	Durel *et al*. 2000
Lókusz: Vh8; **LG2**	*Malus sieversii* W193B; Royal Gala x M. SieversiiW193B	SCAR, SSR	Bus *et al*. 2005
Lókusz: Vj	Jonsib		Korban and Chen 1992
Lókusz: Vm; **LG17**	*Malus micromalus*; Golden Delicious x Murray	SSR	Patocchi *et al.* 2005
Lókusz: Vh2	Russian apple R12740-7A; Royal Gala x TSR34T15	RAPD	Bus *et al*. 2005
Lókusz: Vh2, **LG2**	Royal Gala x TSR34T15	SSR, RAPD	Bus *et al*. 2005
Lókusz: Vr2,	Russian apple	AFLP	Patocchi *et al.* 2004

LG2	R12740-7A; GMAL 2473 x Idared		
Lókusz: Vh4, **LG2**	Russian apple R12740-7A; Royal Gala x TSR33T239	SCAR	Bus *et al.* 2005
Lókusz: VT57	Sciglo x A68R03T057	SSR	Bus *et al.* 2005b
Lókusz: **LG1, LG11, LG15**	Prima x Fiesta	RAPD, SSR, RFLP, SSR	Durel *et al.* 2003
Levél varasodás: LG6, 7, 10, 11, 12, 17 Gyümölcs varasodás: LG15, 17	Fiesta x Discovery	SSR	Liebhard *et al.* 2003b
LG2, 5, 12, 13, 15, 17	Discovery x TN10-8	SSR, AFLP, Vg lókusz	Calenge *et al.* 2004

A fogékony ’Gala’ fajta esetében sikerült bizonyítani, hogy a napjainkig egyedüliként klónozott *HcrVf2* gén alkalmas varasodás elleni rezisztencia kialakítására (Baldi *et al.* 2004). Az LG 2-n fellelhető *Vr2* fő varasodás rezisztencia gén számos NBS markerrel koszegregált. Az LG 10 esetében 4 NBS markert térképeztek közel a *Vd* putatív pozíciójához (Lee *et al.* 2003). SCAR markerré, amellyel a markerhez kapcsolt szelekció a legkönnyebben végezhető, azonban még egy RGA-t sem alakítottak át.

Amennyiben a rezisztencia génekből csak egyet építünk be az új fajtába, valószínűleg nem érünk el hosszú távú rezisztenciát, mert a várhatóan megjelenő új rasszok „letörik” az ellenálló képességet. Ez az eset történt a *Vf* rezisztenciával (Parisi *et al.* 1993), valamint egyéb rezisztencia gének esetében is (MacHardy *et al.* 1996; Koch *et al.* 2000). A tartós rezisztencia elérése szempontjából az jelenthetne megoldást, ha egyszerre több rezisztencia gén forrást vonnának be a nemesítésbe (piramidálás). Olyan fajták kiválasztása szükséges, melyek különböző rezisztenciagénekkel rendelkeznek. Ezeknek a kiválasztásához és sikeres felhasználásához nyújthatnak kiváló segítséget a rezisztencia génekhez bizonyítottan kapcsolt molekuláris markerek. Az előzőkben ismertetett varasodás rezisztencia gének esetében – a *Vr* gén kivételével – már ismertek ilyen molekuláris markerek.

A *Vb* rezisztencia génhez kapcsolt marker a RAPD-B220$_{700}$ volt (Hemmat *et al.* 2003). A *Vb* gén az 1-es kapcsoltsági csoportba tartozik, a *Vf* génnel együtt (Maliepaard et al. 1998). Erdin *et al.* (2006) GSE (Genome Scanning Approach) megközelítést alkalmaztak 47 SSR markerrel ’Golden Delicious’ és *’Hansen’s baccata #2’*

szülőfajokon. Két SSR markert (Hi02d05 és Hi07f01) alkalmasnak találtak a *Vb* térkép pozíciójának meghatározásához. Kísérleteik rámutattak arra, hogy a *Vb* gén független a *Vf*-től (Dayton és Williams 1968). Ezt a markerezési eljárást sikeresen alkalmazták a *Vr2* és a *Vm* rezisztencia gének térképezésénél is (Patocchi *et al.* 2004, 2005).

Napjainkig összesen öt varasodás rezisztencia lókuszt (Vh2 és Vh4 (Bus *et al.* 2005a), Vr2 (Patocchi *et al.* 2004), Vh8 (Bus *et al.* 2005b), Vbj (Gygax *et al.* 2004) térképeztek az LG2-n (Calenge *et al.* 2004).
Patocchi *et al.* (1999) 2071 egyedet vizsgálva megállapította, hogy a *Vf* R gén, az LG1 pozícióban található két marker között (M18 és AM19), 0,9cM távolságra. Ez közvetve hozzájárult a napjainkig egyedüli klónozott alma R gén (HcrVf2) felfedezéséhez is (Belfanti *et al.* 2004, Malnoy *et al.* 2008).

A ’Starking’ fajtakör nagyon fogékony a betegségre, hasonlóan a ’Jonagold’ és a ’Gala’ fajtákhoz. A ’Jonafree’, ’Redfree’, ’Priscilla’, ’Liberty’, ’Britegold’, ’Trent’, ’Priscilla’ a rezisztens fajták közé sorolandóak, azonban sajnos egyikük sem tekinthető fő kereskedelmi fajtának.

2.1.2.3. Alma tűzelhalás (Erwinia amylovora) rezisztencia

A kórokozó az *Erwinia amylovora* baktérium, az almatermésű gyümölcsfák mellett több dísz és vadfajt is képes megfertőzni. Ez a betegség veszélyessége miatt, a zárlat elrendelését igénylő kórokozók közé tartozik, ezért a hatályos jogszabályok alapján a földhasználónak vagy termelőnek a betegség megjelenését vagy annak gyanúját haladéktalanul jelenteni kell az illetékes növény- és talajvédelmi szolgálatnak. Mivel ez a baktérium az intenzív védekezés ellenére terjed, károsításával minden évben számolni lehet.

Az *Erwinia amylovora* (baktériumos virág- és hajtásszáradás) által okozott betegség elleni védekezés nagyon nehéz és drága, ezért igen fontos a rezisztens fajták termesztésbe vonása olyan termőhelyeken, ahol a kórokozó megjelenésére számítani lehet. Brown (1975) szerint nincs teljesen immunis fajta, és a *Malus* nemzetségben sincs rezisztenciaforrás. Eltérés lehet a fajták között a kórokozó behatolásának gyorsaságára

nézve, mely szempontból a fajták poligénes meghatározottságot mutatnak. A fertőzés tünetei először virágzás idején jelentkeznek, a virágok megbarnulnak, majd megfeketednek, de nem hullnak le. Hajtásfertőzés esetén a fiatal hajtásvégek pásztorbotszerűen meggörbülnek, a levelek megbarnulnak, de a hajtásokon maradnak. A gyümölcsökön fonnyadás, barnulás, feketedés figyelhető meg, és a mumifikálódott termések az ágon maradnak. A fogékony növényi rész a mechanikai sérüléseken, vagy a rovarok okozta sebzéseken kívül, a természetes nyílásokon (pl. légzőnyílások) keresztül is megfertőződhet.

Napjainkig számos heterológ gén (tehát nem *Malus*-ból származó gének) felhasználásával próbálkoztak abból a célból, hogy tűzelhalás rezisztens fajtákat állítsanak elő (Gessler és Patocchi 2006). A tűzelhalás esetében is bebizonyosodott, hogy rezisztencia kialakítását kvantitatív bélyegként kell felfogni, mind a vad fajok, mind a termesztésben lévő *Malus* és *Pyrus* fajták felhasználása esetén (Brisset et al. 2002; Dondini *et al.* 2004; Durel *et al.* 2004). Rezisztenciához kapcsolt QTL-eket mind körtében (Dondini *et al.* 2004), mind almában (Calenge *et al.* 2005; Khan *et al.* 2006) azonosították. További QTL-ekről számoltak be a vad *Malus* fajokban (*Malus robusta* 5, *Malus* ‘Evereste’) (Peil *et al.* 2007).

Calenge *et al.* (2005) olyan tűzelhalás rezisztenciához kapcsolt QTL-eket azonosított, melyekkel a fenotípusos változások 34,3-46,6%-a magyarázható volt. Ez a QTL a 7-es kapcsoltsági csoportba tartozott a ’Fiesta’ fajtában, s a kísérlet során két ismétlésben is azonos pozíciót mutatott ’Fiesta’ x ’Discovery’ illetve ’Prima’ x ’Fiesta’ keresztezések esetében is. Négy kisebb hatású QTL-t is meghatároztak a ’Fiesta’ 3-as kapcsoltsági csoporton belül, valamint egy másikat – szintén a 3-as csoporton belül – a ’Prima’ fajtában. További két QTL-t azonosítottak a ’Discovery’ fajtában a 12-es és 13-as kapcsoltsági csoportokon. A térképezés során bizonyították, hogy az F7-es QTL pozíciója egy ismert RAPD primertől (GE80-19-0550) 1 és 6 cM-en belül van. Az ismert RAPD primerhez legközelebbi SSR marker a CH04e05, mely 25 cM-re található a ’Prima’ x ’Fiesta’ keresztezésben valamint 31 cM-re az ’Fiesta’ x ’Discovery’ keresztezésben. Khan *et al.* (2007) a ’Fiestában’ és további toleráns ’Florina’ és ’Nova Easygro’ fajtákban vizsgált QTL-ek két oldalára markereket terveztek (AE 10-375 és GE-8019), melyek alkalmazhatóságát már utódnemzedékekben is sikeresnek találták.

A tűzelhalásra napjainkig még nem sikerül fő rezisztencia gént azonosítani, bár Peil *et al.* (2007) feltételezik, hogy a *Malus X robusta* 5, 3-mas kromoszómáján megtalálható az egyik fő gén (**4. táblázat**).

4. Táblázat: Tűzelhalás rezisztenciához kapcsolt, térképezett molekuláris markerek

QTL, kromoszóma pozíció (LG)	Forrás	Marker típus	Hivatkozás
LG7F	Prima x Fiesta Fiesta x Discovery	RAPD	Calenge *et al.* 2005
LG3P	Prima x Fiesta	SSR	Calenge *et al.* 2005
LG3F	Fiesta x Discovery	AFLP	Calenge *et al.* 2005
LGD12	Fiesta x Discovery	SSR	Calenge *et al.* 2005
LG13D	Fiesta x Discovery	AFLP	Calenge *et al.* 2005
LG7F	Fiesta x Discovery	AFLP	Khan *et al.* 2006
LG3R	Idared X *Malus robusta*	SSR	Peil *et al.* 2007
LG7F CH03e03-hoz csatlakozó	Idared X *Malus robusta*	SSR	Peil *et al.* 2007
LG3R CH03e07-hoz csatlakozó	IdaRed X *Malus robusta*	SSR	Peil *et al.* 2007
LG7	Milwa x 1217	SCAR	Khan *et al.* 2007
LG7F	Milwa x 1217	SCAR	Khan *et al.* 2007
LG7F	Milwa x 1217	SSR	Khan *et al.* 2007

Napjainkra új fajtákat állítottak elő hagyományos nemesítési eljárásokkal és szelekcióval (Kellerhals és Christen 2006, Kellerhals *et al.* 2007).

A kórokozóval szembeni rezisztenciagénjeit a *M. floribunda* és néhány fajta (’Clivia’, ’Golden Delicious’, ’Alkmena’) hordozza (Fischer, 1994). Rezisztens fajtának tekinthetőek a ’McIntosh’, ’Discovery’, míg fogékony fajtának a ’Jonathan’, ’Rome’, ’Granny Smith’ tekinthetőek.

2.2. Almafajták molekuláris vizsgálata

2.2.1. Almafajták vizsgálata mikroszatellit markerekkel

Eukarióta szervezetek, így a magasabbrendű növények genetikai állománya nagy mennyiségű repetitív DNS szakaszt tartalmaz. Az ismétlődő elemek aránya, némely fajban akár a teljes genom 80-90%-át is elérheti. Az ismétlődő elemek elhelyezkedése a genomban lehet szétszórt, illetve tandem, valamint ezek kombinációja.

A tandem elrendezésű ismétlődések közé tartoznak a szatellit DNS-ek, a riboszómális RNS gének, a telometrikus ismétlődések, valamint a mini- és mikroszatellit DNS-ek. A **mikroszatellitek** 1-5 nukleotidnyi méretűek és tandem ismétlődésként általában a genom heterokromatikus, intergénikus régióiban elszórtan helyezkednek el. Egyszerű ismétlődő szekvenciák *Simple Sequence Repeats* rövidítéseként SSR-nek is nevezik.

A tandem-ismétlődő szekvenciák előtt és után konzervatív DNS szakaszok találhatók, melyekre primert tervezve, a közöttük elhelyezkedő mikroszatellit szekvencia felszaporítható. A polimorf mikroszatellitek detektálásának módszerét először 1989-ben írták le (Weber és May 1989).

Az SSR markerek kifejlesztésének több módja van. A legalapvetőbb lehetőség DNS klóntár létrehozása, majd hibridizáció különböző próbákkal az ismétlődésekre (Merdinoglu *et al.* 2005). A növényekben leggyakoribbak a dinukleotid ismétlődések például az (AT)/(TA), (AG)/(CT) vagy a (AC)/(GT) (Lagercrantz *et al.* 1993, Thomas és Scott 1993, Wang *et al.* 1994). További lehetőségeket jelent pl. az EST szekvenciákra tervezni SSR primereket (Scott *et al.* 2000), valamint más fajokban kifejlesztett és eredményesen alkalmazott mikroszatellit markerek felhasználása (Agrawal *et al.* 2006).

A mikroszatellitekre alapozott SSR markerek, vagy mikroszatellit markerek széleskörű alkalmazásukat annak köszönhetik, hogy a rövid tandem-ismétlődő szekvenciákból álló motívumok gyakori előfordulásúak, egyenletesen oszlanak el a genomban, génkölcsönhatások nem befolyásolják, hipervariábilisak és Mendeli kodomináns

öröklődést mutatnak. Az eredmények különböző laborok között pontosan reprodukálhatók, valamint a markerezési folyamat könnyen kezelhető. Pozitív tulajdonságai miatt polimorfizmus kimutatására, fajtaazonosításra és térképezésre kifejezetten alkalmasak (Kiss *et al.* 1999). A technika jól alkalmazható taxonómiai vizsgálatok, vagy fajtaazonosítás céljára, de kodominanciája és a nagyfokú polimorfizmusa miatt kapcsoltsági térképek készítéséhez is eredményesen használhatók.

A mikroszatellit primereket növényekben elsőként Weising *et al.* (1991) és Beyermann *et al.* (1992) alkalmazták különböző fajták és vonalak megkülönböztetésére. Az elmúlt másfél évtizedben a mikroszatellit markerek különböző célból felhasználásra kerültek szinte az összes gazdasági szempontból fontos növényfajnál: pl. napraforgó (Senior *et al.* 1996; Cregan *et al.* 1999), kukorica (*Zea mays*), uborka (Fazio *et al.* 2002), rózsafélék (Pedryc *et al.* 2002), tök (Paris *et al.* 2003), búza (Shen et al. 2005) és *Brassica* (Soengas *et al.* 2006), szója (Mimura *et al.* 2007), valamint görögdinnye (Kohpayegani *et al.* 2008), körte (Volk *et al.* 2006; Brini *et al.* 2008).

2.2.2. Almafajták vizsgálata SSR markerekkel

Mikroszatellit primereket almában először 1997-ben alkalmazták (Guilford *et al.* 1997) olyan DNS klóntárak tesztelésekor, melyekben GA- és GT ismétlődéseket kerestek. Összesen 14 SSR primert sikerült kifejleszteni, melyből 4 használata komplex mintázatot eredményezett, bizonyítva, hogy több lókuszról is felszaporodhat mikroszatellit régió. További 10 „single locus” primer alkalmazásával bizonyították, hogy a mikroszatellit primerek a különböző genotípusok azonosítására almában is sikerrel használhatók. Kísérleteikben már 3 marker is elegendőnek bizonyult a vizsgált 21 almafajta elkülönítésére (Guilford *et al.* 1997).

Ezt követően Hokanson *et al*. (1998) sikerrel tesztelt nyolc új SSR primert, 66 tételből álló alma génbank gyűjteményen. A primerek átlagosan lókuszonként 12,1 allélt szaporítottak fel, az átlagos heterozigozitási értékük (He) pedig 0,693 volt. A nyolc SSR marker alkalmasnak bizonyult számos fajta és fajtakör elkülönítésére, azonban az egyes fajtakörökön belül rügymutánsokat, mint például: ’Marshall McIntosh’, ’Kimball McIntosh’, ’Wijcik McIntosh’, / ’Delicious’, ’Redspur Delicious’, / ’Jonathan’, ’Smith Jonathan’ a markerek alkalmazásával nem tudták megkülönböztetni.

Ugyanebben az évben a ’Florina’ fajtából készítettek genomi könyvtárat, melyet hibridizációs próbával teszteltek az (AG)/(TC) repetitív szekvenciák azonosítása céljából. A tervezett SSR primerek közül 16 esetében kaptak ismételhető eredményeket, 19 fajta vizsgálatakor, melyek átlagosan 8,2 allélt szaporítottak fel, valamint He: 0,78 volt. Mindössze két kiválasztott primer segítségével sikerült elkülöníteniük a 19 almafajtát, valamint egy másik fajból származó (*M. floribunda*) fajtát, két fajta (’Red Delicious’ és ’Starking’) rügymutánsainak kivételével (Gianfranceschi *et al.* 1998).

Hemmat *et al.* (1998) (GA) n és (GT) n ismétlődésekre terveztek SSR primereket, melyek közül összesen 30 SSR primer párt vizsgáltak meg és térképeztek. A primerek tesztelését, négy különböző laboratóriumban végezték, és azonos eredményeket kaptak. A primerek segítségével a ’White Angel’ interspecifikus hibrid almafajta LG6-án azonosítottak egy idegen kromoszóma szegmenst, melyből arra következtettek, hogy az ázsiai *Malus* fajok kromoszóma-átrendeződéseket hordozhatnak. Ebből a 30-as SSR primer sorból több, sikerrel volt felhasználható körtében is. Ezekkel az SSR markerekkel azonban még nem volt lehetséges a genetikai térképezés, és az egyes kapcsoltsági csoportok azonosítása.

A következő években összesen 140 újonnan kifejlesztett SSR primerről számoltak be, melyekkel sikeresen oldották meg a fenti problémákat (Liebhard *et al.* 2002). A primereket ugyan csak nyolc genotípuson tesztelték, azonban ’Fiesta’ x ’Discovery’ térképezési populáción a 140 SSR markerből 115-nek sikerült a pozícióját meghatározni. A kifejlesztett markerekkel lehetővé vált az alma 17 kapcsoltsági csoportjának azonosítása. Irodalmi (RAPD és SSR markerekkel), valamint saját eredményeik felhasználásával sikeresen elkészítették az alma első, ugyan még kisfelbontású, molekuláris marker térképét. Későbbiekben sikerült ezt tovább javítani, további 840 molekuláris marker (475 AFLP, 235 RAPD, 129 SSR, 1 SCAR) térképezésével (Liebhard *et al.* 2003).

2006-ban újabb 148 SSR primer sikeres térképezéséről számoltak be, melyek közül 117-et genomiális könyvtárból GA, GT, AAG, AAC, ATC ismétlődésekre, további 31-et pedig EST szekvenciákra alapozva terveztek és állítottak elő (Silfverberg-Dilworth *et al.* 2006). Ezek a markerek, számos más SSR marker mellett (pl. a Liebhard *et al.* 2002,

2003 által készített CH-SSR sorozat), megtalálhatók a http://www.hidras.unimi.it címen, a HiDRAS SSR adatbázisában.

Japánban alma alanyok DNS-ujjlenyomatát készítették el 7 mikroszatellit primerrel. Mindegyik lókuszon kapott 1 vagy 2 fragmentum elegendő polimorfizmust adott az alanyok megkülönböztetéséhez, továbbá az ismert leszármazási kapcsolatokat is alátámasztották (Oraguzie *et al.* 2005).

Bassil *et al.* (2006) azonosításra és genetikai kapcsolatok feltárására használtak fel 11 SSR primert, különböző származású alma és körte genotípusoknál. A vizsgált fajták az Egyesült-Államokból, Portugáliából és az Azori-szigetekről származtak. Az SSR ujjlenyomatok segítségével elkülönített fajták mellett 5 szinonim-csoportot is azonosítottak, továbbá nem találtak egyezőséget a Portugál és az Azori-szigeteki fajták között. A 11 primerből 5-öt körtében fejlesztettek ki, de azok az alma esetében is jól működtek. A klaszter-analízissel az alma és körte fajták jól elkülöníthető két különálló csoportba kerültek.

A génáramlást vizsgálták abban a kísérletben, ahol megfigyelték, hogy egy egyed pollenje hogyan, és milyen távolságon belül képes a megtermékenyítésre. A *Malus sieversii var. Sieversii f. niedzwetzkyana* egyik – domináns piros elszíneződést, okozó gént hordozó – vonalát (TNR-31-35) használták fel, pollenadóként. A pollenforrástól különböző távolságokra ültetett 38 különböző *Malus domestica* fajta, pedig mint pollen befogadó szerepelt. A megtermékenyített fákról magot fogtak és a több mint 11 ezer magoncból – a pollenadó morfológiai bélyege, és SSR markerek segítségével – kiválasztották a pollenadótól származókat. Az SSR vizsgálat eredményei megegyeztek a szín marker által kapott eredményekkel (Reim *et al.* 2006).

Franciaországban 180 különböző helyen, megközelítőleg 20 ezer alma változatot tartanak fenn. Az INRA génmegőrzési programjának keretében molekuláris markerekkel próbálták a morfológiailag nehezen elkülöníthető – valamint szinonim fajtákat megkülönböztetni. Leibhard *et al.* (2002) által leírt 8 SSR marker alkalmazásával teszteltek 142 helyi francia genotípust. Ezekből – egyedi allélmintázatuk alapján – 122 fajtát képesek voltak megkülönböztetni, 7 csoportban azonban az

egyedeknek azonos SSR ujjlenyomatuk volt, ezért ezeket szinonimként azonosították (Laurens *et al.* 2004).

Az alkalmazott primerek felvételre kerültek az úgynevezett ’Európai standard SSR primer’ sorozatba, melyet az óta több laboratórium is felhasznált a helyi fajták elkülönítésére. A kísérletek célja az volt, hogy kiderítsék, melyek tekinthetők a különböző elnevezésű, de valójában azonos – tehát szinonim – fajtáknak. Az olaszországi Campaniai alma génbankból származó 56 genotípust, az említett 8 SSR primer párral (Guarino *et al.* 2006) tesztelve, 27 tételt szinonimnak találtak. Svédországban 68 svéd almafajtát sikeresen elkülönítettek egymástól, bár az SSR alapú UPGMA dendrogrammal nem tudtak egyértelmű svéd almafajta csoportokat azonosítani (Garkava-Gustavsson *et al.* 2008). Ezzel szemben Pereira-Lorenzo *et al.* (2008) 77 spanyol és 26 kereskedelmi fajta vizsgálata során sikerrel különíti el a galíciai, La Palmai fajtákat az asztúriai genotípusoktól.

A legjelentősebb kereskedelmi almafajtákat hazánkban is sikerült elkülöníteni a korábban már leírt 6 SSR primerrel (Galli *et al.* 2005). Különböző magyar fajták szülővonalainak meghatározása is megtörtént SSR markerek alkalmazásával (Király *et al.* 2009).

2.3. Rügymutánsok vizsgálata molekuláris markerekkel

A legtöbb világfajta, mint például a ‘Delicious’, ‘Jonathan’, ‘Gala’, ’Elstar’, ‘Idared’, ‘Golden’, stb számos úgynevezett rügymutánsokkal rendelkezik. Ezek a mutánsok (klónok) általában valamilyen fenotípusos bélyegben pl. gyümölcs színében, fa méretben valamint elágazási hajlamukban különböznek a kiinduló fajtától, illetve egymástól. A fajtakörök klónjai végeredményben 1 vagy 2 bélyeg kivételével teljesen megegyeznek a szülőfajtával.

Rügymutánsok elkülönítésére is alkalmaztak a korábban leírt primerek közül 24 **SSR** primer párt, azonban egyik esetben sem sikerült a rügymutánsok között polimorfizmust találni (Venturi *et al.* 2006).

A rügymutációk kialakulásának genetikai háttere még nem teljesen tisztázott, de valószínűleg **retrotranszpozonok** állhatnak a mutációk kialakulásának hátterében. A retrotranszpozonok nagy kópia számban előforduló transzpozon elemek az eukarióták genomjában. Az eddigi kutatások bizonyították, hogy a retrotranszpozonok nem csak lokálisan, hanem az egész genomra kiterjedően is képesek mutációkat kiváltani (Sunako *et al.* 1999, Yao *et al.* 2001). Szőlőben például bizonyították, hogy a fehérbogyójú fajták pigmentációja színvesztéséért a *VvmybA1* génben bekövetkező retrotranszpozon indukálta mutációs hiba tehető felelőssé (Kobayashi *et al.* 2004). A rügymutánsok genetikai változásait a legtöbb esetben olyan hibás retrovírus eredetű ún. retrotranszpozonok okozzák, melyek még képesek RNS transzkriptumokból a reverz transzkriptáz enzim segítségével DNS-t szintetizálni, majd azt a genomba integrálni, de (már) nem képesek az adott beépülési helyről kivágódni.

A retrotranszpozon elemek gyakoriak a növényfajok genomjában is. Szekvenciájukat tekintve konzerválódott régióknak tekinthetők, melyek szétszórva találhatók a genomban. Két fő családra oszthatók, az LTR-ek (long-terminal repeats) megléte illetve hiánya alapján.

Az **LTR-régiót tartalmazó retrotranszpozonok** Ty1-copia és Ty3-gypsy alosztályokba sorolhatók. Ezek főleg az aminosavak katalikus fehérjéiben, valamint polimeráz génjeik sorrendjében különböznek. Ty1-copia elemei esetén az integráz domén megelőzi a reverz transzkriptáz és ribonukleáz H doméneket, míg a Ty3-gypsy esetén az integráz gén a polimeráz géntől downstream állapotban helyezkedik el (Bennetzen 2000). Flavell *et al.* (1992) szerint a Ty1-copia retrotranszpozonok száma fajok között eltérő lehet. Kifejezetten nagyszámúak ezek a retrotranszpozonok rozsban, árpában és búzában (Kumar és Bennetzen 1999).

Az LTR régiót nem tartalmazó retrotranszpozonok csoportjába tartoznak a LINE (long interspersed elements) és SINE (short interspersed elements) csoportok. A retrotranszpozonok szekvenciái mind fajon belül, mind a fajok között rendkívül nagy változatosságot mutatnak. Ezek az egyedi, de mégis nagy változatosságot mutató szekvenciák, jó alapul szolgálhatnak, speciális marker rendszerek kidolgozására, melyek alkalmasak lehetnek az egy fajtakörbe tartozó klónok (rügymutánsok)

azonosítására és megkülönböztetésére. Az utóbbi időben különböző retrotranszpozonokra alapuló technikákat dolgoztak ki.

Az IRAP (inter retrotransposon amplified polymorphism) esetén előfeltétel, hogy a retro elemek a megfelelő hatásfokú felszaporítás érdekében közel helyezkedjenek el egymáshoz (Kalendar *et al.* 1999). Ennél a megközelítésnél LTR specifikus primereket terveznek a transzpozon családok konzervált régióira.

A REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) módszer annyiban különbözik az IRAP-tól hogy specifikus LTR primer mellett további SSR primert alkalmaznak a 3' végen (Kalendar *et al.* 1999).

A retrotranszpozon elemek mozgása adta az ötletet a kutatóknak, hogy egy új PCR alapú **S-SAP módszert** (sequence-specific amplified polymorphism) dolgozzanak ki (Waugh *et al.* 1997). Az S-SAP módszer kifejlesztésével lehetővé vált, hogy a retrotranszpozonok genomon belüli – maguknak a kedvező jellegekkel bíró rügymutánsoknak a kialakulásához vezető – áthelyeződéseiből származó polimorfizmusokat lehessen detektálni. Ez a technológia kombinálja az AFLP technika felbontó képességét egy kiválasztott primer szekvencia specifitásával (ebben az esetben LTR szekvenciák a célzott elemek a genomban).

2.3.2. Azonosított retrotranszpozonok

Retrotranszpozonokat azonosítottak: árpában (Waugh *et al.* 1997; Gribbon *et al.* 1999; Leigh *et al.* 2003; Schulman *et al.* 2004; Soleimani *et al.* 2005, 2007), borsóban (Ellis *et al.* 1998; Pearce *et al.* 2000), búzában (Gribbon *et al.* 1999 Garcia-Martinez és Martinez-Izquierdo 2003), zabban (Yu és Wise 2000), citrus-féléknél (Breto *et al.* 2001), lucernában (Porceddu *et al.* 2002), édes burgonyában (Tahara *et al.* 2004, Tam *et al.* 2005), babban (Galindo *et al.* 2004), szőlőben (Labra *et al.* 2004; Kobayashi *et al.* 2004), paprikában (Tam *et al.* 2005), kesudióban (Syed *et al.* 2005), lótuszban (Madsen et al. 2005), káposztában (Syed *et al.* 2006), articsókában (Acquadro *et al.* 2006), *Aegilops*-fajban (Nagy *et al*. 2006), uborkában (Lou és Chen 2007), *Vitis*-ben (Pelsy 2007), körtében (Venturi *et al.* 2009), valamint *Iridaceae*-ban (Cornman és Arnold 2009).

Alma esetében csekély számú (5) retrotranszpozont írtak le (Yao *et al.* 2001, Antonius-Klemola *et al.* 2006, Venturi *et al.* 2006, Han *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2009, Sun *et al.* 2010). Az ACC szintáz promóter régiójában is azonosítottak egy putatív SINE retrotranszpozont (Md_ACS1-2, Sunako *et al.* 1999), melynek nagy gazdasági jelentősége van, hiszen ez az inszerció gátolja az etilén bioszintézisben résztvevő egyik enzim génjének működését. Azokban a változatokban, ahol a homozigóta formában fordul elő ez a mutáns allél csökkent etiléntermelés, mely viszont növeli a gyümölcsök tárolhatóságának időtartamát. Yao *et al.* (2001) rügymutánsoknál (’Rae Ime’, ’Spencer Seedless’, ’Wellington Bloomles’) transzpozon inszerciókat vizsgáltak a MADS-box transzkripciós faktorban. A beépülés következménye szirom nélküli virágok, melyekből partenokarp gyümölcsök fejlődtek. A ’Granny Smith’ esetében komplett LTR retrotranszpozonokat írtak le (Yao *et al.* 2001), továbbá Ty1-kópia-szerű retrotranszpozon szekvenciáját ismertették (Zhao *et al.* 2007).

Napjainkig Venturi *et al.* (2006), Zhao *et al.* (2009) és Sun *et al.* (2010) közleményei ismertek melyekben sikerült rügymutánsokat elkülöníteni almában. Az első esetben Venturi *et al.* (2006) ’Gala’ és ’Braeburn’ almafajtákon belüli néhány rügymutáns molekuláris azonosításáról és sikeres elkülönítéséről számoltak be pl. a ’Gala’, ’Braeburn’ és ’Hillwell’ nevű klónjai között. A második esetben, Zhao *et al.* (2009) Ty1-kópia-szerű retrotranszpozon segítségével sikerült elkülöníteniük a ’Fuji’ alapfajtát rügymutánsaitól, valamint a rügymutánsok között is sikerült különbséget találni. A harmadik esetben, Sun *et al.* (2010) putatív LTR fragmentum segítségével sikerült elkülöníteni a 'Wellspur Delicious', 'Hardispur Delicious', 'Starkrimson' és 'Starking' fajtákat. Az első három fajta a 'Starking' eredeztethető rügymutánsok.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Vizsgált fajták, klónok és genotípusok

3.1.1. Az RGA vizsgálatok fajtái

A kísérletekben vizsgált fogékony és rezisztens alma fajtákból (Way *et al.* 1991) a DNS izoláláshoz a levélmintákat az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft újfehértói állomásán gyűjtöttük, 2003-ban, 2006-ban és 2008-ban. Az irodalmi adatok alapján fogékony illetve rezisztens fajtákat az **5. táblázatban** tűntettük fel. A táblázatban kiemeléssel jelöltük meg azt a 3 fajtát, amik mind a három betegséggel kapcsolatban rezisztenciával rendelkeznek. Ez utóbbiak közül, kísérleteinkben a ’Remo’ és ’Reanda’ fajtákat vizsgáltuk.

5. Táblázat: Rezisztenciagént hordozó almafajták (Way *et al.* 1991. alapján).

Kórokozó elleni rezisztencia	Génforrások (faj, fajta)
Varasodás	’Liberty’, ’Freedom’, ’Prima’, ’Priscilla’, ’Gavin’, ’Jonafree’, ’Macfree’, ’Nova Easygro’, ’Novamac’, ’Priam’, ’Redfree’, ’Sir Prize’, ’Britegold’, *Malus floribunda*, ’Russian Seedling’, ’Trent’, ’Antonovka’, **’Remo’, ’Rewenda’, ’Reanda’**
Lisztharmat	’White Angel’, *Malus robusta, Malus zumi calocarpa,* ’MA-8’, ’David’, *Malus sargentii, Malus baccata jackii,* **’Remo’, ’Rewenda’, ’Reanda’**
Tűzelhalás	’Novole’, ’Liberty’, ’Delicious’, *Malus robusta,* **’Remo’, ’Rewenda’, ’Reanda’**

A fajtákat, s rövid leírásukat az alábbiakban ismertetjük (Hivatkozás: http://w3.mkk.szie.hu/dep/kerteszet/ta/gyumolcs/alma/fajta.htm):

’Liberty’: Varasodással és a tűzelhalással szemben rezisztens, lisztharmatnak ellenálló fajta.

’Reanda’: ’Clivia’ x *Malus floribunda*, F3 nemzedék, Németország. Varasodással és a tűzelhalással szemben rezisztens, lisztharmatnak ellenálló fajta (Way et al. 1991).

’Remo’: ’James Grieve’ x *Malus floribunda* F3 nemzedék. Varasodással, lisztharmattal és a tűzelhalással szemben ellenálló fajta.

’Golden Delicious’: A fajtacsoport lisztharmatra alig, varasodásra fokozottan érzékeny.

’Red Rome Van Well’: A ’Rome Beauty’ rügymutánsból az USA-ban nemesítették. A legtöbb betegségre fogékony fajta.

’Gala’: A ’Gala’ alapfajta (’Kidd's Orange Red’ x ’Golden Delicious’) 1962-ben kapott nevet Új-Zélandon. A legtöbb betegségre fogékony fajta.

’Jonagold’: ’Golden Delicious’ és a ’Jonathan’ keresztezéséből származó fajta. A legtöbb betegségre fogékony.

3.1.2. A magyar alma génbank gyűjtemény vizsgált fajtái és tájfajtái

A kísérletekben vizsgált tájfajtákból a DNS izoláláshoz a levélmintákat szintén az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft újfehértói állomásán gyűjtöttük, 2006 tavaszán. A vizsgált fajtákat a **6. táblázat** tartalmazza.

6. Táblázat: A vizygált fajták és főbb morfológiai és fenológiai tulajdonságai

	Érési idő (hónap)	Szín	Átlagos színeződés (%)	Növekedési erély	Koronaforma
Alant alma	10.	zöld	-	közepes	gömb
Amália	10.	zöld	-	közepes	gömb
Asztraháni fehér	7.	zöld	-	közepes	gömb
Asztraháni piros	7.	színes	60	erős	gömb
Bogovits alma	10.	színes	11	közepes	gömb
Burgundi	8.	színes	93	középerős	gömb
Chieftain	10.	színes	95	középerős	szétterülő
Csíkos fűszeres	8.	színes	50	erős	gömb
Dániel-féle renet	9.	színes	67	erős	feltörekvő
Éva	7.	színes	60	közepes	kissé szétterülő
Fekete tányér alma	9.	színes	75	erős	szétterülő
Fertődi tél	10.	színes	68	közepes	szétterülő
Gravensteini	8.	színes	70	erős	félgömb
Húsvéti rozmaring	9.	színes	22	erős	feltörekvő
Jakab alma	8.	színes	13	közepes	gömb
Kenézi piros	9.	színes	86	közepes	gömb
Keszthelyi kúpos alma	8.	zöld	-	középerős	gömb
Középfajta renet	9.	színes	5	középerős	gömb

	Érési idő (hónap)	Szín	Átlagos színeződés (%)	Növekedési erély	Koronaforma
Kubány	9.	színes	40	középerős	gömb
Liptói-féle rozmaring	8.	színes	20	középerős	gömb
Mutsu II.	10.	zöld	-	erős	szétterülő
Nyári fontos	8.	színes	40	erős	gömb
Nyári sóvári	8.	színes	30	erős	gömb
Őszi borízű	9.	színes	78	közepes	gömb
Őszi piros renet	8.	színes	97	közepes	ritka, gömb
Puha sóvári	8.	színes	56	erős	gömb
Rózsa alma	9.	színes	97	középerős	gömb
Sárga édes	9.	színes	35	közepes	gömb
Sikulai	9.	színes	89	közepes	gömb
Simonfy piros	9.	színes	93	erős	lapos gömb
Széchényi renet	9.	színes	75	erős	feltörekvő
Téli arany parmen	9.	színes	86	erős	feltörekvő
Téli banán	9.	színes	20	közepes	szétterülő
Téli fehér kálvin	10.	színes	16	erős	feltörekvő, gömb
Téli fehér tafota	9.	színes	13	középerős	gömb
Tordai piros kálvin	10.	színes	72	erős	gömb
Újvári őszi alma	8.	színes	85	közepes	gömb
Vajalma	7.	színes	30	közepes	gömb
Világ dícsősége	9.	zöld	-	erős	feltörekvő
Vista bella	7.	színes	88	erős	félig szétterülő

3.1.3. Rügymutánsok

Az izolált mutánsok csak néhány karakterisztikus tulajdonság tekintetében térnek el az alapfajtától, genetikai szempontból tehát rendkívül közeli genotípusoknak tekinthetők. A fajtakörönként vizsgált klónokat (fajtákat) a **7. táblázat** tartalmazza. A **táblázat** további rügymutáns csoportokat is tartalmaz, melyek nem tekinthetők külön fajtaköröknek, mert azok az ismert fajtakörökbe tartozó klónoknak rügymutánsai.

3.1.3.1. Jonathan fajtakör

A ’Jonathan’ fajta véletlen magoncként jött létre 1800-ban New York államban (Egyesült Államok), felismerőjéről Jonathatne Hasbrouckról nevezték el. Hazai viszonylatban a legfontosabb poliklonális fajták közé a Jonathan klónok tartoznak. A termesztése során pozitív rügymutációk keletkeztek, melynek következtében fedőszíne intenzívebb piros lett. Az alapfajta ma már igen rossz minőségű, ezért csak az

Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft újfehértói telepén levő klónjai telepíthetők. Ezek a következők: ’Szatmárcsekei Jonathan’, ’Csányi 1 Jonathan’, ’Watson Jonathan’, ’Jonathan M 40’, ’Jonathan M 41’. A ’Jonathan’ fajtát a nemesítésben is felhasználták. A keresztezésekből származó fajták pl. az ’Idared’, a ’Jonagold’ és az ’Éva’.

3.1.3.2. Starking Delicious fajtakör

A ’Starking Delicious’ a ’Delicious’ rügymutációja. New Jersey-ben fedezték fel 1921-ben. Rügymutációi pozitív tulajdonságokat jelentettek a gyümölcs színében. Ma már a rügymutáns fajtákat (’Starking Nm 47’, ’Starking Nm 251’, ’Redchief Delicious’, ’Topred Delicious’, ’Wellspur Delicious’, ’Redspur Delicious’) és hibridjeit (pl. ’Gloster’) telepítik. Szeptember második felére éri el szedési érettségét.

3.1.3.3. Golden Delicious fajtakör

A Golden Deliciousut 1890 körül Nyugat Virginiában / USA, egy házhoz tartozó kertben találták meg, véletlen magoncként. Ma világszerte termesztik. Ma alapfajtaként a ’Golden Delicious Li 85-50’ jelzésű klónt szaporítják, melynek gyümölcse kiegyenlített, középnagy (130-150 g), aranysárga színű és 4-5 nappal korábban szüretelhető.

7. Táblázat: Vizsgálatokban szereplő rügymutánsok fajtakörönként és csoportonként

Fajtacsoportok	Rügymutánsok				
Elstar csoport					
Elstar	Red Elstar				
Gala csoport					
Gala	Galaxy	Imperial Gala	Regal Prince (Gala Must)	Royal Gala	
Golden fajtakör					
Golden Delicious	Goldenir (Lysgolden)	Golden Reinders	Golden Spur	Gibson Golden Delicious	
Idared csoport					
Idared	Red Idared				
Jonathan fajtakör					
Jonathan	Jonathan M41	Jonathan Csány1	Red Jonathan	Szatmárcsekei Jonathan	Watson Jonathan
Starking Delicious fajtakör					
Starking Delicious	Starkrimson Delicious	Redchief Delicious	Redspur Delicious	Topred Delicious	Wellspur Delicious

3.1.3.4. Gala csoport

1962-ben nemesítették ki Új-Zélandon. A ’Golden Delicious’ és a ’Kidd’s Orange Red’ keresztezéséből jött létre. Gyümölcse középnagy (150-190 g), húsa roppanó, kemény és édeskés ízű. Az alapfajta sárgás, narancsvörös, klónjai sötétek és fénylő pirosak. Ezek közül is a ’Royal Gala’ csíkozottan vörös. Több változata ismert. Ma már a rügymutáns fajtákat: (’Imperial Gala’, ’Gala Schitzer’, ’Galaxy’, ’Royal Gala’ és ’Regal Price’) telepítik.

3.1.3.5. Elstar csoport

Az ’Elstar’ eredetileg Hollandiából származik. Jelenleg a *Red Elstar*, *Elton*, *Elista* és az *Elstar Elshof* a legismertebbek.

3.1.3.6. Idared csoport

Az ’Idaredet’ 1935-ben fedezték fel Idahoban. A ’Jonathan’ és a ’Wagener’ fajták keresztezéséből keletkezett.

A fajtakörök és egyéb rügymutánsok képeken is összehasonlíthatóak a **3. mellékletben**.

3.2. DNS izolálás a növénymintákból

A kísérletekben vizsgált almafajtákból a DNS izoláláshoz a levélmintákat az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft újfehértói állomásán gyűjtöttük, 2003, 2006 és 2008 kora tavaszán. A fiatal leveleket a terepen hűtőtáskába, majd a laborban -80 °C-os mélyfagyasztóba helyeztük.

A DNS izolálást mind az alma mintákat a QIAGEN cég DNeasy kit-jének felhasználásával végeztük. Minden fajta fiatal leveleiből 0,15-0,20 grammot elporítottunk dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel. A finom port Eppendorf csövekbe helyeztük. Hozzáadtunk 400 µl AP1 puffert, ezután pedig 4 µl RNase A-t. A mintákat vortexeltük, majd 10 percre, 65 fokra helyeztük. Inkubálás közben 2-3-szor megforgattuk a mintákat. Ezt követően a mintákhoz adtunk 130 µl AP2 puffert, összeráztuk és 5 percig jégen, tartottuk majd 5 percig centrifugáltuk maximális (13000 rpm) fordulatszámon, majd a felülúszót vittük tovább. A mintákat hozzáadtuk a QIA gyűjtőcső és 2 percig centrifugáltuk maximális fordulatszámon. Az átfolyót új centrifugacsőbe mértük. Az átfolyó mennyisége általában 400-450 µl volt. Hozzáadtunk 1,5 térfogatnyi AP3/E oldatot, majd pipettával elkevertük. Ebből 650 µl-nyi mennyiséget hozzámértünk a DNase mini spin oszlophoz, majd 1 percig centrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámon. Az alul lévő folyadékot kiöntöttük. A maradék oldattal megismételtük az előző lépést. A DNS-t tartalmazó oszlopot új Eppendorf csőbe helyeztük és hozzáadtunk 500 µl AW puffert. 1 percig centrifugáltuk maximális fordulatszámon. Az alul lévő folyadékot kiöntöttük, majd még egyszer centrifugáltuk 2 percig, hogy a mintáink biztosan ne tartalmazzanak etanolt. Az oszlopot új Eppendorf csőbe helyeztük. Ezután 100 µl 65 fokos AE puffert mértünk a membránra, 5 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd 1 percig centrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámon. Ezt az utolsó lépést még egyszer megismételtük, így végül a 200 µl átfolyó folyadék tartalmazta a DNS-t.

3.3. Rezisztenciához kapcsolható molekuláris marker keresés

3.3.1. Degenerált primerek tervezése

Az NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) génbankban összegyűjtöttük 10 különböző növényfajból izolált rezisztenciagén szekvenciákat. Az aminosav és nukleotid szekvenciákat a BioEdit (verzió: 7.0.5.3) (Hall *et al.* 1999) számítógépes programban összerendeztük. Kiválasztottuk a legkonzerváltabb régiókat, amelyek az összes növényfajon belül kis eltéréseket mutattak az aminosav szekvenciáikban, és degenerált primereket terveztünk a nukleotid szekvenciák alapján. A tervezett degenerált primerek elnevezését és szekvenciáit az **1. ábra** mutatja:

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'

1. ábra: Konzervált régiókra tervezett degenerált primerek

A tervezett oligonukleotidokat a Csertex és BioScience kft-kel szintetizáltattuk meg. A primerek között vannak olyanok, melyek egymással párba állítva szaporítanak fel egy specifikus fragmentumot, illetve olyanok is, amelyekkel – univerzális primerekkel párba állítva – a gén 5' (upstream) és 3' (downstream) határoló szekvenciáit tudjuk felderíteni.

3.3.2. PCR reakció degenerált primerekkel

A PCR reakciókat Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékekben végeztük 20 µl végtérfogatban. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 40 ng templát DNS; 1 x reakció puffer; 3 µl dNTP (100mM törzs); 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs); 0,75-0,75 µl forward ill. reverse primer (10 µM törzs); 1,2 unit Taq DNS polimeráz (AgBiotech). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 59°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utó polimerizációval zárult.

3.3.3. A fragmentumok klónozása plazmid vektorba

A degenerált primerekkel végzett PCR reakció termékeinek plazmid vektorba történő klónozásához a Promega cég PGEM T-easy vektor rendszerét használtuk fel. A kereskedelemben kapható DNS-polimerázok (az általunk használt Taq-polimeráz is) többsége 90 %-ban olyan fragmentumokat eredményeznek, amelyek 3' végei egy túlnyúló adenin nukleotidot tartalmaznak. A pGEM T-easy klónozó vektor, a visszaizolált fragmentumok végeinek feltöltése nélkül is lehetővé teszi a klónozást, mivel a kitben található linearizált vektor végei túlnyúló timin nukleotiddal rendelkeznek. A fragmentumok vektorba történő ligálásához a következő komponenseket mértük össze egy mintához: 2 µl PCR termék, 1 µl Teasy vector, 5 µl puffer, 1 µl T4 DNS ligáz, 1 µl ligáz puffer. A keveréket egy éjszakán át 16°C-on inkubáltuk.

3.3.4. Kompetens sejtek transzformálása

Kompetens sejtek transzformálásához -70°C-on tárolt QIAGEN EZ kompetens sejteket használtuk fel:

200 µl kompetens sejthez 1,5 µl ligátumot adtunk. Egy órás jégen történő inkubáció után hősokkot alkalmaztunk (másfél perc, 42°C), majd a mintákhoz 800 µl SOC (Hanahan 1983) tápoldatot adtunk. Egy órás 37°C-on történő tenyésztés után a mintákat 1 percig centrifugáltuk. A sejteket 100 µl friss SOC tápoldatban szuszpendáltuk, majd szilárd, ampicillint (50 µg/ml) és szelekciós markert (10 µl X-gal (50 mg/ml); 40 µl (0,1M IPTG) (Hansen *et al.* 1998) tartalmazó LB (Bertani 1951) táptalajra szélesztettük a kék-fehér szelekció kihasználására.

3.3.5. A rekombináns baktériumok tesztelése – kolónia PCR

A szelektív táptalajon kinövő fehér kolóniákból steril fogpiszkálóval kivettünk egy kis részt és 50 µl steril vízben szuszpendáltuk a baktériumsejteket. Öt percre forrásban lévő vízbe helyeztük az eppendorf csöveket, majd egy perces centrifugálást végeztük. A felülúszó vizes fázisból 4 µl mennyiséget használtunk templátként a PCR reakció során. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 4 µl felülúszó; 1 x reakció puffer; 3 µl dNTP (100mM törzs); 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs); 0,75-0,75 µl a szaporításhoz alkalmazott degenerált primerekből (10 µM törzs); 1,2 unit Taq DNS polimeráz (AgBiotech). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os

előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 62°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizációval zárult.

3.3.6. Plazmid izolálás

A kolónia PCR-rel pozitívnak bizonyuló mintákból plazmidot a BioRad cég Plasmid Miniprep kitjének felhasználásával izoláltuk. A pontos DNS koncentrációt NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg és a szekvenáláshoz 100 ng/µl koncentrációt állítottunk be, melyből 5 µl (500 ng) felvitelre került a kapilláris gélelektroforézis készülékben.

3.3.7. Szekvenálás és a szekvenciák kiértékelése

A szekvenálási reakciókat az MBK (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) szekvenáló laborja végezte, ABI Prism 310 (Applied Biosystems) készülékkel, a felszaporításhoz használt degenerált primerek felhasználásával. A kromatogramokat a Chromas (verzió: 2.31) számítógépes programmal értékeltük, eltávolítottuk a szekvenciák végéről és elejéről a plazmid régiókat. A kapott nyers szekvenciákkal BLAST (basic local alignment search tool) elemzést végeztünk az NCBI honlapján rendelkezésre álló programot alkalmazva.

3.3.8. SCAR markerek tervezése és tesztelésük

A kapott fragmentumok egyedi felszaporítására SCAR (sequence characterised amplified region) markereket a Primer 3 programcsomag segítségével terveztünk (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer 3/primer 3.cgi) (**8. táblázat**).

8. Táblázat: A szekvenciákra tervezett SCAR primerek (primerek részletesebb adatait a **2. melléklet** tartalmazza)

SCAR primerek	**szekvencia *5' – 3'* irányban**	
	forward	***reverse***
Arga-4	ctg cca aag cca ttt ata acc a	tcg gat caa atc atg cat agt c
Arga-8	atc ggg aag aca acc cta gc	gccaacaaagccacagtttt
Arga-9	gaa gac aac agc tgc caa cc	ttc acg aag gtc act gat tcc
Arga-10	atg gcc aac ata gat gaa gtg g	cag aat tcg tga ttc cct ttg t
Arga-25	gca aac ccc att ttc aat aga g	cac gac ttg ttc caa gaa a
Arga-26	aaa gtt tcc ttg ccg acg tt	gtt gcc ttc aac agt tac aag a
Arga-27	tcc ttt caa aag tga ggg aag a	cat gga gtt ctc cga ttc cta t
Arga-28	tta gag ggg tgt gct cta agg a	tgt cgg agt aag tcg tgc ata g
Arga-29	aag gtg gcc aat gtt gat aaa g	caa gtc gtg cat ccg tat aaa a

A primerek szintézisét követően PCR reakciót indítottunk a SCAR primerekkel. A PCR reakció csak a felhasznált primerekben tértek el a korábban már ismertetett kolónia PCR-től.

A PCR terméket 1,2 %-os agaróz gélen futtatuk. Mivel az adott méretű fragmentum az összes fajta esetében felszaporodott, a PCR termék restrikciós emésztését is elvégeztük. Ettől azt vártuk, hogy az azonos méretű, de szekvencia eltéréseket tartalmazható fragmentumok el legyenek egymástól különíthetőek, esetleg CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) markerekké konvertálhatók.

Az emésztési reakció a következő összetevőket tartalmazta:

- PCR termék: 15 µl
- MseI restrikciós enzim: 5Unit
- enzimpuffer: 2 µl
- steril víz: 2 µl

Az emésztést 1,5 órán keresztül 37 °C-on végeztük, majd a mintákat szintén 1,2 %-os agarózgélen futtatuk.

3.4. PCR alapú technikák

3.4.1. Mikroszatellit analízis

A PCR reakciókat Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékekben végeztük 20 µl végtérfogatban. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 40 ng templát DNS; 1 x reakció puffer; 3 µl dNTP (100mM törzs); 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs), 0,75-0,75 µl forward ill. reverse SSR (**9. táblázat**) primer (10 µM törzs); 1,2 unit Red-Taq DNS polimeráz (Sigma). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 57°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizációval zárult. Az alkalmazott mikroszatellita markereket az **9. táblázat** tartalmazza.

9. Táblázat: A kísérleteinkben alkalmazott 6 és 9 mikroszatellit primer pár és szekvenciáik

SSR név (Liebhard et al. 2002)	**szekvencia *5' – 3'***	
	forward	***reverse***
CH03g07	aat aag cat tca aag caa tcc g	ttt ttc caa atc gag ttt cgt t
CH04g10	caa aga tgt ggt gtg aag agg a	gga ggc aaa aag agt gaa cct
CH04e03	ttg aag atg ttt ggc tgt gc	tgc atg tct gtc tcc tcc at
CH05c02	tta aac tgt cac caa atc cac a	gcg aag ctt tag aga gac atc c
CH05d11	cac aac ctg ata tcc ggg ac	gag aag gtc gta cat tcc tca a
CH05e03	cga ata ttt tca ctc tga ctg gg	caa gtt gtt gta ctg ctc cga c
Európai standard SSR set (Liebhard *et al.* 2002)	**szekvencia *5' – 3'***	
	forward	***reverse***
CH01d03	cca ctt ggc aat gac tcc tc	acc tta ccg cca atg tga ag
CH01h02	aga gct tcg agc ttc gtt tg	atc ttt tgg tgc tcc cac ac
CH02c06	tga cga aat cca cta atg ca	gat tgc gcg ctt taa cat
CH02c09	tta tgt acc aac ttt gct aac ctc	aga agc agc aga gga gga tg
CH02c11	tga agg caa tca ctc tgt gc	ttc cga gaa tcc tct tcg ac
CH02d08	tcc aaa atg gcg tac ctc tc	gca gac act cac tat ctc tc
CH04c06	gct gct gct gct tct agg tt	gct tgg aaa agg tca ctt gc
CH04e05	agg cta aca gaa atg tgg ttt g	atg gct cct att gcc atc at
COL	agg aga aag gcg ttt acc tg	gac tca ttc ttc gtc gtc act g

A mintákat első lépésben 1,2 %-os, Et-Br-dal festett agaróz gélen futtattuk 10 V/cm-es feszültséggel, majd a mintázatokat 313 nm-es UV fényben digitális kamerával fényképeztük és detektáltuk. Azokat a reakciótermékeket, amelyekben a mikroszatellit régiókat sikeresen felszaporítottuk, ALF-*express*II készülékben poliakrilamid gélen futtattuk, a pontos allél összetételük és méretük meghatározása céljából.

3.4.1.1. Az allélméretek meghatározása ALF-expressII készülékben

A PCR reakciókat követően a mintákat először 1,2%-os agaróz gélen, majd a pozitív termékeket az Alf-*express*II készülékben 5%-os poliakrilamid gélen futtattuk. Kezdetben, kereskedelmi forgalomban beszerezhető, majd saját készítésű külső, illetve belső standardokat használtunk. Felvitel előtt az összes mintából 3,5 µl mennyiséget összekevertünk 4 µl belső standarddal, majd a külső standardokkal együtt denaturáltuk 95 °C-on 4 percig, majd rögtön jégre helyeztük. A gél első, huszadik és negyvenedik zsebébe 4 µl külső standardot vittünk fel,. A minták és a belső standardok keverékéből 4 µl-t vittünk fel a gél maradék zsebeibe, 2-19-ig, valamint 21-39-ig. A futás paramétereit a következőképpen állítottuk be:

- áramerősség: 35-40 mA
- feszültség: 850 V (konstans)
- teljesítmény: 30-40 W
- hőmérséklet: 55 Celsius fok
- futási idő: 70-75 perc

A futtatást a monitoron folyamatosan figyelemmel kísértük, majd az eredmény kiértékeléséhez és dokumentálásához a Fragment Analyser 1.0 számítógépes programot használtuk. Az ismert nukleotid hosszúságú külső és belső standardok segítségével, a futtatás során, a gélben történő esetleges vándorlási különbségeket kiegyenesítettük, majd a programmal meghatároztuk az egyes allélek pontos bázisméretét. Minden minta esetében a futtatásokat legalább egyszer megismételtük.

3.4.1.2. Klaszter analízis és PIC és C érték számítások matematikai képletei

A klaszter analízishez minden detektálható allél jelenlétét (1), illetve hiányát (0) binárisan kódoltuk az összes fajta esetében. Ez egy 40 X 71-es és egy 37 X 87-es bináris mátrixot eredményezett, amelyet az SPSS 16.0 számítógépes programcsomaggal (SPSS Inc., USA) értékeltünk, az UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Means) módszert, és a Jaccard indexet alkalmazva (Jaccard 1908).

A kereskedelmi fajtákkal történő összehasonlításkor 105 X 78-as bináris mátrixot alkalmaztunk az azonosságok felderítéséhez, mivel az összes korábban kereskedelmi fajtákban leírt allél (Galli *et al.* 2005) megtalálható volt a génbanki fajtákban, ezek a fajták számos egyéb allél hordozói is voltak. A két alkalmazott marker sorozat egyidejű

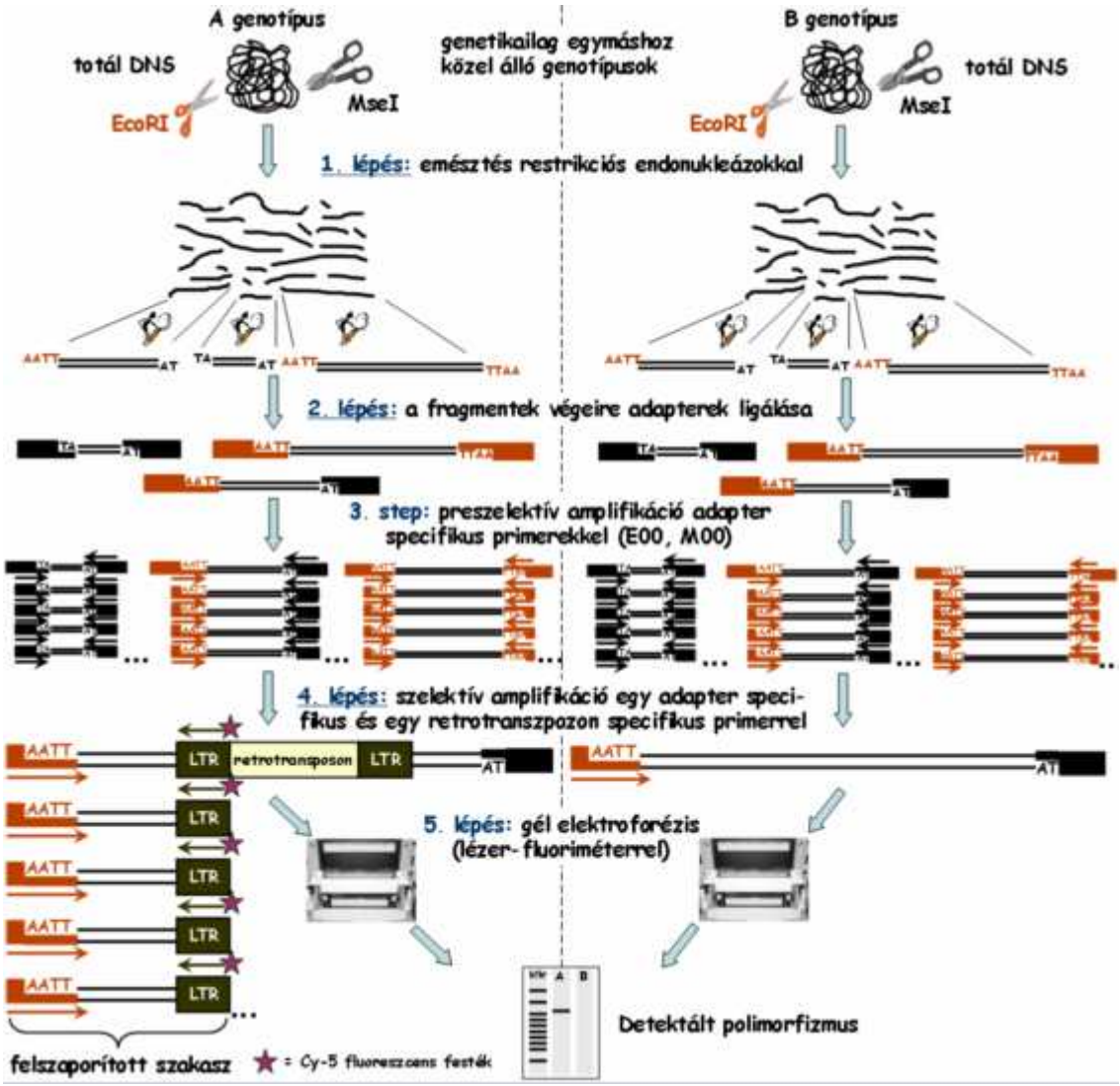
vizsgálatakor 37 X 158-as, valamint a rügymutánsoknál használt 8-as SSR sorozat esetén, 27 X 107-es bináris mátrixot alkalmaztunk.

A vizsgált mikroszatellit allélok gyakorisága alapján meghatároztuk az egyes allélok, PIC értékét (heterozigozitás index) az alábbi formula segítségével: $PIC=1-\sum pi^2$, ahol 'pi' az i-edik allél gyakoriságát jelöli (Anderson *et al.* 1993).
A fajták azonosításhoz minimálisan szükséges markerek számának és kombinációjának meghatározásához, összesen 40 különböző fajta/tájfajta (N=40) genetikai ujjlenyomatát készítettük el. A megegyezőségi valósínűséget (PI), a megfigyelt SSR primerek esetében, két találomra választott almafajtára, Tessier *et al.* (1999) képlete alapján számoltuk: $PI = \prod_{j=1}^{j} C_j$.

3.4.2. S-SAP technika

Mintánként 500 ng totál DNS-t emésztettünk 5-5 egység EcoRI és MseI enzimmel, 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) 20 µl-es végtérfogatban (Vos *et al.* 1995). Ezt követően 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. Az első PCR pre-amplifikációt az adapterekre specifikus primerekkel végeztük (E00: 5' – GAC TGC GTA CCA ATT C – 3', M00: 5' – GAT GAG TCC TGA GTA A – 3'), 20 µl-es végtérfogatban, amely a következő összetevőket tartalmazta: 15-15 ng E00 és M00 primerek; 0,2 mM dNTP; 1,125 mM $MgCl_2$; 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 terveztünk (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') az almában napjainkig 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**)



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

Az első PCR reakció termékeit hússzorosára hígítottuk, és ezekből 4 µl-t használtunk a szelektív amplifikációhoz, amihez kombinációban egy jelölt Ret-LTR primert és egy adapter specifikus primert alkalmaztunk, mely utóbbi, három szelektív nukleotidot tartalmazott a 3' végén (Mse-48: 5' – ~ CAC – 3' vagy Mse-55: 5' – ~ CGA – 3' vagy Mse-60: 5' – ~ CTC – 3' vagy Mse-61: 5' – ~ CTG – 3' vagy Eco-33: 5' – ~AAG – 3'

vagy Eco-36: 5’ – ~ACC – 3’ vagy Eco-37: 5’ – ~ACG – 3’ vagy Eco-44: 5’ – ~ATC – 3’). A primerek és emésztő enzimek kombinációja megtalálható a **10. táblázatban**.

10. Táblázat: SAP primerek és emésztő enzimek kombinációja.

Primer kombináció	Primer kombináció
Ret-LTR1 + MseI-48	Ret-LTR2 + EcoRI-33
Ret-LTR1 + MseI-55	Ret-LTR2 + EcoRI-36
Ret-LTR1 + MseI-60	Ret-LTR2 + EcoRI-37
Ret-LTR1 + MseI-61	Ret-LTR2 + EcoRI-44
Ret-LTR1 + EcoRI-33	Ret-LTR3 + MseI-48
Ret-LTR1 + EcoRI-36	Ret-LTR3 + MseI-55
Ret-LTR1 + EcoRI-37	Ret-LTR3 + MseI-60
Ret-LTR1 + EcoRI-44	Ret-LTR3 + MseI-61
Ret-LTR2 + MseI-48	Ret-LTR3 + EcoRI-33
Ret-LTR2 + MseI-55	Ret-LTR3 + EcoRI-36
Ret-LTR2 + MseI-60	Ret-LTR3 + EcoRI-37
Ret-LTR2 + MseI-61	Ret-LTR3 + EcoRI-44

A reakciókörülmények megegyeztek a preszelektív amplifikációnál leírtakkal. A felszaporodott fragmentumokat ALFexpress-II DNS analizátor segítségével értékeltük ki. Leírása a korábban ismertetett *allélméretek meghatározása* menüpont alatt található.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Rezisztencia gén analógok (RGA) vizsgálata:

A kutatásaink célja olyan RGA markerek azonosítása és tesztelése volt, az általunk vizsgált genotípusokon (fajtákon), melyek alkalmasak a rezisztenciagén(ek) jelenlétének, illetve hiányának kimutatására.

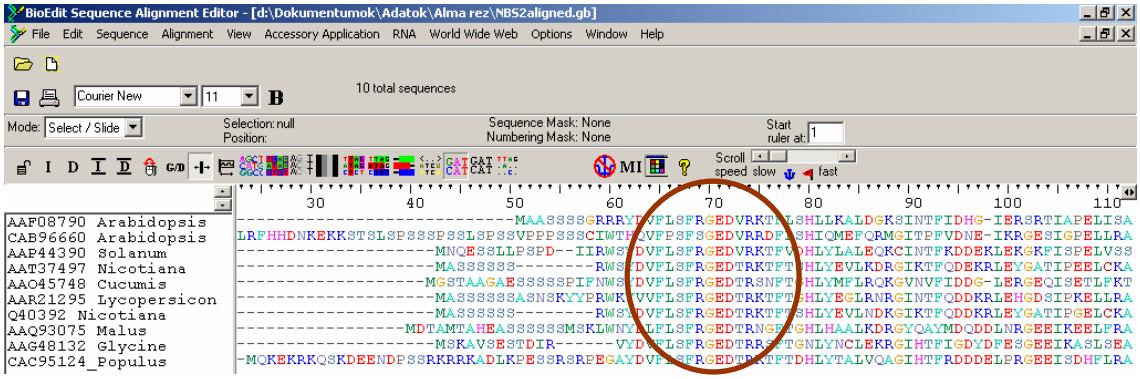
Az alkalmazott molekuláris megközelítés (3-as pontok az alkalmazott technikákat, a 4-es pontok az elért eredményeket tartalmazzák):

1. Vizsgált genotípusok gyűjtése és DNS izolálás (3.1.1. és 3.2. pont)
2. Degenerált primerek tervezés (3.3.1. pont)
3. PCR reakció degenerált primerekkel (3.3.2.; **4.1.1. és 4.1.2. pont**)
4. A fragmentumok klónozása plazmid vektorba (3.3.3. **és 4.1.3. pont**)
5. Kompetens sejtek transzformálása (3.3.4 pont)
6. A rekombináns baktériumok tesztelése – kolónia PCR (3.3.5. pont)
7. Plazmid izolálás (3.3.6. pont)
8. Szekvenálás és a szekvenciák kiértékelése (3.3.7.; **4.1.4. és 4.1.5. pont**)
9. SCAR markerek tervezése és tesztelésük (3.3.8. **és 4.1.6. pont**)

4.1.1. Rezisztencia génekre tervezett degenerált primerek tesztelése

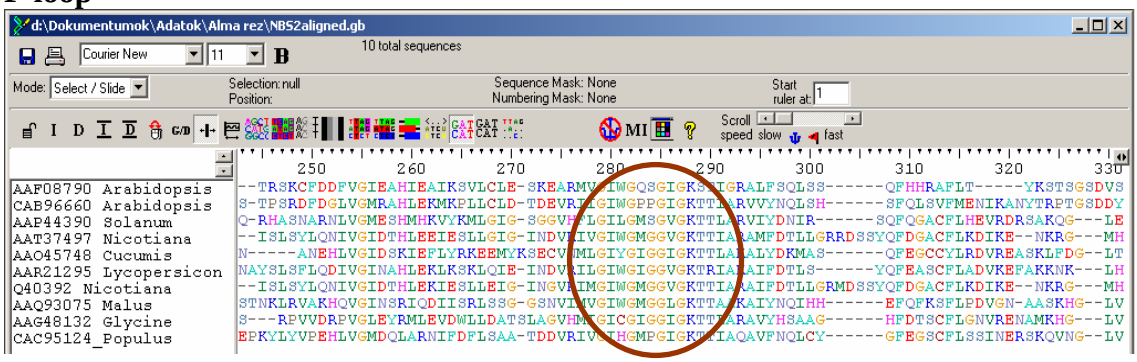
Célunk az volt, hogy olyan RGA-kat azonosítsunk, izoláljunk, melyek a rezisztens illetve fogékony fajtákban eltérést mutatnak. Az RGA-k megléte, illetve hiánya alapján mélyebb ismeretre tehetnénk szert a különböző betegség rezisztencia folyamatok működésével kapcsolatban. Ennek első lépéseként olyan szekvenciákat kerestünk, melyek a különböző növényfajok esetében azonosak vagy legalábbis nagyfokú homológiát mutatnak. Az NCBI génbankban szerepelő különböző növényi rezisztencia gének szekvenciáiban ezért, konzervált régiókat kerestünk, melyekre degenerált primereket terveztünk. Bioedit szoftver alkalmazásával összerendeztük a különböző növényfajokban meglévő konzervált régiókat (**3-6. ábra**).

TIR



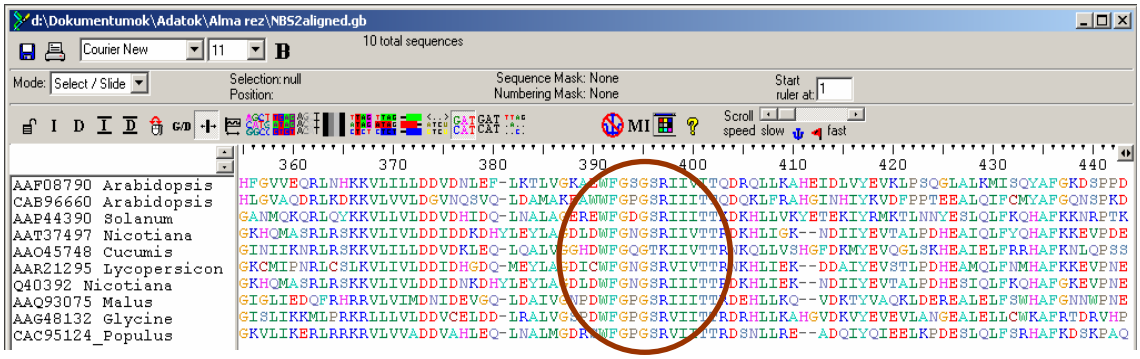
3. ábra: Különböző növényfajok feltételezett rezisztencia génjeinek konzervált régiói aminosav szekvenciáinak „összerendezése” a TIR régió megjelenítése érdekében (körrel jelölve)

P-loop



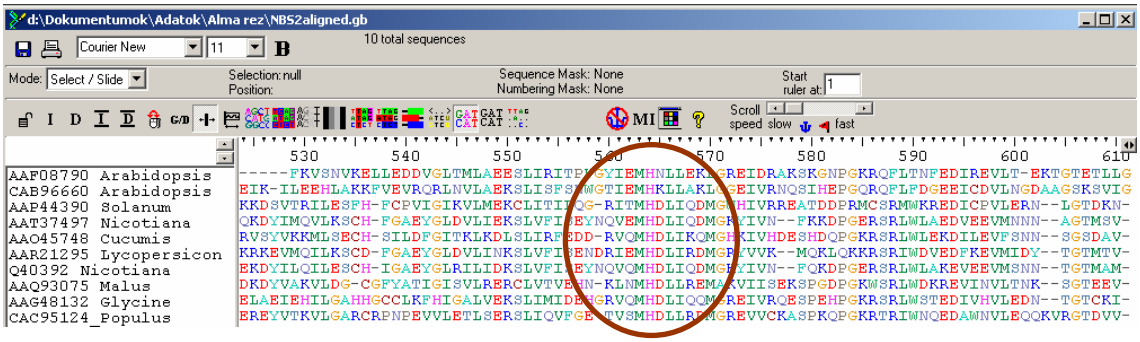
4. ábra: Különböző növényfajok feltételezett rezisztencia génjeinek konzervált régiói aminosav szekvenciáinak „összerendezése” a P-loop régió megjelenítése érdekében (körrel jelölve)

WFGPG



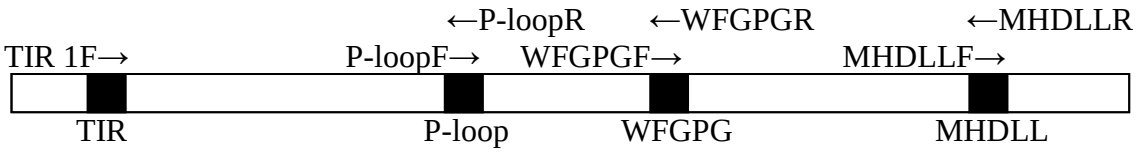
5. ábra: Különböző növényfajok feltételezett rezisztencia génjeinek konzervált régiói aminosav szekvenciáinak „összerendezése” a WFGPG régió megjelenítése érdekében (körrel jelölve)

MHDLL



6. ábra: Különböző növényfajok feltételezett rezisztencia génjeinek konzervált régiói aminosav szekvenciáinak „összerendezése” a MHDLL régió megjelenítése érdekében (körrel jelölve)

Ezek a primerek egy már ismert, a *Malus baccata*-ból (Szibériai almafaj) izolált TIR NBS-LRR típusú rezisztencia génen az alábbi szekvencia helyekhez kapcsolódnak (**7/a ábra**).



7/a. ábra: Az általunk tervezett primerek és tapadási helyeik

……..tccatgtcaaaactttggaattacgacttgt**tcttgagcttcagag**
gtgaagacacgcgcaacggcttcacaggccacctccacgcggcattaaaagacaggggataccaggctta
tatggatcaggacgatctaaacagaggggaagaaataaaagaggaactgttccgggcaatcgaagggtcg
aaggatctccatcattgtcttctcaaagaggtatgcggattccagttggtgtcttgacgagctggtgaag
atcatggagtgcagatccaactggggcgacatgttttgccaatattctatcatgttgatccttcacatgt
caggaagcaggacggagatttagccgaagcatttctgaagcacgaagagggatcggtgaaggaacagatt
ggcaagaaacgtgaagctaaacaagaaagggtaaagcagtggaaaaaagctcttacagaagctgcaaatt
tgtctggccacgatcttcgtatcactgataatgggcgcgaagcaaatctgtgtcctagagaaattgttga
caatattattacgaaatggcttatgagcacaaacaaactaagagtggccaagcaccaggttggtatcaat
tctcgcattcaagacattatcagtcgtctttcaagtggcggatcaaatgttattatggttggaatttggg
gg**atgggtggattgggtaaaacaa**cagctgccaaagccatttataatcaaattcatcatgagttccaatt
caaaagtttcctgcctgatgttggcaacgctgcaagtaaacatggtctagtttatttgcaaaaagaactt
attttatgacatcttaaaaacgaagtctaaaataagcagtgttgatgaaggtatcggtctgatagaagat
aatttcgacatagaagggtacttgtcatcatggacaacatagatgaagtgggccaattggatgcaatagt
tggaaatcctgat**tggtttggtccaggaagtagaat**tatcataacaacaagagatgaacatttactaaag
caagtggataagacatatgtggctcagaaattggatgaacgagaagctttggagctctttagttggcatg
cctttggaaataattggcctaatgaagaatatcttgaactctcagaaaaagttgtttcttactgtggagg
tttgccactagcccttgaagttttaggttctttttgtttaaaagacccatagcagagtggaaaagtcaa
ttggagaaattaaaaagaactcctgaaggaaaaataataaaatccctaagaataagctttgaagggctag
atgatgcacagaaggctatatttcttgacatatcttgtttctttattggagaggacaaggactatgttgc
aaaagtattagatggatgtggattttatgcaacaataggaatcagtgtccttcgtgaacgatgccttgta
actgttgagcataacaagttgaat**atgcatgacttgcttcgagaaatgg**ccaaagtaatcatttctgaaa
aatcccctggtgaccctggaaaatggagtaggttgtgggataaacgagaggtcatcaatgtattgacaaa
taaatctggaactgaagaagttgaaggacttgctctaccttggggttatcgtcatgacactgctttcagt
acaagaagcatttgccaatctgaaaaaactgagattgcttcagctctgcagagtagagctgaatggagaa
……

7/b. ábra: A konzervált régiókra tervezett primerek és kapcsolódási helyei a szibériai almafaj (*Malus baccata*) esetében. A színekkel kiemelt területek a primer párok kapcsolódási helyét mutatják

tcttgagcttcagaggtgaaga : **TIR1F**
atgggtggattgggtaaaacaa : **P-loopR**
TIR1F + P-loopR = 669 bp (intron nélkül)

atgggtggattgggtaaaacaa : **P-loopF**
tggtttggtccaggaagtagaat: **WFGPG-R**
P-loopF + WFGPG-R = 314 bp (intron nélkül)

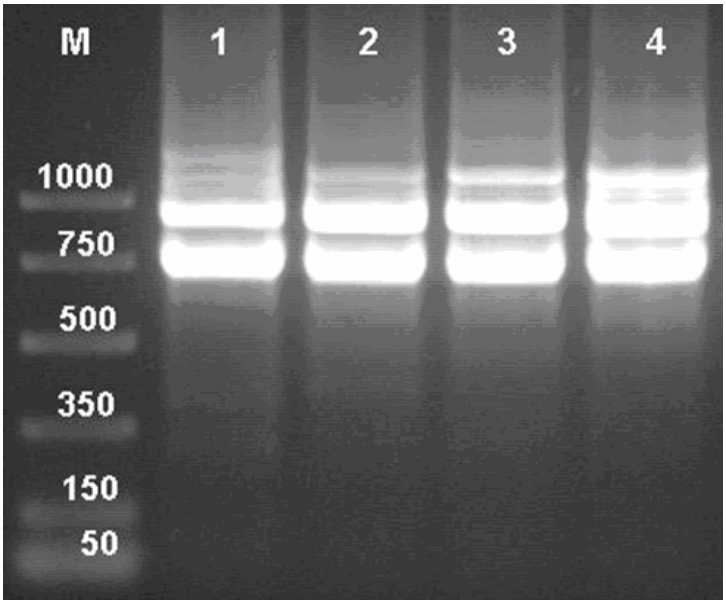
tggtttggtccaggaagtagaat: **WFGPG-F**
atgcatgacttgcttcgagaaatgg: **MHDLL-R**
WFGPG-F + MHDLL-R = 526 bp (intron nélkül)

8. ábra A várható amplifikátum méretei**.**

Ezekkel a primerekkel (**8. ábra**), mind a TIR-NBS-LRR, mind a CC-NBS-LRR típusú rezisztenciagénekből fragmentumokat lehet felszaporítani. A **8. ábra** a várható amplifikátumok méreteit adja meg intron nélkül.

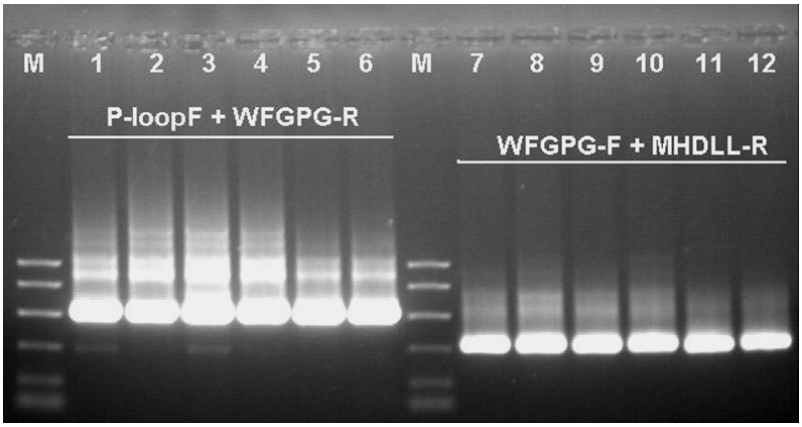
4.1.2. A degenerált primerekkel felszaporított fragmentumok

A primerek tervezését követően PCR reakciókat indítottunk rezisztens, illetve fogékony genotípusokból izolált DNS-t templátként alkalmazva. Mivel közismert, hogy a növényi genomban akár több száz ilyen típusú szekvencia is létezhet, arra számítottunk, hogy esetleg sikerül olyan fragmentumokat kapnunk, amelyek csak a rezisztens genotípusban jelennek meg. Sajnos azonban ezt a méretbeli különbséget nem sikerült kimutatnunk (**9. ábra**). Nagy kópiaszámú, azonos méretű fragmentumokat kaptunk a betegségekre leginkább rezisztens és fogékony genotípusokban egyaránt.



9. ábra: Alma fajták (1,2,3,4) TIR1F és P-loop-R degenerált primerekkel végzett PCR reakciójának eredménye. M: PCR molekulatömeg marker, 1: Liberty, 2: Gala, 3: Red Rome Van Well, 4: Reanda. A Liberty és a Reanda genotípusok a legtöbb bakteriális és gombás betegséggel szemben rezisztensek, míg a többi fajta (3 és 4) fogékony.

A **9. ábra** bizonyítja azt is, hogy a felszaporított fragmentumok mérete azonos. Emellett a reakció eltérő méretű fragmentumokat is eredményezhet, valószínűleg az intron(ok) jelentétének illetve hiányának a következtében **(10. ábra).**

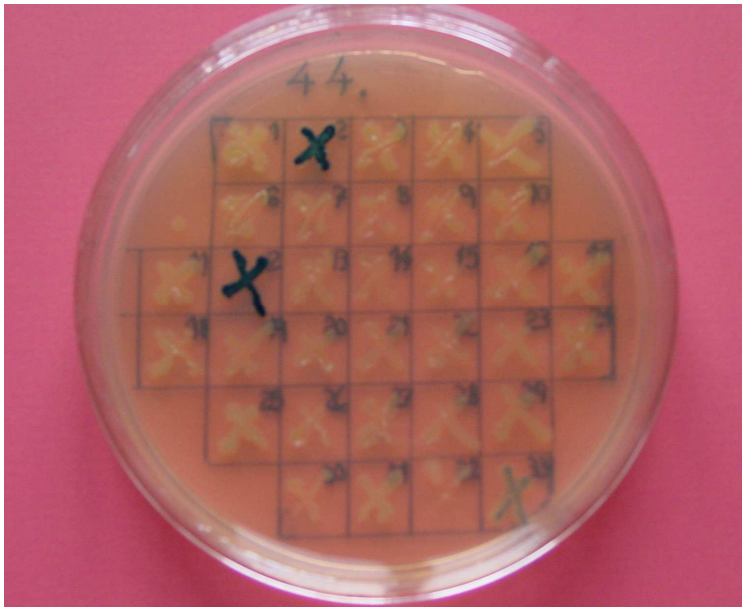


10. ábra: Alma fajták (1,2,3,4) P-loop-F és WFGPG-R (1-4) illetve a WFGPG-F és MHDLL-R (7-10) degenerált primerekkel végzett PCR reakciójának eredménye. M: PCR molekulatömeg marker; 1, 7: Liberty; 2, 8: Gala; 3, 9: Red Rome Van Well; 4, 10: Reanda; 5, 11: Jonagold; 6, 12: Golden Delicious. A Liberty és a Reanda genotípusok (1, 7, 2 ,8) a legtöbb bakteriális és gombás betegséggel szemben rezisztensek, míg a többi fajta (3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12) fogékony.

A felszaporított fragmentumok méretéből arra következtethetünk, hogy a P-loopF és WFGPG-R primereket alkalmazva az intron régió(k) is felszaporításra került(ek), míg a WFGPG-F és MHDLL-R primereket használva az intron nélkül számított ≈526 bp méretű fragmentumot kaptuk.

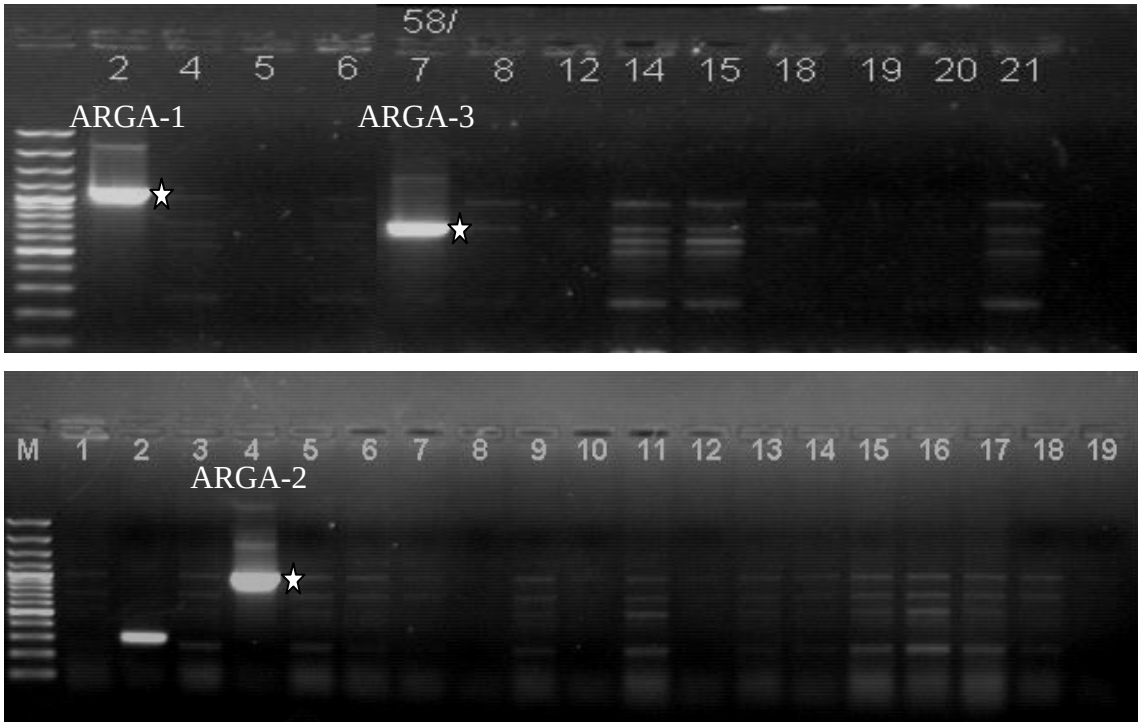
4.1.3. A fragmentumok klónozása

Első lépésben a TIR1-F és P-loop-R degenerált primerekkel felszaporított alma fragmentumokat pGEM T-easy vektorba klónoztuk. A ligáláshoz közvetlenül a PCR terméket használtuk, abból a célból, hogy lehetőleg az összes azonos méretű, de szekvenciális különbségeket hordozó fragmentumot sikerüljön klónoznunk. A szelektív táptalajon kinövő fehér kolóniákból, minden egyes fajta esetében, ún. masterplate-et készítettünk, amely segítségével minden kolóniának külön számot adtunk (**11. ábra**).



11. ábra: A „kék-fehér” szelekciót követően a fehér kolóniákból indított master-plate

Az **11. ábrán** látható, hogy néhány kolónia a kezdeti fehérség ellenére később bekékült az X-gal-t, IPTG-t és ampicillint tartalmazó táptalajon, ezekkel a későbbiekben nem foglalkoztunk. Néhány nap után is fehéren maradt mintákból kolónia PCR-t indítottunk ugyanazokkal a degenerált primerekkel (TIR1-F és P-loop-R), melyekkel a fragmentumok felszaporítását is végeztük. Ezzel a megközelítéssel, már az egyedi klónozott szekvenciákat tudtuk felszaporítani (**12. ábra**).



12. ábra: A kolónia PCR során, a ’Reanda’ fajtában az ARGA-1, ARGA-2, ARGA-3 primerekkel sikerült fragmentumokat felszaporítanunk. A csillaggal jelölt fragmentumokat szekvenáltuk.

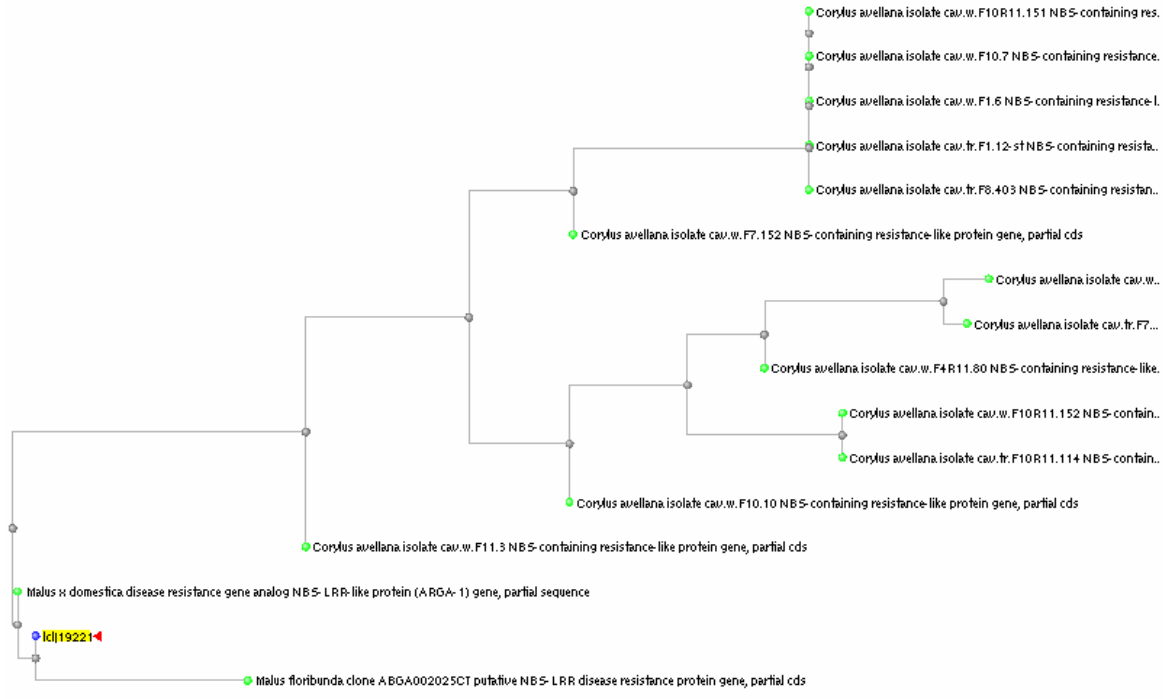
Az amplifikációt megismételtük, és a **12. ábrán** látható 3 sikeresen felszaporodó kolónia mellett, további 9 (ARGA 4-12) kolónia esetében kaptunk megfelelő méretű terméket, melyeket szekvenáltunk.

4.1.4. Az ARGA 1-12 primerekkel kapott DNS fragmentumok szekvenciájának értékelése és SCAR markerek tervezése

A kolónia PCR-rel pozitívnak bizonyuló 12 kolóniából folyékony LB tenyészetet indítottunk, majd nagy tisztaságú plazmid DNS-t izoláltunk. A fragmentumok szekvenálása az SP6 és T7 univerzális primerekkel történt. A nukleotid szekvenciákat Bioedit (verzió: 7.0.5.3) szoftverrel aminosav szekvenciává konvertáltuk, s aminosav szinten vizsgáltuk az egyezőségeket, más RGA jelöltekkel. Az NCBI honlapján lévő BLAST alkalmazással olyan fehérjékhez hasonlítottuk aminosav szekvenciáinkat, melyek feltételezhetően vagy már bizonyítottan, különböző rezisztenciákban fontos szerepet betöltő szekvenciák, szakaszok. Az alábbiakban mutatjuk be az egyes szekvenciákat:

Az ARGA-1 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-1 primerrel kapott fragmentumunk **nukleotid szekvenciája** a legnagyobb homológiát a ’Fuji’ almafajtában azonosított, feltételezett rezisztencia génnel (azonosító szám: ABGA002025CT, Rikkerink *et al.* 2006) mutatta. 459 nukleotidból 470 azonos, ami 97%-os nukleotid egyezőséget jelent. Emellett a *Corylus avellana*-ból izolált NBS régiót tartalmazó szekvenciákkal mutat nagy homológiát **(13. ábra)**.

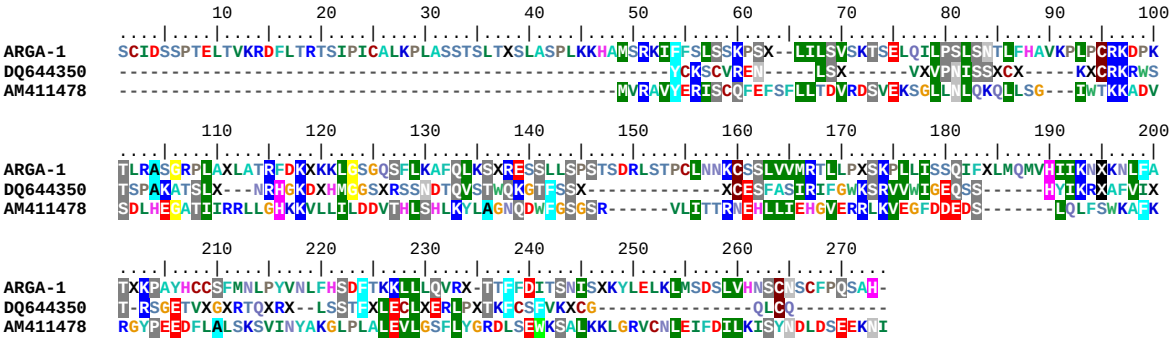


13. ábra: ARGA-1 primerrel kapott fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-1 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-1 primerrel kapott fragmentumunk **aminosav szekvenciája** a legnagyobb homológiát a *Rosa* hibridek NBS-LRR rezisztencia fehérjével (AM411478) mutatta. Hattendorf és Debener (2007) szerint ez az egyike azoknak az RGA szekvenciáknak, melyeket konzervált NBS régiókra tervezett oligonukleotid primerekkel sikerült felszaporítaniuk. Az azonosság alapján feltételezhető, hogy ennek a régiónak szerepe lehet a rezisztencia kialakításában.

ARGA-1 fragmentumunk aminosav szinten a ’Fuji’ almafajtában azonosított, feltételezett rezisztencia génnel két szakaszban mutat még nagy hasonlóságot. Az első

szakaszban 89%-os (84 aminosavból 75), míg a második szakaszban 86%-os (60 aminosavból 52 azonos) az azonosság (**14. ábra**). NCBI azonosító: EF455013.

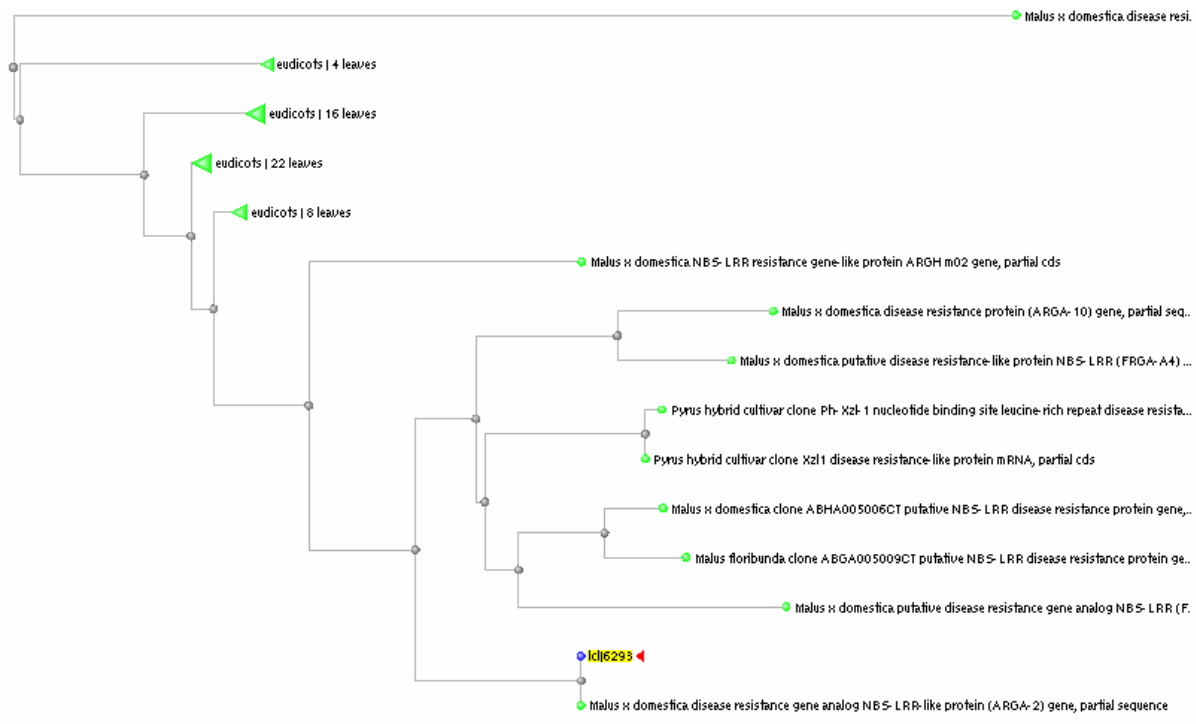


14. ábra: ARGA-1 primerrel kapott DNS fragmentum (811 bp) által kódolt aminosav szekvenciája és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (DQ644350, AM411478). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-2 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-2 primerrel kapott fragmentumunk **nukleotid szinten** *Malus baccata*-ból származó TIR-NBS-LRR típusú R7 (Lee *et al.* 2003; AY363617) szekvenciával mutatja a legnagyobb homológiát (817 nukleotid hosszúságú szakaszon 706 nukleotid azonos). Ezt követi, két általunk NCBI adatbázisba feltöltött szekvencia (ARGA-10 és ARGA-4) 92%-nyi (572 nukleotid hosszúságú szakaszon 531 nukleotid azonos), valamint 84%-nyi (828 nukleotid hosszúságú szakaszon 702 nukleotid azonos) azonossággal (Wichmann *et al.* 2009, NCBI azonosító: FJ477237, FJ477235)**.**

Kisebb szekvencia szakaszon nagyobb homológia (93%, illetve 94%) figyelhető meg egy *Malus x domestica*-ból származó FRG-A4 klón (AF515627), valamint a Wang *et al.* (2008) által közölt *Pyrus hybrid*-ből származó Ph-Xz1-1 klón (EU939867) szekvenciájában **(15. ábra)**.

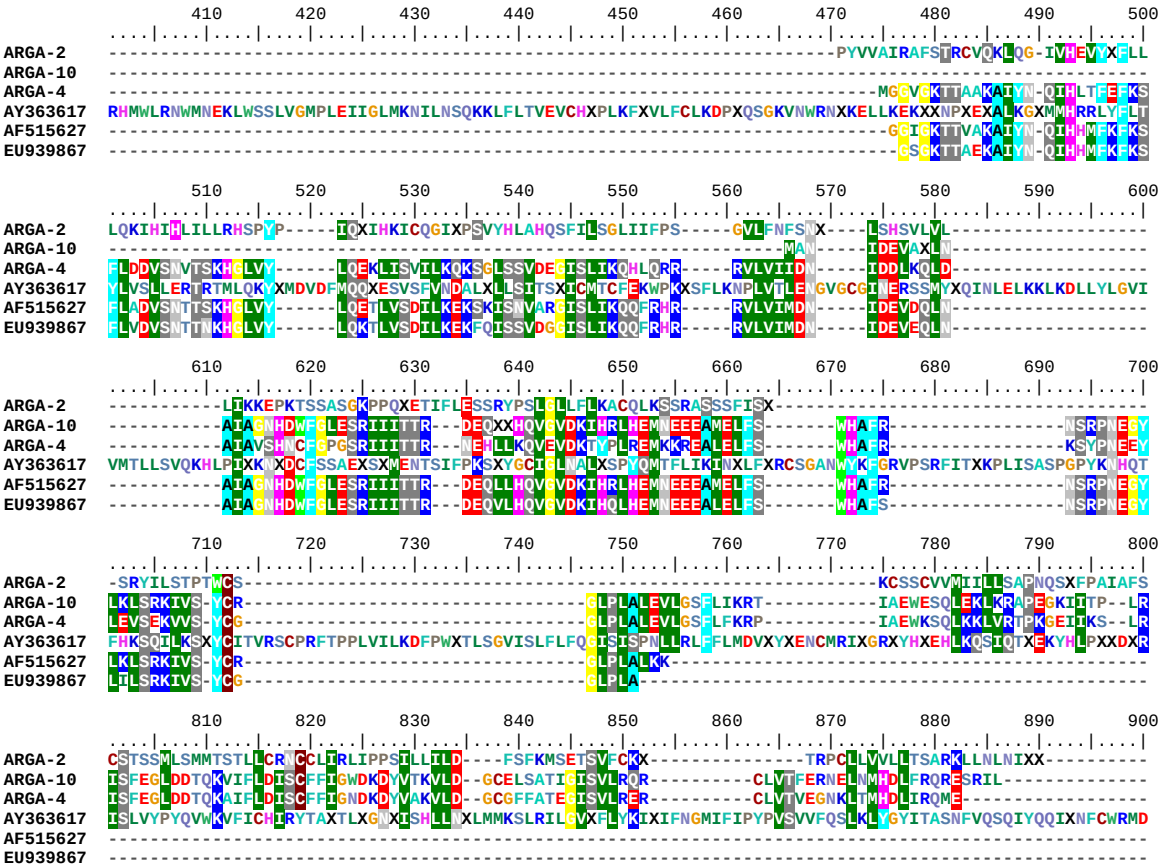


15. ábra: ARGA-2 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-2 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-2 primerrel kapott fragmentumunk szekvenciája **aminosav szinten** a legnagyobb homológiát az általunk az NCBI adatbázisába feltöltött ARGA-10-es – 118 aminosavból 99 aminosav azonos (83%) – valamint az ARGA-4-es – 206 aminosavból 138 aminosav azonos (66%) – szekvenciával mutatott.

Nagyfokú homológia (69%) figyelhető meg a *Malus baccata*-ból származó TIR-NBS-LRR típusú R7 (AY363617) szekvenciával (Lee *et al.* 2003), ahol 203 nukleotidból 142 nukleotid azonos.

Kisebb szekvencia szakaszon nagyobb homológia figyelhető meg az ARGA-4, egy *Malus x domestica*-ból származó FRG-A4 (AF515627), és a *Pyrus hybrid*-ből származó Ph-Xz1-1 klón (EU939867) szekvencia esetén (**16. ábra**). NCBI azonosító: EF455014.



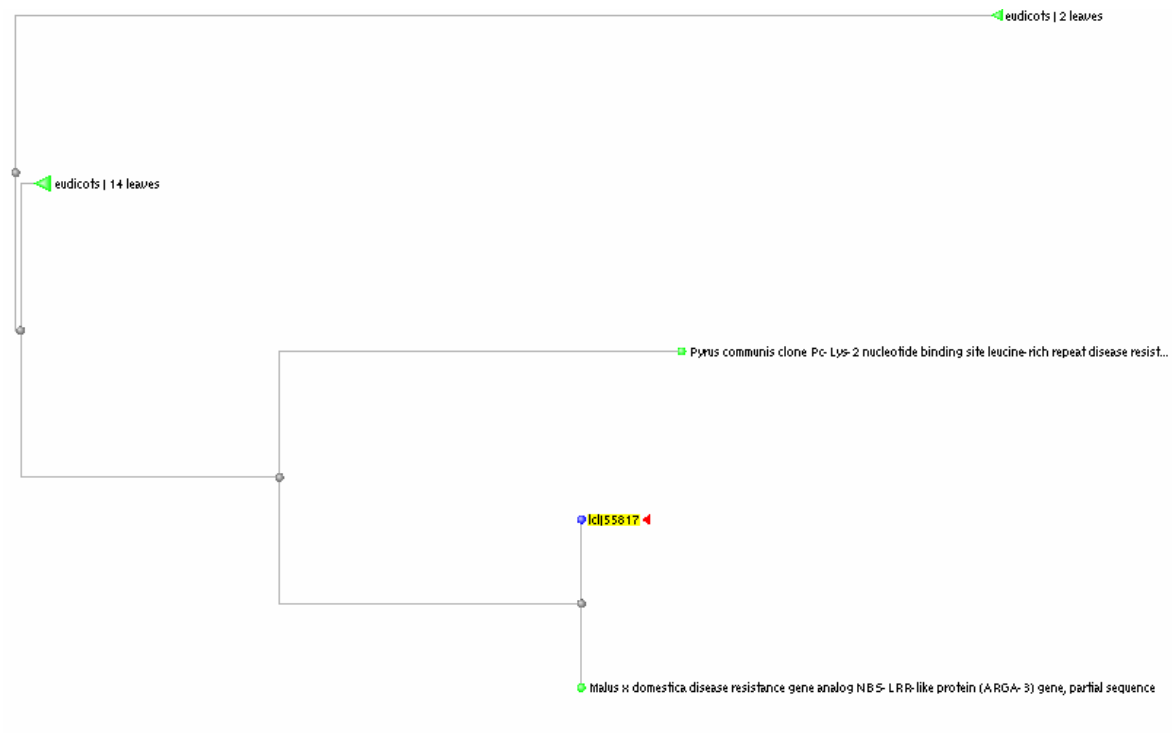
16. ábra: ARGA-2 primerrel kapott DNS fragmentum (825 bp) által kódolt aminosav szekvenciája és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (ARGA-10, ARGA-4, AY363617, AF515627, EU939867). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-3 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-3 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** egy *Pyrus communis* klón, betegség rezisztencia génjével mutatja (egy leucin gazdag Pc-Lys-2 nukleotid kötő rész) a legnagyobb hasonlóságot. A szekvenciát Wang *et al.* (2008) írták le (EU939798), 479 bp hosszúságú szakaszon 446 nukleotid azonos (93%).

Szintén Wang *et al.* izolálták a Pc-Lys-1 rezisztencia fehérje génjét (EU939797), amely a mi fragmentumunk szekvenciájával 491 bp hosszúságú szakaszon 443 nukleotiddal (90%). mutat azonosságot.

Nukleotid szinten 88%-os homológiát azonosítottunk, a *Malus baccata*-ból származó putatív rezisztencia génnel RGA-II46 (Lee *et al.* 2008; AF516650). Ebben az esetben 497 bp hosszúságú szakaszon 439 nukleotid azonos **(17. ábra).**

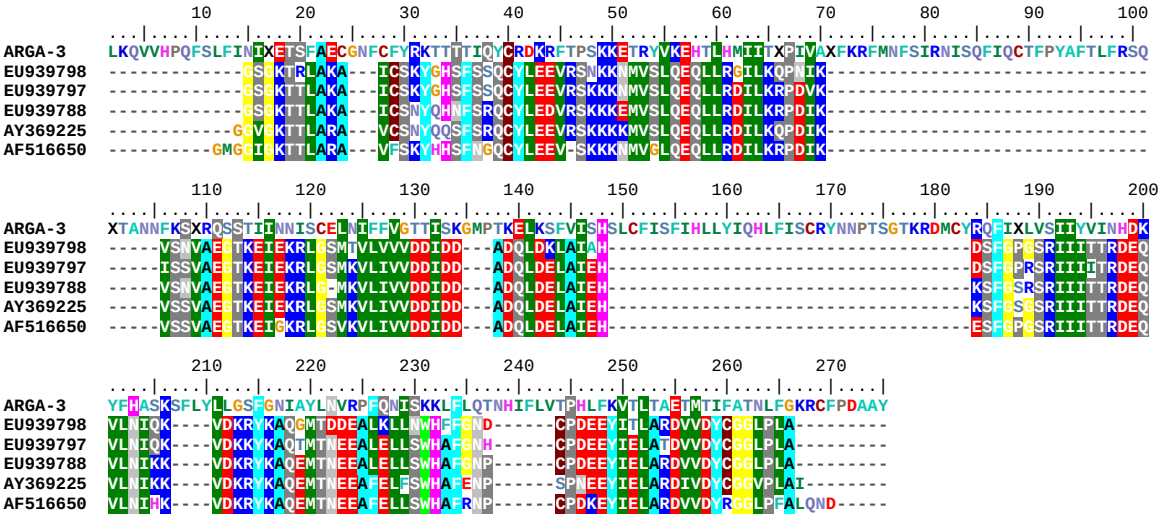


17.ábra: ARGA-3 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-3 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-3 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **aminosav szinten** a korábban említett (ARGA-2) Pc-Lys-1, Pc-Lys-2 és Pc-AjGR-1 klónokkal (Wang *et al.* 2008; EU939788) mutat homológiát. A 159,163 illetve 163 aminosav hosszúságú szakaszon 139 aminosav (87%), 131 aminosav (80%) illetve 126 aminosav (77%) azonos.

Malus esetében az ARGH26 klón (Baldi *et al.* 2004; AY369225) 125 aminosav hosszúságú szakaszán 166 aminosav azonos, amely 75%-os azonosságot jelent.

Lee *et al.* (2003) által leírt RGA-II46 és NBS-LRR rezisztencia gén analógokkal összehasonlítva, szekvenciánk 169 aminosav hosszúságú szakaszán 127 aminosav azonos, amely 75%-os azonosságot jelent (**18. ábra**). NCBI azonosító: EF455015.

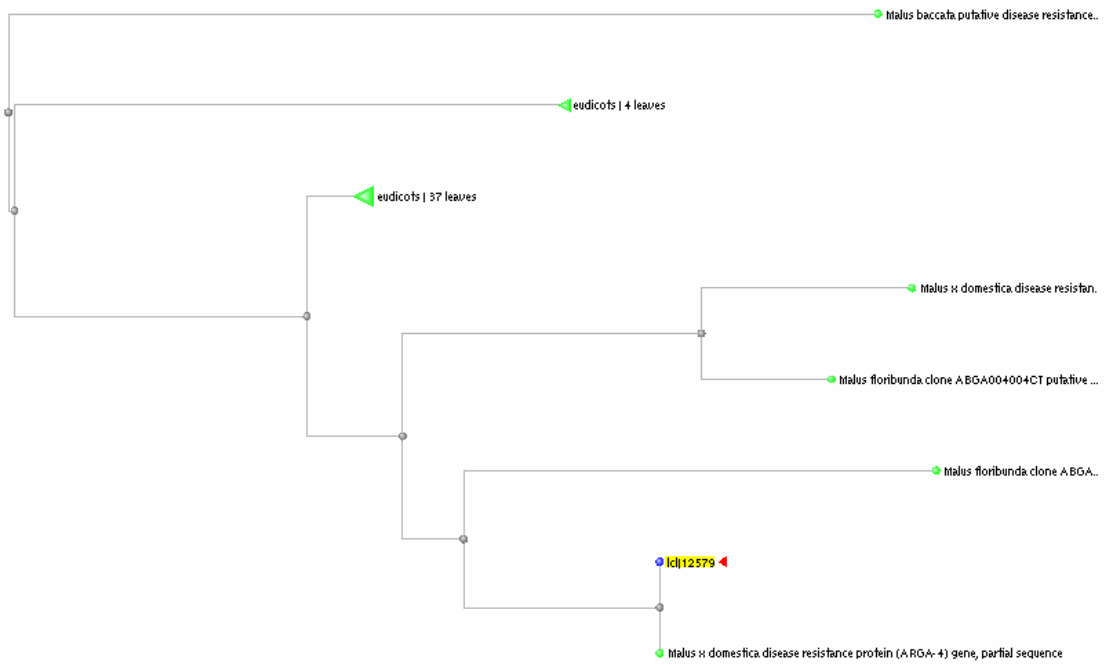


18. ábra: ARGA-3 primerrel kapott DNS fragmentum (826 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (EU939798, EU939797, EU939788, AY369225, AF516650). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-4 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-4 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** az ARGA-26 (92%) (Wichmann *et al.* 2009; FJ477231), ARGA-2 (98%) (Galli *et al.* 2007; EF455014), ARGA-9 (98%) (Wichmann *et al.* 2009, FJ477234) klónok szekvenciájával mutatja a legnagyobb homológiát.

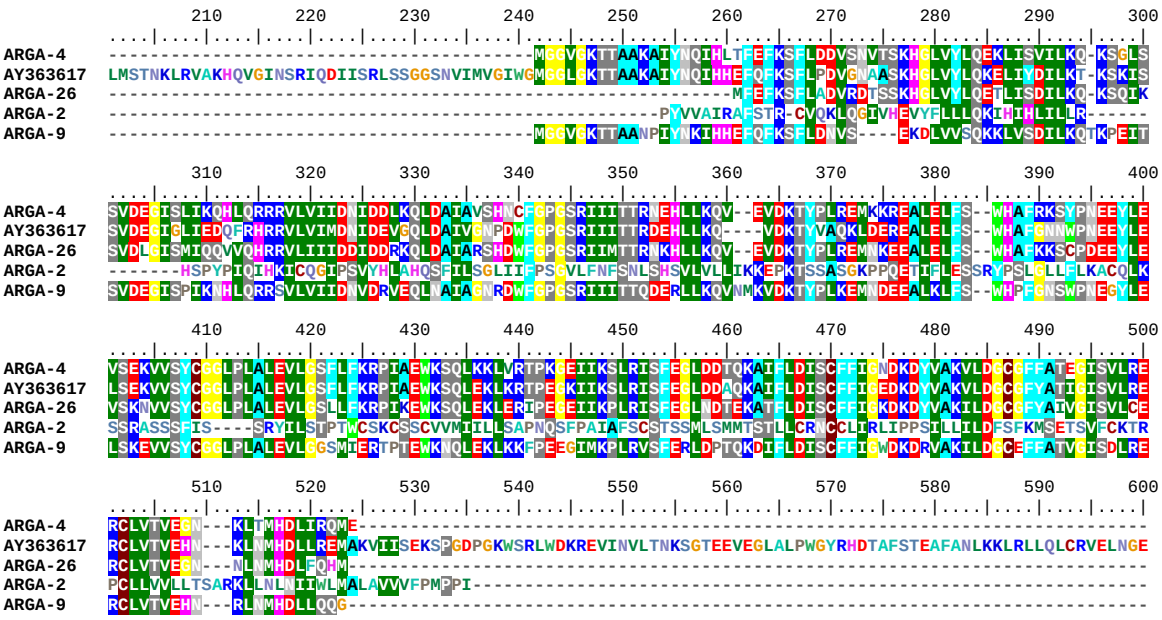
A *Malus baccata*-ban AY363617 jelzés alatt leközölt (Lee *et al.* 2003), TIR-NBS-LRR típusú R7 fehérje, mRNS szekvenciával mutat még igen nagy (99%-os) homológiát. Nagyobb azonosságot találtunk továbbá (91%) egy *Malus floribunda* klón, putatív NBS-LRR betegség rezisztencia fehérje parciális szekvenciájával (Rikkerink *et al.* 2006, DQ644322) **(19. ábra)**.



19. ábra: ARGA-4 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-4 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-4 primerrel kapott fragmentumunk szekvenciája **aminosav szinten** Lee *et al.* (2003) által leközölt TIR-NBS-LRR típusú R fehérje (AY363617) szekvenciával mutat 78%-os hasonlóságot. Az RGA kimutatása során ismert NBS-LRR rezisztencia gének konzervált régióira terveztek degenerált primereket, melyeket klónoztak, mind vad, mind termesztésbe vont fajták esetében. Összesen 11 különböző RGA családot sikerült elkülöníteni, NBS régióikkal. Aminosav szinten az általunk NCBI adatbázisba feltöltött 3 szekvencia (ARGA-26, ARGA-2, ARGA-9) mutatott még hasonlóságot.

Az ARGA-4 fragmentumunk szekvenciája aminosav szinten, nagyfokú hasonlóságot mutatott, ebben a pontban ismertetett ARGA-26, ARGA-2, ARGA-9 fragmentumokéval. Homológiájuk a fent említett sorrendben 79, 75 és 67% volt (**20. ábra**). NCBI azonosító: FJ477235.

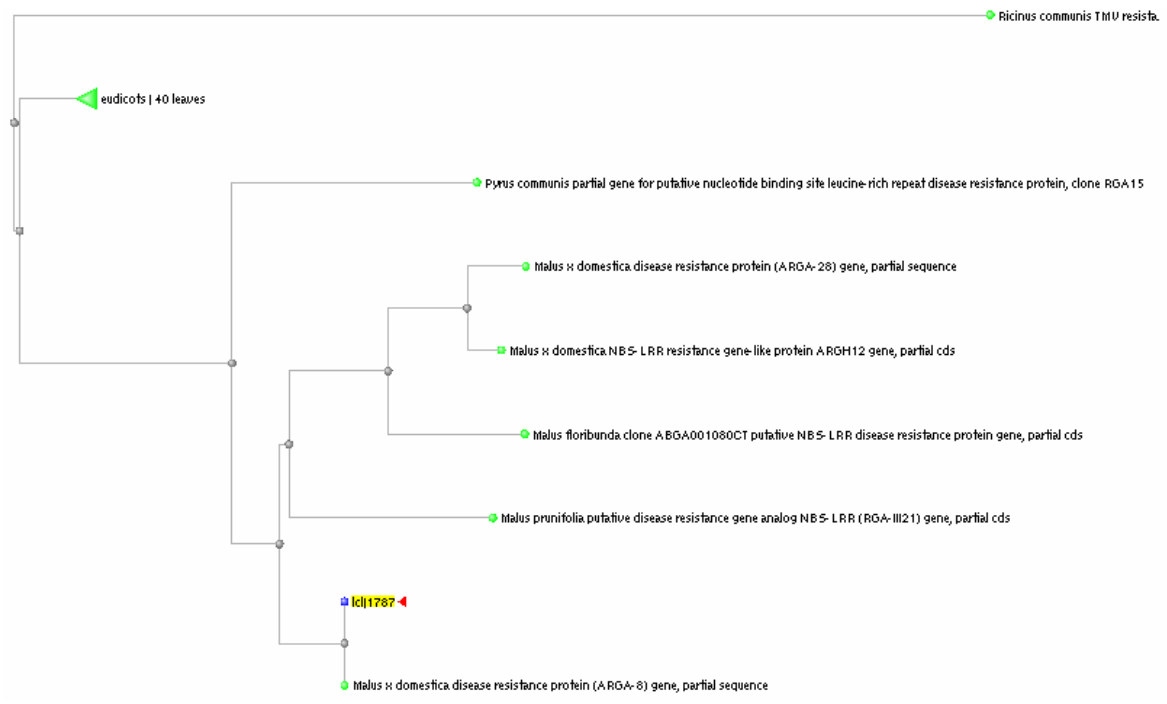


20. ábra: ARGA-4 primerrel kapott DNS fragmentum (826 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (AY363617, ARGA-26, ARGA-2, ARGA-9). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-8 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-8 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** a korábban leírt ARGA-28 (Wichmann *et al.* 2009; FJ477230), NBS-LRR-szerű RGA-val mutatott hasonlóságot a parciális részen, ahol is 92%-ban volt azonos.

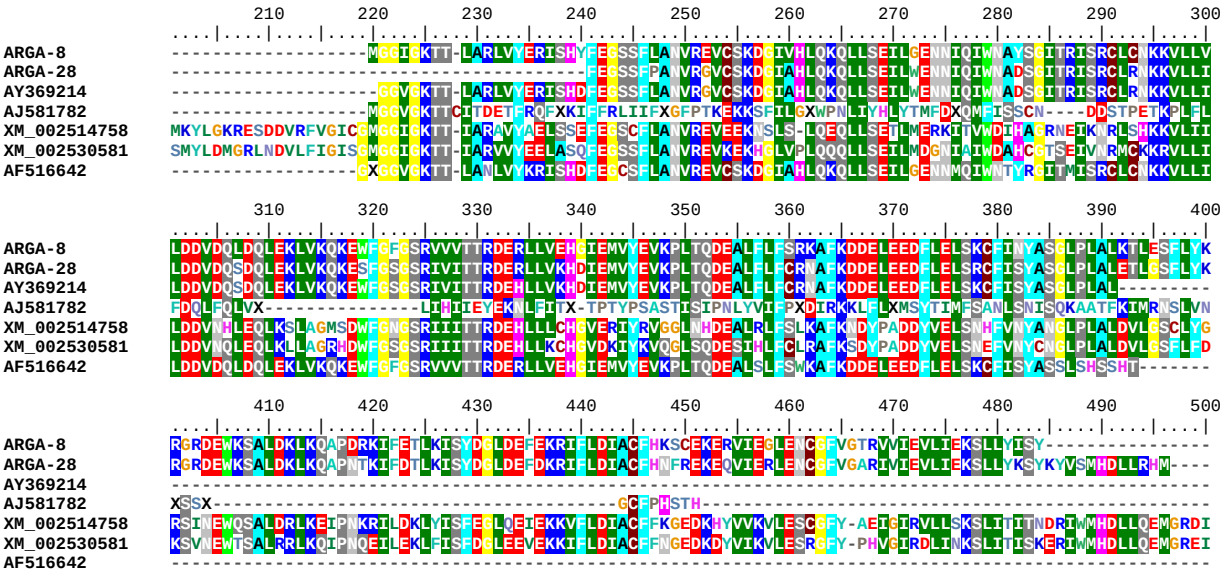
A szekvencia 62%-os azonosságot mutat továbbá, a *Malus domestica*-ból származó AY369214 (Baldi *et al.* 2004) a *Malus prunifolia*-ból származó AF516642 (Lee *et al.* 2003) putatív betegség RGA-val, továbbá különböző *Prunus*-ból származó NBS tartalmú régiókkal. **(21. ábra)**.



21. ábra: ARGA-8 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-8 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-8 primerrel kapott fragmentumunk szekvenciája **aminosav szinten** a szekvencia az általunk korábban leközölt ARGA-28 aminosav szekvenciával mutatja a legnagyobb azonosságot, mert 244 aminosavból 212 azonos (86%).

Az első nem általunk leközölt szekvencia, a már ismertetett AY369214 rezisztencia gén-szerű fehérje egy része (89%-os azonosság). További nagyfokú homológiát mutató szekvenciák a *Pyrus communis*-ból származó RGA15-ös (Afunian 2004) jelzésű putatív nukleotid kötő rész, leucin-gazdag ismétlődésű betegség rezisztencia fehérje (86%). A nagyfokú homológiát mutató szekvenciák között találunk két *Ricinus communis*-ból származó TMV rezisztencia fehérjét is (55, illetve 53% homológia), valamint Lee *et al.* (2008) RGA-III21 jelzésű NBS-LRR RGA-t is (**22. ábra**). A vizsgált szekvencia NCBI azonosító: FJ477236.



22. ábra: ARGA-8 primerrel kapott DNS fragmentum (793 bp) által kódolt aminósov szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (ARGA-28, AY369214, AJ581782, XH_002514758, XH_002530581, AF516642). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-9 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-9 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** az *Malus prunifolia*-ból izolált putatív betegség rezisztencia NBS-LRR gén analóg, RGA-III4-el (Lee *et al*. 2008; AF516641) mutat homológiát, 495 bp hosszúságú szakaszon 476 nukleotid azonos (95%).

A *Pyrus pyrifolia*-ból izolált Pp-Qh-2 betegség rezisztencia fehérje gén (EU939817) szintén homológiát mutat a vizsgált azARGA-9 szekvenciájával. A Wang *et al.* (2008) által izolált klón szekvenciájában 483 bp hosszúságú szakaszon 458 nukleotid azonos (94%) az ARGA-9 klón szekvenciájával. A *Pyrus communis* RGA-16 klónból izolált betegség rezisztencia fehérje génjének (AJ581783) nukleotid sorrendje 93%-ban megegyező (Afunian 2004), mert 503 bp hosszúságú szakaszon 468 nukleotid azonos **(23. ábra)**.

23. ábra: ARGA-9 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-9 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-9 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **aminosav szinten** a *Malus baccata*-ból származó TIR-NBS-LRR típusú R 7 fehérje (Lee *et al.* 2003; AY363617) génbanki szekvenciával mutat homológiát, 276 aminosav hosszúságú szakaszon 188 aminosav (68%) azonos.

Az általunk NCBI adatbázisba feltöltött (Wichmann *et al.* 2009; EF455016, EF455014) ARGA-4 klón szekvenciájával összehasonlítva, (276 aminosav hosszúságú szakaszon 187 aminosav azonos, ami 67%). Az ARGA-2 fragmentum szekvenciájával (209 aminosav hosszúságú szakaszon 138 aminosav azonos), ami 66% egyezőséget jelent.

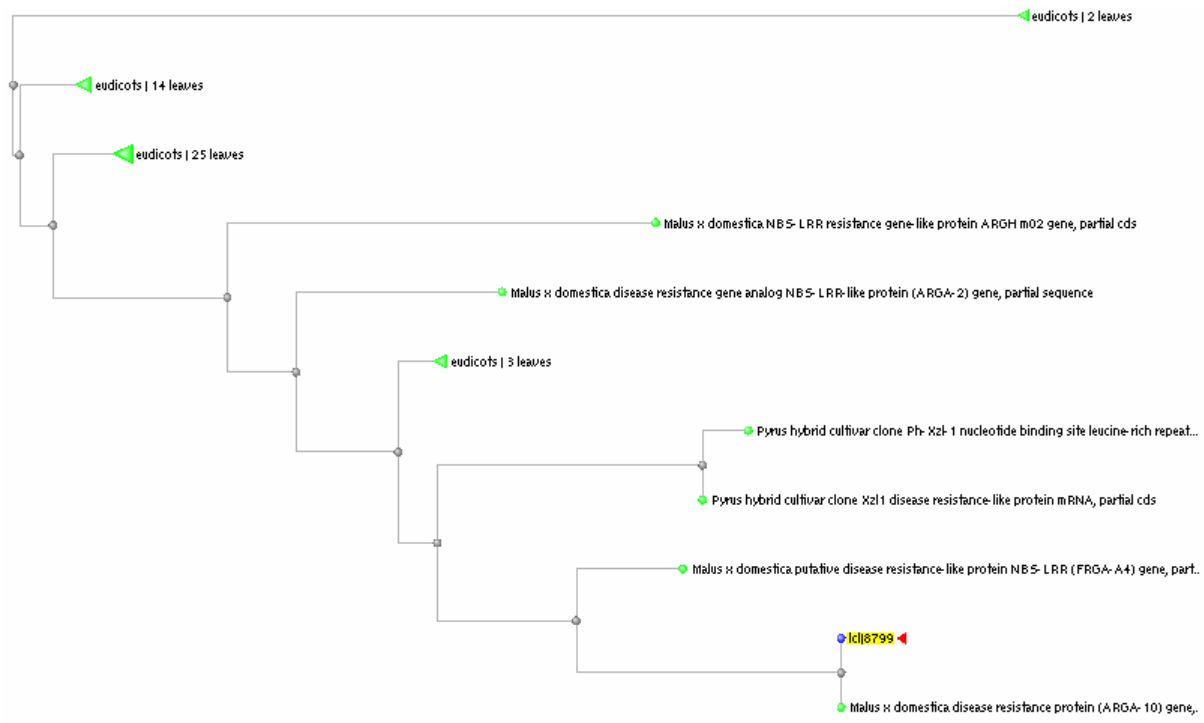
A *Malus prunifolia*-ból származó putatív betegség rezisztencia NBS-LRR gén analóggal (Lee *et al.* 2008; AF516641) mutat még nagyfokú azonosságot egy 165 tagú aminosav szekvencia részleten 153 aminosav azonos (92%). Számos egyéb *Pyrus* csoportba sorolható RGA-val is nagyfokú azonosságot mutat (**24. ábra**). NCBI azonosító: FJ477234.

24. ábra: ARGA-9 primerrel kapott DNS fragmentum (745 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (AY363617, ARGA-4, ARGA-2, AF516641). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-10 primerrel kapott DNS fragementum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-10 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** a 825 bp hosszúságú korábban általunk az NCBI adatbázisba feltöltött (Galli *et al.* 2005) *Malus domestica* NBS-LRR-szerű betegség rezisztencia gén analógjával ARGA-2 mutatja a legnagyobb homológiát egy 572 nukleotidos szakaszon, ahol 531 nukleotid azonos (92%). Az általunk leközölt további RGA jelöltek közül az ARGA-4, ARGA-26 és ARGA-9-el mutat 84%-os homológiát **(25. ábra)**.

Nagyfokú homológia figyelhető meg továbbá, a *Malus baccata*-ból származó TIR-NBS-LRR típusú R7 fehérjével (Lee *et al.* 2003; AY363617), egy 572 nukleotidnyi szakaszon 496 nukleotid azonos.



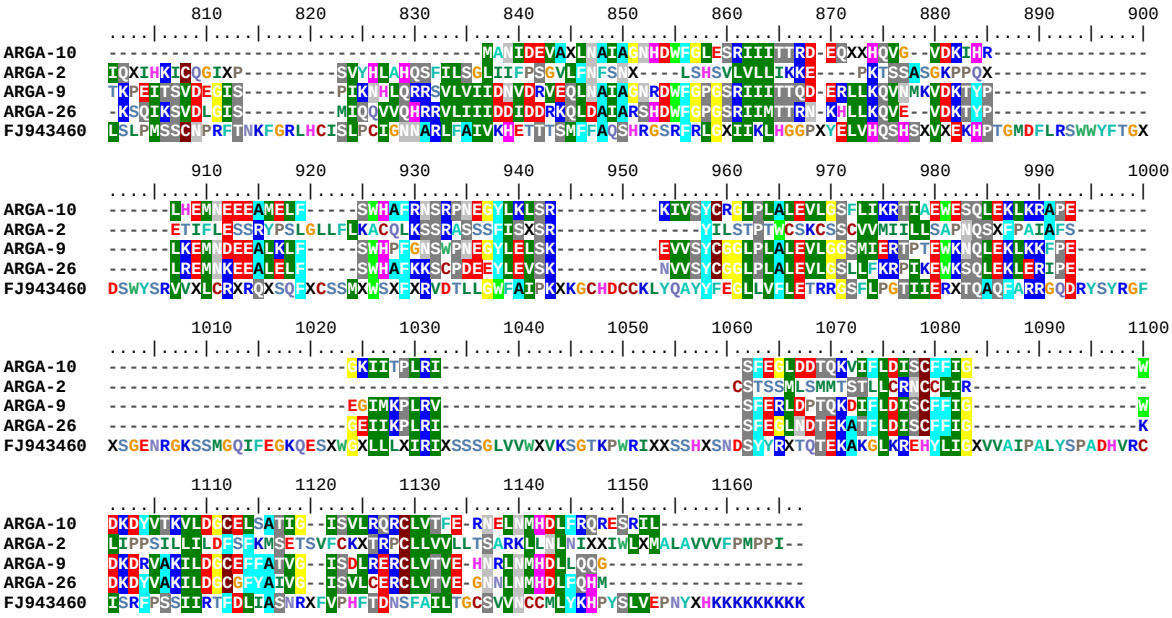
25. ábra: ARGA-10 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-10 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-10 primerrel kapott fragmentumunk szekvenciája **aminosav szinten** szintén az általunk az NCBI adatbázisba leközölt ARGA-2-vel mutat nagyfokú homológiát egy 129 aminosav hosszúságú szakaszon 108 aminosav megegyezik (83%).

A *Malus baccata*-ból származó TIR-NBS-LRR típusú R 7 fehérjével (Lee *et al.* 2003; AY363617) mutatott még hasonlóságot egy 200 aminosav hosszúságú szakaszon, ahol is 144 aminosav azonos (72%).

A vizsgált szekvencia az NCBI adatbázisba feltöltött (Wichmann *et al.* 2009; FJ477234, EF455014, FJ477231) RGA jelöltekkel mutat azonosságot: ARGA-4 (194 aminosavból 137 azonos, tehát 70%-os homológia), ARGA-9 (194 aminosavból 133 azonos, tehát 68%-os homológia), ARGA-26 (185 aminosavból 127 azonos, tehát 68%-os homológia).

Az első nem *Malus*-ból származó aminosav szekvencia egy *Pyrus x bretschneideri* klónból származó TIR-NBS-LRR-típusú betegség rezisztencia-szerű fehérje mRNS-e (Wang *et al.* 2009; FJ943460) (198 aminosavból 119 azonos, tehát 60%-os homológia) (**26. ábra**). NCBI azonosító: FJ477237.

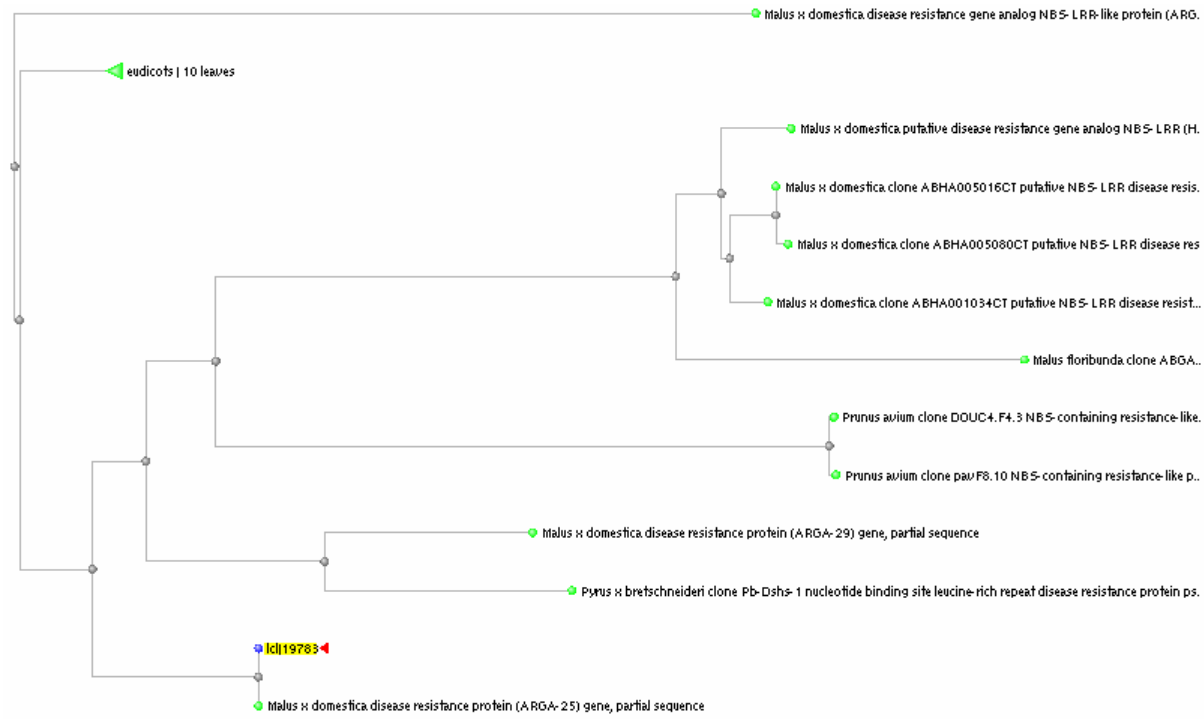


26. ábra: ARGA-10 primerrel kapott DNS fragmentum (602 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (ARGA-2, ARGA-9, ARGA-26). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-25 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

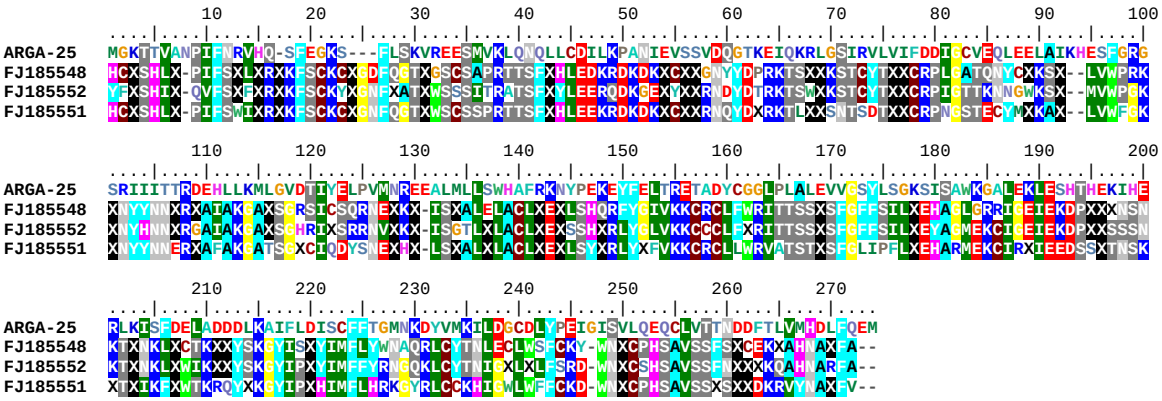
Az ARGA-25 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** a 823 bp hosszú, általunk az NCBI adatbázisba feltöltött ARGA-29-el (Wichmann *et al.* 2009; FJ477232), mutatott nagyfokú homológiát, 777 nukleotidnyi szakaszon, ahol is 672 nukleotid azonos (86%). Hasonló méretű homológia figyelhető meg a 768 bp hosszúságú *Pyrus x bretschneideri* Pb-Dshs-1 (Wang *et al.* 2008; EU939772) nukleotid kötő leucine-gazdag ismétlődésű betegség rezisztencia fehérje pseudogénjével, ahol a homológia egy 497 nukleotidnyi szakszon 432 nukleotid azonosságot mutat (86%).

Két esetben találtunk 88%-os homológiát: a 445 bp hosszúságú nukleotid szakaszon a *Malus x domestica* NBS-LRR rezisztencia génszerű fehérje (Baldi *et al.* 2004; ARGH46) génjével, illetve a 433 nukleotid szakaszon a *Malus x domestica* NBS-LRR rezisztencia génszerű fehérje (Lee *et al.* 2008; HRGA-H10) génjével **(27. ábra)**.



27. ábra: ARGA-25 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-25 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-25 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **aminosav szinten** nagyfokú homológiát (71%) mutat, az általunk az NCBI adatbázisba feltöltött ARGA-29 szekvenciájával (269 aminosav hosszúságú szakaszon, ahol is 193 aminosav azonos). Hasonlóságot mutat továbbá, Pilotti *et al.* (2009) *Corylus avellana*-ból származó rezisztencia-szerű fehérjék génjeivel: cav.w.TirII.154 (FJ185548) (53%), cav.w.TirII.160 (FJ185552) (50%), valamint cav.w.TirII.159 (51%) (**28. ábra**). NCBI azonosító: FJ477238.



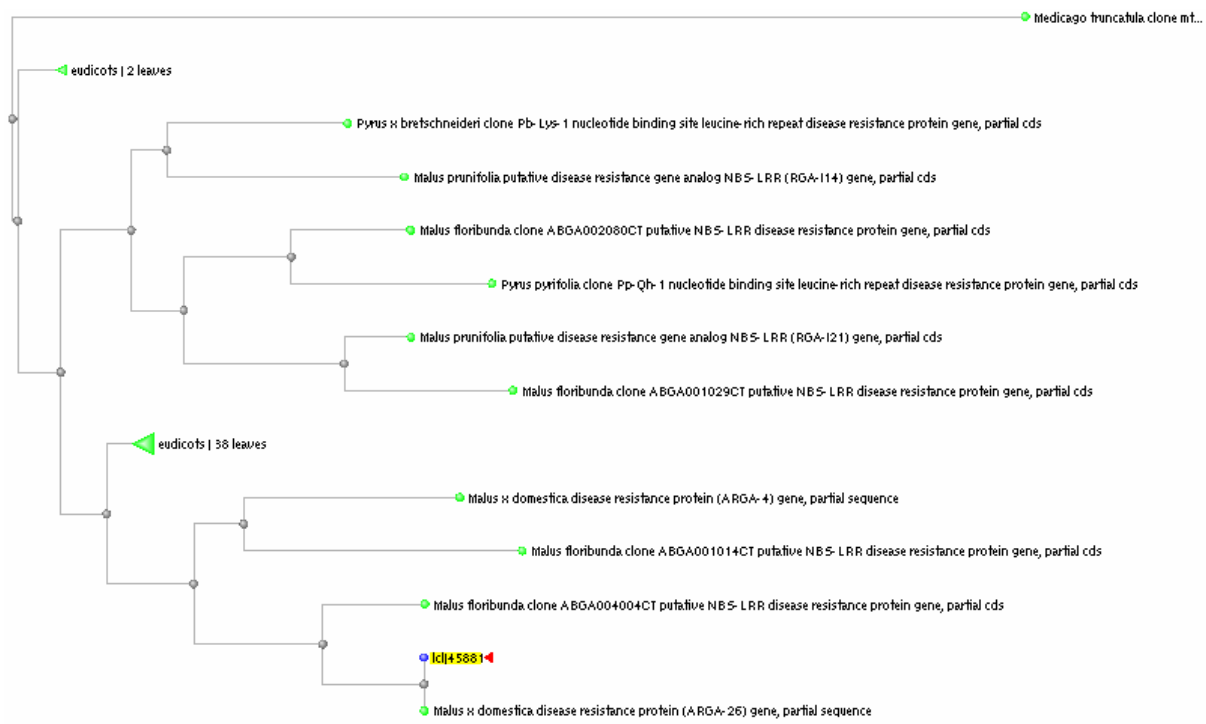
28. ábra: ARGA-25 primerrel kapott DNS fragmentum (810 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (FJ185548, FJ185552, FJ185551). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-26 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-26 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** az általunk az NCBI adatbázisba feltöltött (Wichmann *et al.* 2009; FJ477235) 826 bp hosszúságú ARGA-4-el mutatta a legnagyobb homológiát (88%) egy 772 nukleotid hosszúságú szakaszon, alacsonyabb érték volt kimutatható ARGA-2 (84%) és ARGA-9 (82%) RGA jelöltek esetében.

A *Malus baccata*-ból izolált TIR-NBS-LRR típusú R 7 fehérje mRNS-sel, 761 nukleotid hosszúságú szakaszon 651 bp volt azonos (85%) (Lee *et al.* 2003; AY363617).

Rikkerink *et al.* (2006) által publikált *Malus floribunda*-ból izolált ABGA004004CT (DQ644390) putatív NBS-LRR betegség rezisztencia gén, 436 nukleotid hosszúságú szakaszon 418 bp egyezőséget mutatott (95%) **(29. ábra)**.

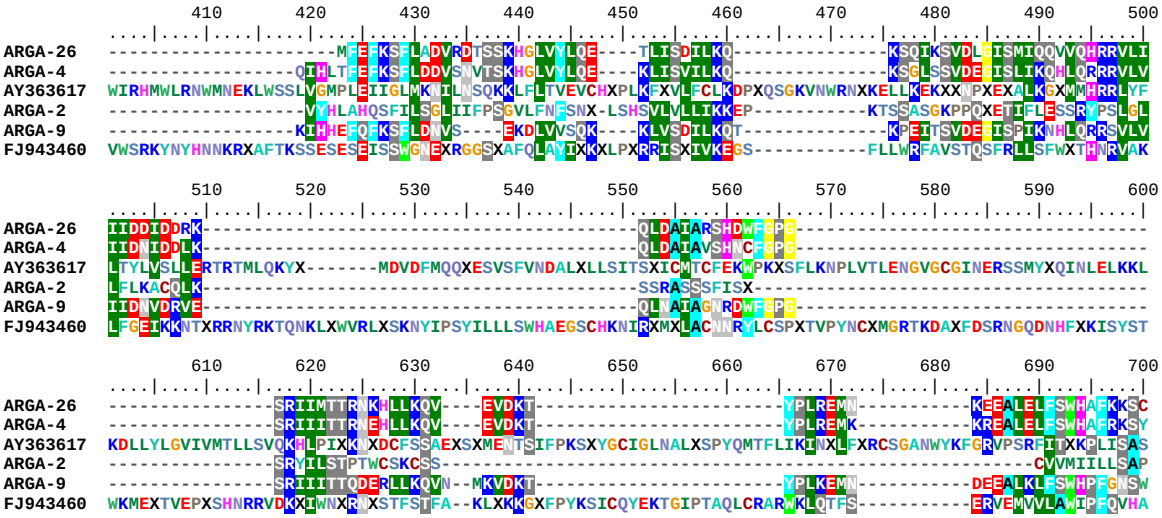


29. ábra: ARGA-26 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-26 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-26 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **aminosav szinten** az általunk az NCBI adatbázisba feltöltött és nukleotid szinten is a legnagyobb homológiát mutató ARGA-4 el mutatta a legnagyobb azonosságot. 254 aminosav hosszúságú szakaszon 202 aminosav volt azonos (79%). Nagyfokú homológiáról számolhatunk be a nukleinsav szinten történt összehasonlításban már említett ARGA-2 (68%) és ARGA-9 (65%) esetében is.

A *Malus baccata*-ból származó TIR-NBS-LRR típusú R 7 fehérje, ahol 254 aminosav hosszúságú szakaszán 183 volt azonos (72%).

Az első nem *Malus*-ból származó aminosav szekvencia egy *Pyrus x bretschneideri* klónból származó TIR-NBS-LRR-típusú betegség rezisztencia-szerű fehérje mRNS-e (Wang *et al.* 2009; FJ943460) (254 aminosavból 154 azonos, tehát 60%-os homológia) (**30. ábra**). NCBI azonosító: FJ477231.



30. ábra: ARGA-26 primerrel kapott DNS fragmentum (720 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (ARGA-4, AY363617, ARGA-2, ARGA-9). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

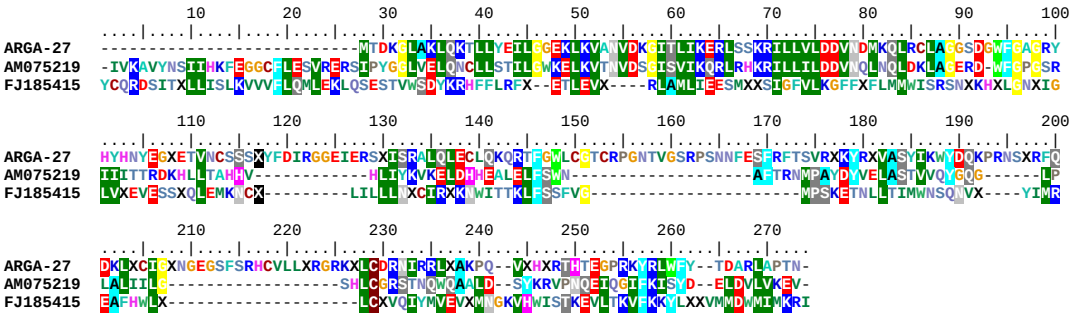
ARGA-27 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-27 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** a 390 bp hosszúságú *Rosa* hybrid részleges brp14 génjével (Hattendorf 2007; AM075222) mutat hasonlóságot (295 bp 390 bp-ből ami 75%-os homológia). A szekvencia putatív TIR-NBS-LRR rezisztencia gén **(31. ábra)**.

31. ábra: ARGA-27 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-27 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-27 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **aminosav szinten** a *Rosa* hybrid putative NBS-LRR rezisztencia fehérjével mutatta a legnagyobb hasonlóságot két szakaszon is. Egy 67 aminosav hosszúságú szakszon 41 aminosav volt azonos (64%), míg egy 119 aminosav hosszúságú szakaszon 46 volt azonos (38%).

A *Corylus avellana*-ból izolált cav.tr.M3.56 NBS régiót tartalmazó rezisztencia szerű fehérje gén (Pilotti *et al.* 2009; FJ185415) mutatott még nagyobbfokú homológiát két szakaszon is, az első szakaszon amely 68 aminosav hosszúságú 41 aminosav azonos (60%), míg a másik szakaszon 86 aminosavból 36 aminosav azonos (41%) (**32. ábra**). NCBI azonosító: FJ477232.



32. ábra: ARGA-27 primerrel kapott DNS fragmentum (728 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (AH075219, FJ185415). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-28 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

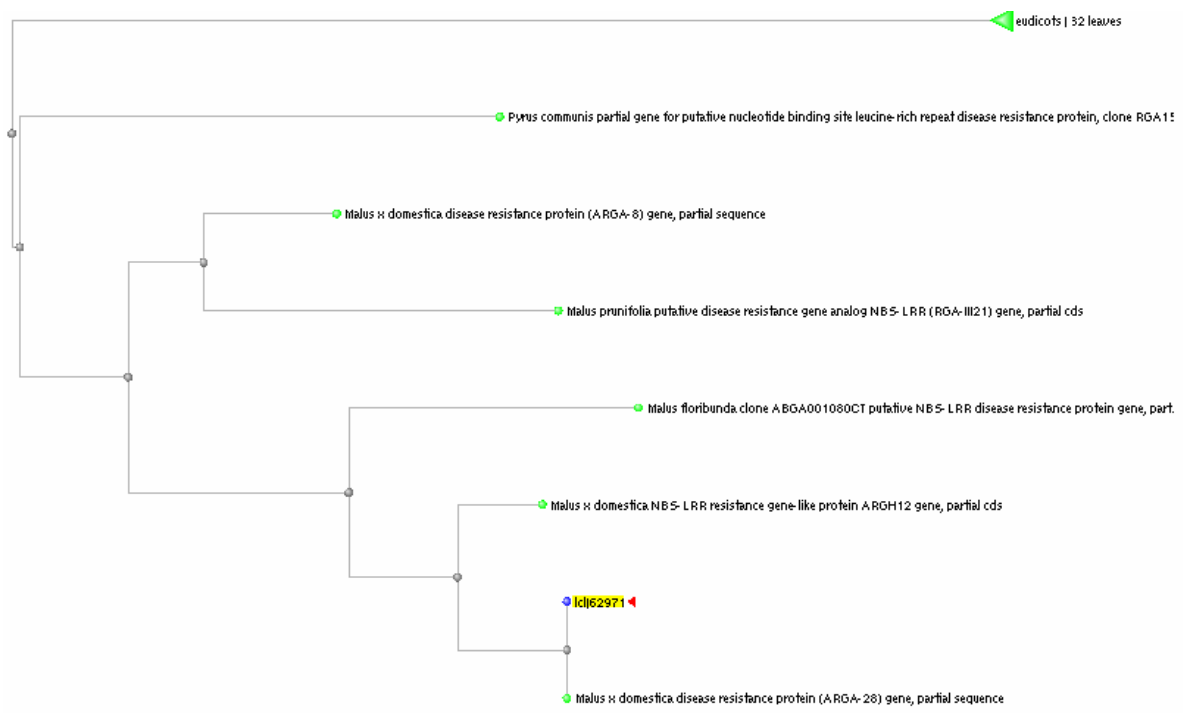
Az ARGA-28 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** az általunk az NCBI adatbázisba feltöltött ARGA-8-os szekvenciával mutatja a legnagyobb azonosságot, 733 bp hosszúságú szakaszon 695 nukleotid azonos (94%) (Wichmann *et al.* 2009; FJ477236).

Ezt követi Baldi *et al.* (2004) által leírt, 512 bp hosszúságú *Malus domestica* NBS-LRR rezisztencia gén-szerű fehérje ARGH12 génje (AY369214), melynek 449 bp méretű szakszán 442 nukleotid azonos (98%).

A 472 bp hosszúságú *Malus floribunda* ABGA001080CT jelű klón putatív NBS-LRR betegség rezisztencia fehérje génjével (Rikkerink *et al.* 2006; DQ644342) is mutat hasonlóságot, mert 436 bp hosszúságú szakaszon 416 nukleotid az egyezőség (95%).

A *Malus prunifolia*-ból izolált putatív rezisztencia gén (Lee *et al.* 2003; RGA-III21) csak ezután következik. Ebben az esetben 441 bp-os szakaszon 410 nukleotid azonos (92%).

Az első nem *Malus* eredetű szekvencia a *Pyrus communis*-ból izolált leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó RGA15 betegség rezisztencia fehérje klón (CAE46654). A szekvenciát Afunian izolálta 2004-ben, valamint a 450 bp hosszúságú szakaszon 410 nukleotid azonos (91%). Nukleotid szintű azonosságban, ezt követően *Pyrus avium*, *Pyrus cerasus*, *Pyrus serrulata*-ból izolált rezisztencia gének következnek **(33. ábra)**.

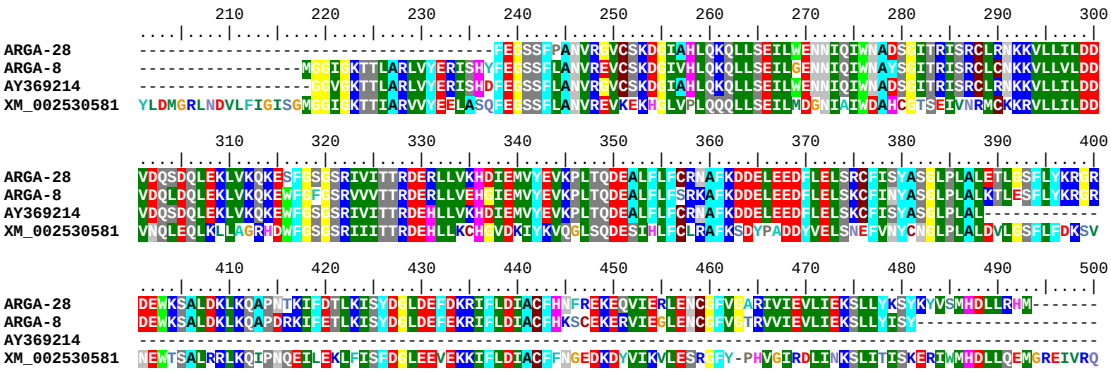


33. ábra: ARGA-28 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-28 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-28 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **aminosav szinten**, a nukleotid szintű összehasonlításnál is említett ARGA-8-al mutatja a legnagyobb hasonlóságot, 244 aminosav hosszúságú szakaszon 212 aminosav azonos (86%).

A *Malus domestica*-ból izolált NBS-LRR rezisztencia gén-szerű fehérje ARGH12-al mutat nagyarányú (97%-os) homológiát, mellyel egy 151 aminosav hosszúságú szakaszon 147 aminosav azonos.

Egy rövidebb szakaszon a *Pyrus communis*-ból származó rezisztencia fehérjével mutatt nagy homológiát (82%). Ezt követően már csak kisebb homológiát mutató szekvenciákat találtunk, melyek közül a legnagyobb azonosságot a *Ricinus communis*-ból izolált TMV rezistencia fehérje mutatja (Chan *et al.* 2008; XM_002530581), amely egy 256 aminosavból álló szakaszon 136 aminosav egyezőséget mutatott (53%) (**34. ábra**). NCBI azonosító: FJ477230.



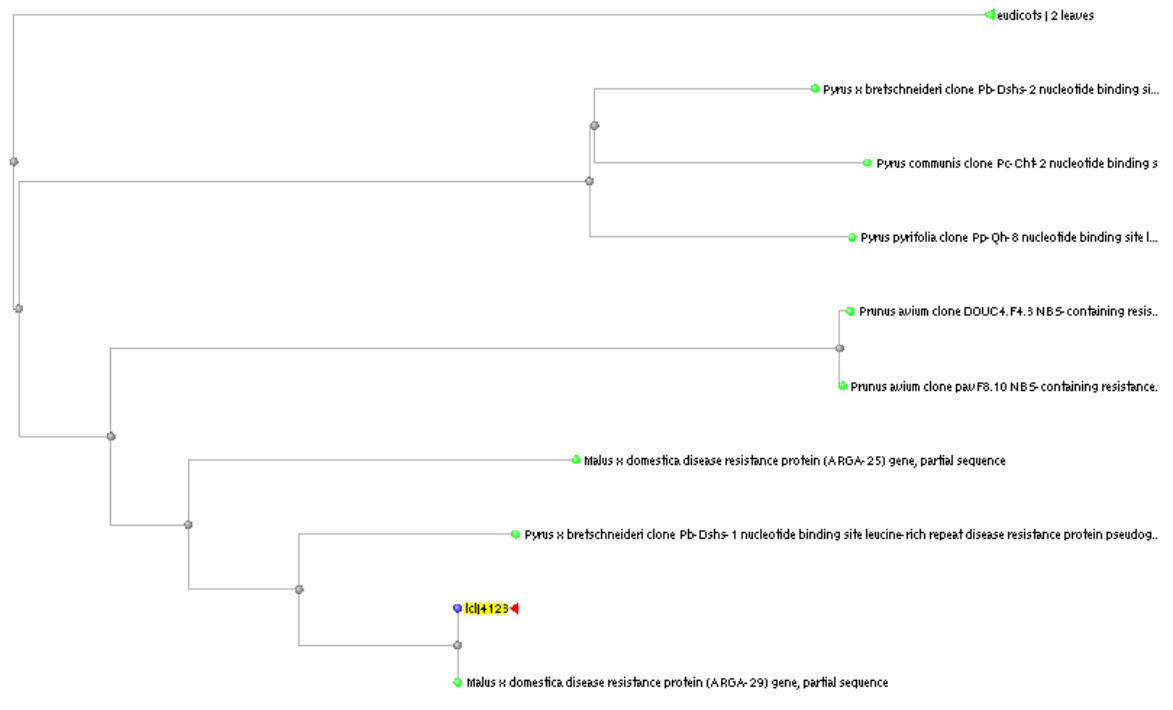
34. ábra: ARGA-28 primerrel kapott DNS fragmentum (745 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (ARGA-8, AY369214, XH_002530581). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

ARGA-29 primerrel kapott DNS fragmentum szekvenciájának értékelése:

Az ARGA-29 primerrel kapott fragmentum szekvenciája **nukleotid szinten** a legnagyobb homológiát az általunk az NCBI adatbázisba feltöltött ARGA-25 szekvenciával mutatja, 777 bp hosszúságú szakaszon 672 nukleotid azonos (86%) (Wichmann *et al.* 2009; FJ477238)..

A 768 bp hosszúságú *Pyrus x bretschneideri* klónból származó Pb-Dshs-1 leucine-gazdag ismétlődés rezisztencia fehérjének pseudogénjével is nagyarányú hasonlóságot találunk (Wang *et al.* 2008; EU939772), egy 500 bp hosszúságú szakaszon 461 nukleotid azonos (92%). Érdekességképpen az azonosság keresésekor szinte csak *Pyrus* és *Prunus* nemzetségekből találhatók szekvenciák.

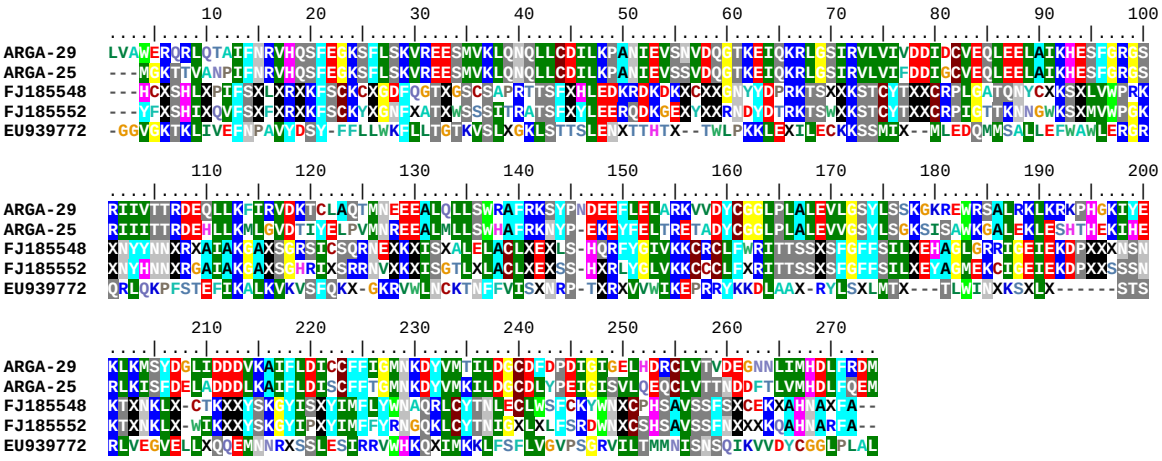
Malus szekvencia hasonlóságot a *Malus x domestica* putative betegség rezisztencia gén analóg NBS-LRR (Lee *et al.* 2003; FRGA-A7) génje adta (73%) **(35. ábra)**.



35. ábra: ARGA-29 primerrel kapott DNS fragmentum és az NCBI adatbankban található RGA jelöltek, nukleotid szekvenciái alapján készített dendrogram. ARGA-29 sárga jelöléssel látható.

Az ARGA-29 primerrel kapott fragmentumunk szekvenciája a**minosav szinten** az általunk leközölt ARGA-25 klón szekvenciájával mutatja a legnagyobb homológiát (71%).

A *Corylus avellana*-ból származó cav.w.TirII.154 és 160 (Pilotti *et al.* 2009; FJ185548 és FJ185552) részleges szekvenciák, melyek egy 265 illetve 268 aminosav hosszúságú szakaszon 149 illetve 146 aminosavban egyeznek meg a vizsgált szekvenciával (56%, 54%). A legnagyobb hasonlóságot mutató aminosav szekvenciák között találunk még *Pyrus bretschneideri*-ből izolált Pb-Dshs-1 jelű klónt, amely esetében 156 aminosav hosszúságú szakaszon 133 aminosav azonos (85%) (**36. ábra**). NCBI azonosító: FJ477232.



36. ábra: ARGA-29 primerrel kapott DNS fragmentum (823 bp) által kódolt aminosav szekvencia és ahhoz hasonló szekvenciák az NCBI adatbankban tárolt RGA jelöltekben (ARGA-25, FJ185548, FJ185552, EU939772). Hasonlóság mértéke színnel jelölve.

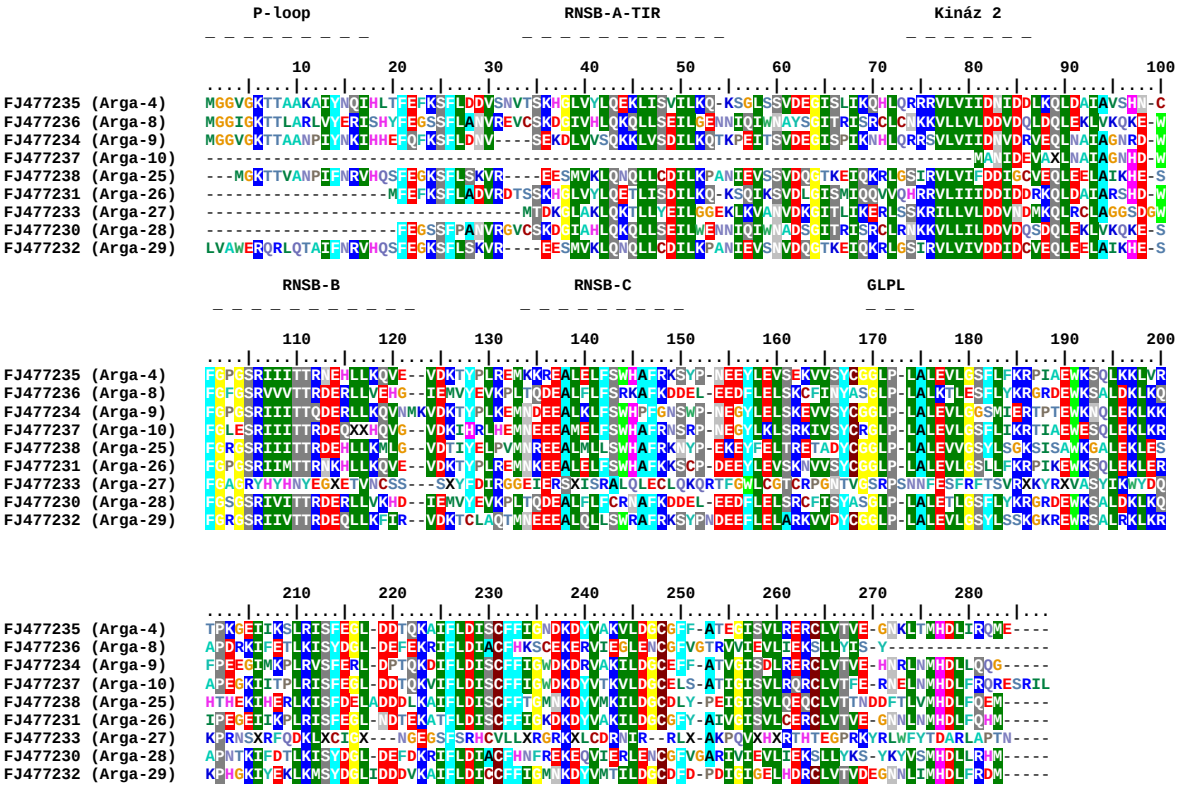
A leközölt RGA jelöltek az NCBI weboldalon is megtalálhatóak. Összegezve az általunk leközölt RGA-k NCBI azonosítói: EF455013-EF455017 valamint FJ477230-FJ477238.

4.1.5. Saját és az irodalomban közölt Malus RGA szekvenciák bioinformatikai elemzése

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az NB-ARC domének minden esetben megtalálhatók e, aminosav szekvenciáinkban, az NCBI adatbankból kigyűjtöttük az összes *Malus* RGA szekvenciát (Lee *et al.* 2003; Baldi *et al.* 2004; Galli *et al.* 2005; Wichmann *et al.* 2007). A 101 különböző szekvencia összehasonlítása során a funkcionális motívumok megléte, illetve hiánya értékelhető volt (**4. Melléklet**). A korábban publikált RGA-k (Galli *et al.* 2005; NCBI azonosító: EF455013-EF455017), más RGA-kal mutatott hasonlóságuk ellenére, nem tartalmazzák azokat a motívumokat, melyek eddigi ismereteink szerint a rezisztencia kialakulásáért és mértékéért felelősek. Ezeket az RGA jelölteket ezért a mellékletben nem szerepeltettük.

Az előző pontban (**4.1.4. pont**) bemutatott potenciális RGA (FJ477230-FJ477238) jelöltünk rezisztenciáért felelős motívumai (P-loop, RNSB-A, Kináz-2, RNSB-B, RNSB-C, GLPL) és aminosav szekvenciái nagyfokú homológiát mutatnak a korábban

közölt RGA-kal (**4. Melléklet**). A **37. ábra** szemlélteti, hogy a fent említett motívumok milyen megoszlásban is szerepelnek a különböző RGA jelöltjeinkben.



37. ábra: A kísérleteinkben izolált rezisztenciagén analóg DNS szekvenciák (RGA jelöltek) funkcionális elemeinek összehasonlítása. A hasonlóság mértéke színnel jelölve.

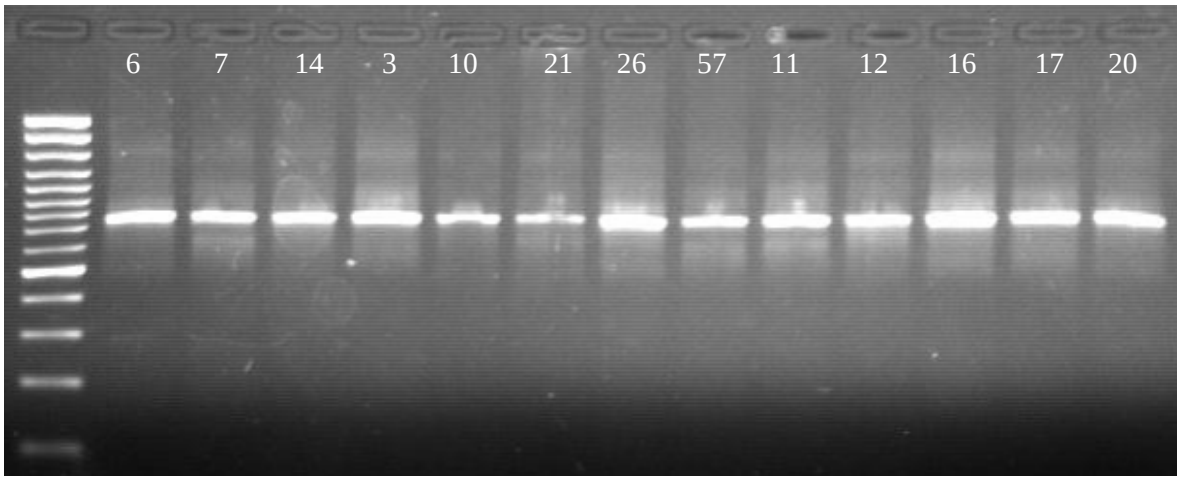
Összefoglalva megállapítható, hogy kísérleteink során kapott 9 DNS fragmentumunkban (RGA jelöltünkben) az NB-ARC domének – melyek a rezisztencia gén termékekben konzervatív szakaszként jelennek meg – minden esetben megtalálhatók, és nagyfokú azonosságot (homilógiát) mutatnak.

4.1.6. SCAR markerek tesztelése

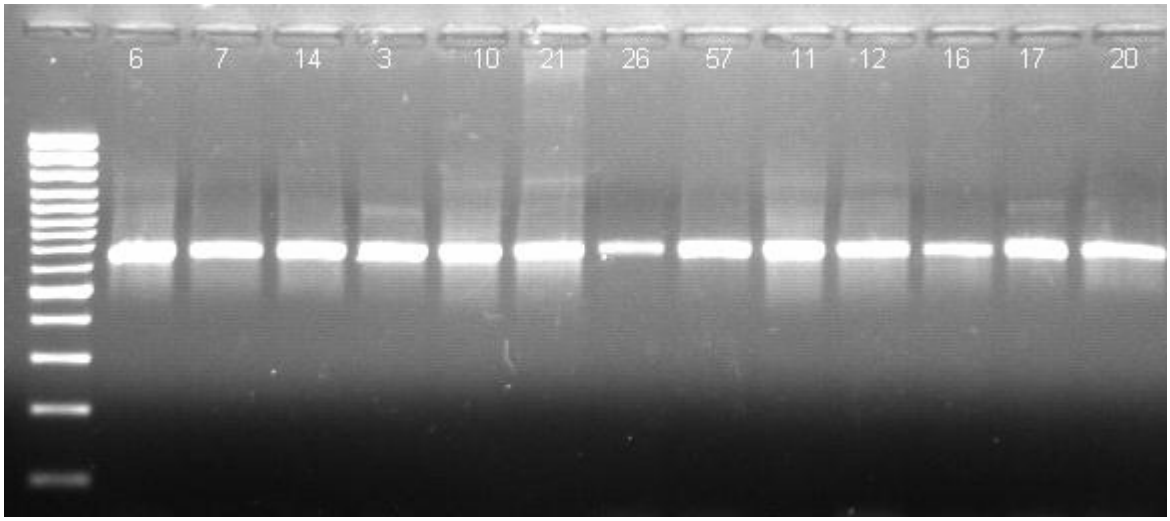
Miután bizonyítottuk, hogy RGA fragmentumaink valóban a rezisztencia géneknek megfelelő doménekkel rendelkeznek, megpróbáltuk azokat kimutatni a rezisztens fajtákban, illetve alkalmazásukkal a rezisztens és fogékony fajtákat elkülöníteni. Ennek érdekében mind a 9 szekvenciát SCAR markerré konvertáltuk.

A SCAR primerekkel kapott eredmények közül, csak az Arga 27, Arga 29, Arga 9, illetve Arga 4-es primerek kapott eredményeket mutatjuk be (**38-40. ábrák)**. A többi

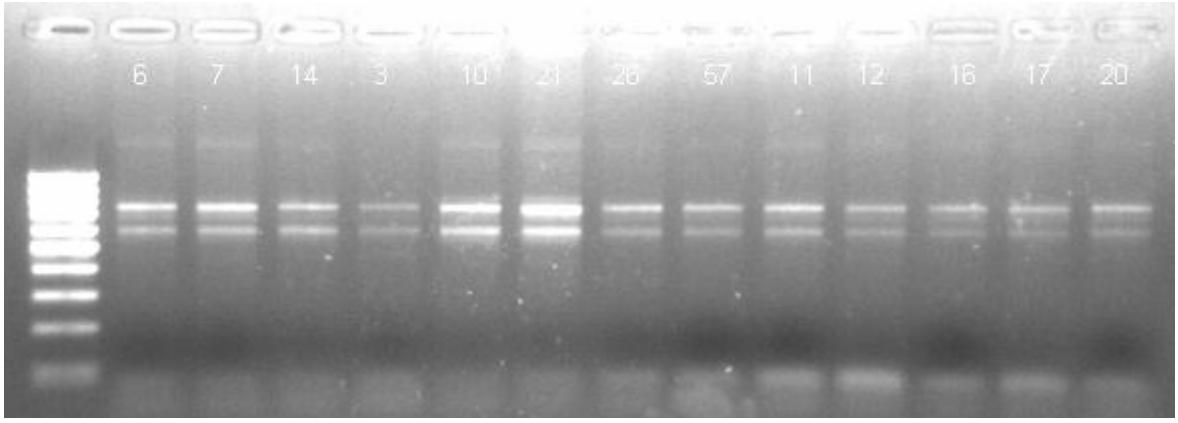
primer esetében ugyanis nem sikerült a fogékony (’Gala’, ’Jonagold’), bizonyos betegségre fogékony, másokra inkább toleráns (’Golden Delicious’, ’Red Rome van Well’), illetve rezisztens (’Reanda’, ’Remo’, ’Liberty’) fajtákat elkülöníteni.



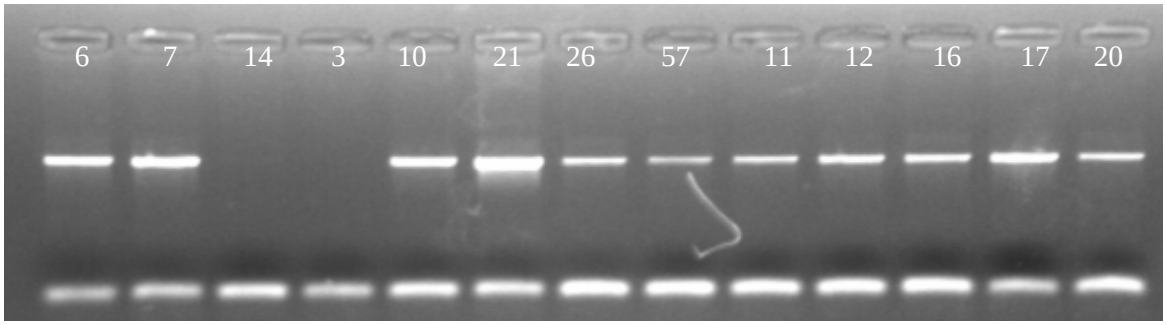
38. ábra: Almafajták Arga 27-es primer alkalmazásával kapott PCR eredménye. Sorrend: Reanda (6, 7); Remo (14, 3); Liberty (10, 21);Golden Delicious (26, 57); Red Rome van Well (11, 12); Gala (16, 17); Jonagold (20)



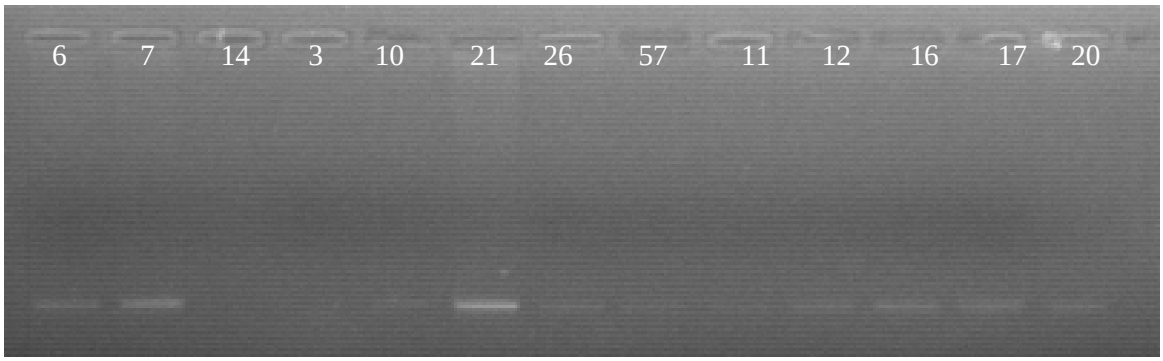
39. ábra: Almafajták Arga 29-es primer alkalmazásával kapott PCR eredménye. Sorrend: Reanda (6, 7); Remo (14, 3); Liberty (10, 21); Golden Delicious (26, 57); Red Rome van Well (11, 12); Gala (16, 17); Jonagold (20)



40. ábra: Almafajták Arga 9-es primer alkalmazásával kapott PCR eredménye. Sorrend: Reanda (6, 7); Remo (14, 3); Liberty (10, 21); Golden Delicious (26, 57); Red Rome van Well (11, 12); Gala (16, 17); Jonagold (20)



41. ábra: Almafajták Arga 4-es primer alkalmazásával kapott PCR eredménye. Sorrend: Reanda (6, 7); Remo (14, 3); Liberty (10, 21); Golden Delicious (26, 57); Red Rome van Well (11, 12); Gala (16, 17); Jonagold (20)



42. ábra: Almafajták Arga 4-es primer alkalmazásával kapott csökkentett ciklus számú PCR eredménye. Sorrend: Reanda (6, 7); Remo (14, 3); Liberty (10, 21); Golden Delicious (26, 57); Red Rome van Well (11, 12); Gala (16, 17); Jonagold (20)

A 38-40. ábrák bizonyítják, hogy nem sikerült csak a rezisztens fajtákra jellemző fragmentumot felszaporítanunk. Kizárólag az Arga 4-es primer (**41. ábra**) esetében a ’Remo’ fajtánál hiányzott egy fragmentum

Annak érdekében, megerősítsük ezt az eredményt, a PCR-es amplifikációban csökkentettük a ciklus számot a 62°C primer kapcsolódási hőmérséklet mellett. A **42. ábrán** látható, hogy a 25 ciklusra történő csökkentés esetén sem kaptunk polimorfizmust a ’Remo’ fajta kivételével.

Összefoglalva a rezisztencia gén analógokkal kapcsolatos kísérleteink eredményeit, megállapítható hogy sikerült ligátumokkal kompetens sejteket transzformálnunk és ezeket X-gal, IPTG és ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztenünk a kék-fehér szelekciót végrehajtanunk. A szelektív táptalajon kinövő fehér kolóniákból masterplate-et készítettünk. A néhány nap után is fehéren maradt mintákból kolónia PCR-t indítottunk ugyanazokkal a degenerált primerekkel, melyekkel a fragmentumok felszaporítását is végeztük. Összesen 12 kolónia esetében kaptunk amplifikációt. A kolónia PCR-rel pozitívnak bizonyuló kolóniából folyékony LB tenyészetet indítottunk, és nagy tisztaságú plazmid DNS-t izoláltunk, majd meghatároztuk az inszertek szekvenciáit. Ezt követően a szekvenciákat az NCBI adatbankban BLAST analízissel értékeltük.

Összesen 9 RGA szekvencia esetében találtunk olyan régiókat, melyek a rezisztencia génekben ismert konzervatív régióival homológok, vagy részben homológok. Ezekre a szekvenciákra SCAR markereket terveztünk abból a célból, hogy bizonyítsuk jelenlétüket a rezisztens fajtákban és hiányukat a fogékonyakban Sajnos a SCAR régió minden genotípusban (rezisztens és fogékony) felszaporodott. Egyetlen primer (Arga-4) esetében a ’Remo’ rezisztens fajtában sikerült – egy fragmentum hiányára alapozott - polimorfizmust kapnunk.

Mivel a többi rezisztens fajtában ez a marker minden esetben felszaporított fragmentumot az eredményből arra következtettünk, hogy a ‘Remo’ fajtában a primer kapcsolódási helyén mutáció következhetett be ami megakadályozta azt, hogy az Arga-4 SCAR marker fragmentumot szaporítson fel. Azonban azt is lehetségesnek tartjuk, hogy olyan rezisztenciával, kapcsolatos génnel/génekkel kapcsolatosak a, melyek mind a rezisztens, mind a fogékony fajtákban jelen vannak a ’Remo’ fajta kivételével.

4.2. Almafajták molekuláris ujjlenyomat vizsgálata SSR markerekkel

Kutatásaink célja olyan módszer kidolgozása, illetve fejlesztése volt, mely alkalmas „molekuláris ujjlenyomat" készítésére az általunk vizsgált minden egyes genotípusra, (fajták, klónok, tájfajták), továbbá azonosításukra és megkülönböztetésükre.

Az alkalmazott molekuláris megközelítés (3-as pontok az alkalmazott technikákat, a 4-es pontok az elért eredményeket tartalmazzák):

1. Vizsgált genotípusok gyűjtése és DNS izolálás (3.1.2. és 3.2. pont)
2. SSR primerek kiválasztása és PCR reakció indítása (3.4.1. pont)
3. Allélméretek meghatározása poliakrilamid gélen (3.4.1.1. pont)
4. Statisztikai értékelések és dendrogramok készítése (3.4.1.2. pont)
    a. 6 SSR marker vizsgálata 40 fajta és tájfajta esetében (**4.2.1. pont**)
    b. A vizsgált tételek genetikai variabilitása (**4.2.2. pont**)
    c. A vizsgált 40 fajta, tájfajta összehasonlítása kereskedelmi fajtákkal (**4.2.3. és 4.2.4. pont**)
    d. 37 fajta, tájfajta vizsgálata az európai sorozattal (**4.2.5. pont**)
    e. A két sorozat összehasonlítása (**4.2.6. pont**)
    f. Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis kialakítása (**4.2.7. pont**)

4.2.1. A génbank gyűjtemény vizsgált tételeinek allélszáma és allélmérete

Annak érdekében, hogy a vizsgált 40 genotípust (fajta, tájfajta) molekulárisan elkülöníthessük, hat alkalmazott primer párral (CH03g07, CH04e03, CH04g10, CH05c02, CH05d11, CH05e03), egy bázispárnyi pontossággal határoztuk meg azok mikroszatellit mintázatát.

Átlagban primerpáronként 11,8 allél szaporodott fel, amit a megismételt reakciók is megerősítettek. Az összehasonlító **11. táblázatban** feltüntettük az allélek méretét és számát, PIC értékeket, valamint a saját eredmények mellett tartalmazza, a korábbi kereskedelmi fajtákkal végzett kísérleteink (Galli *et al.* 2005), valamint Liebhard *et al.* (2002) által közölt publikáció eredményeit is.

Összesen 71 polimorf allélt kaptunk, melyek közül a CH03g07 primer pár szolgáltatta a legkisebb számú allélt (összesen csak 8-at), míg a legtöbb allélt a CH05e03 primer pár

alkalmazásával sikerült kapnunk, ahol összesen 15 allél szaporodott fel. Ezek az eredmények megegyeznek Galli *et al.* (2005) és Liebhard *et al.* (2002) által közöltekkel.

11. Táblázat: A 40 genotípus (fajta, tájfajta) 6 SSR primerrel kapott fontosabb adatai (allélméret, allélszám és PIC), összehasonlítva Liebhard *et al.* (2002); és Galli *et al.* (2005) eredményeivel.

SSR	forward primer szekvencia reverse primer szekvencia *5' → 3'*	Allél méret	Allél szám	PIC	Allél méret	Allél szám	PIC	Allél méret	Allél szám	PIC
		Liebhard *et al.* 2002			Galli *et al.* 2005			Saját eredmények		
CH03g07	*aat aag cat tca aag caa tcc g* *ttt ttc caa atc gag ttt cgt t*	119-181	5	0,77	119-179	7	0,74	119-179	8	0,75
CH04e03	*ttg aag atg ttt ggc tgt gc* *tgc atg tct gtc tcc tcc at*	179-222	11	0,88	178-222	12	0,77	161-222	13	0,81
CH04g10	*caa aga tgt ggt gtg aag agg a* *gga ggc aaa aag agt gaa cct*	127-168	5	0,83	127-168	6	0,60	123-168	11	0,79
CH05c02	*tta aac tgt cac caa atc cac a* *gcg aag ctt tag aga gac atc c*	168-200	4	0,60	160-200	7	0,70	160-200	12	0,77
CH05d11	*cac aac ctg ata tcc ggg ac* *gag aag gtc gta cat tcc tca a*	171-211	5	0,69	169-211	10	0,67	169-227	12	0,86
CH05e03	*cga ata ttt tca ctc tga ctg gg* *caa gtt gtt gta ctg ctc cga c*	158-190	10	0,87	160-193	13	0,83	149-193	15	0,84
					Átlagosan 9,2 allél/lókusz Átlagos PIC érték: 0,72			Átlagosan 11,8 allél/lókusz Átlagos PIC érték: 0,8033		

A tájfajták esetében több új - korábban még nem publikált - méretű allélt is kaptunk (**12. táblázat)**. A **11. táblázatban** a PIC értékekben mutatkozó jelentős eltérések ezekkel az új allélekkel is magyarázhatók.

12. Táblázat: A magyarországi alma gyüjtemény 40 tételének (fajta, tájfajta) 6 SSR markerrel kapott allélméretei bázispárban (bp).

Tájfajták/Markerek	CH03g07	CH04e03	CH04g10	CH05c02	CH05d11	CH05e03
Alant alma	119,129	196,204	125,135	172,200	175,177	165,165
Amália	119,129	184,200	123,143,155	160,168	171,177	163,173
Asztraháni fehér	129,165	196,198	135,141	170,176	173,175	163,173
Asztraháni piros	129,129	198,204	135,135	170,176	173,175	191,191
Burgundi	123,129	186,196	135,135	168,168	171,173	165,191
Bogovits	123,127	184,202	135,135	168,196	171,171	170,170
Dániel-féle renet	119,119	196,204	135,168	168,172	169,175	163,163
Chieftain	129,153	196,196	135,168	168,200	171,173	163,191
Nyári csíkos fűszeres	119,129	161,161	135,147	160,170	169,187,195	163,191
Éva	119,129	196,204	135,135	168,176	173,173	185,191
Fekete tányéralma	119,129	196,202	135,135	168,172	195,225	173,191
Fertődi téli	119,123,129	184,196	135,135	168,168	173,173	163,168
Húsvéti rozmaring	119,129	192,196,202	135,135	168,172	173,187,205	191,191
Gravensteini	123,129	196,208	135,137	168,172,176	169,187	163,193
Jakab alma	119,119	186,208	135,135	168,170	173,205	163,173
Kenézi piros	123,129	196,204	137,141	168,172	173,186	163,173
Keszthelyi kúpos alma	119,119	196,208	135,135	168,172	173,175	173,191
Középfajta renet	119,129	186,196	123,143,155	160,168,172	173,177	155,167,183
Kubany	123,127	184,198	127,135	168,172	171,171	173,185
Liptói-féle rozmaring	119,127	196,198	127,137	170,176	177,181	163,167,179
Mutsu II.	119,127	198,222	127,135	168,174	171,173	163,179,185
Nyári fontos	119,129	196,222	137,137	160,168,172	171,181,187	161,173
Nyári sóvári	119,129	176,196	127,139	168,172	169,225	163,173
Őszi borízű	127,127	196,196	135,135	160,168	169,195	157,191
Őszi piros renet	129,129	196,208	123,137,143	160,170	173,173	163,163
Puha sóvári	119,129	196,210	137,137	170,170	169,205	163,173
Rózsa alma	119,129	210,222	135,168	168,168	173,186	173,191
Sárga édes	121,127	202,222	137,137	168,172	171,187	149,173
Sikulai	129,165	196,210	137,137	168,190	175,177	163,193
Simonffy piros	119,129	196,200	123,135,143	170,170	173,227	160,173
Széchenyi renet	129,153,165	196,222	123,137,143	168,198	171,175	171,179

12. Táblázat folytatása **Fajták/Markerek**	**CH03g07**	**CH04e03**	**CH04g10**	**CH05c02**	**CH05d11**	**CH05e03**
Téli arany parmen	129,153	196,196	135,135	168,170	169,175	163,163
Téli banánalma	119,127	184,196	127,137	164,168	169,205	163,185
Téli fehér kálvil	119,129	198,208	135,168	168,168	171,173	163,191
Téli fehér tafota	127,127	196,196	135,135	168,172	173,175	163,163
Tordai piros kálvil	119,129	196,204	137,168	168,168	171,175,187	173,191
Újvári őszi	119,129	196,222	135,135	160,168,172	171,181,187	160,173
Vajalma	123,179	196,196	137,137	160,168	173,203	161,191
Világ dicsősége	119,119	198, 204	135,135	172,180	171,171	191,191
Vista Bella	165,165	198,198	123,135,143	160,168	175,175	163,173

A nagyobb allélszám általában nagyobb PIC értékkel párosult, bár nem minden esetben. Ennek oka, hogy azt, az egyes allélek százalékos megoszlása is befolyásolja. (**13. táblázat**).

13. táblázat: A magyarországi alma gyűjtemény 40 tételének (fajta, tájfajta) 6 SSR primerrel kapott allél méretei (bp) és százalékos megoszlásuk.

CH03g07		CH04e03		CH04g10		CH05c02		CH05d11		CH05e03	
Méret	**%**	**Méret**	**%**	**Méret**	**%**	**Méret**	**%**	**Méret**	**%**	**Méret**	**%**
119	31.5	**161**	1.4	**123**	9.0	**160**	11.7	**169**	10.3	**149**	1.4
121	1.4	**176**	1.4	**125**	1.5	**164**	1.3	**171**	16.7	**155**	1.4
123	9.6	**184**	6.8	**127**	7.5	**168**	40.3	**173**	23.1	**157**	1.4
127	11.0	**186**	4.1	**135**	38.8	**170**	11.7	**175**	14.1	**161**	5.4
129	35.6	**192**	1.4	**137**	17.9	**172**	19.5	**177**	6.4	**163**	27.0
153	4.1	**196**	37.8	**139**	1.5	**174**	1.3	**181**	3.8	**165**	2.7
165	5.5	**198**	10.8	**141**	3.0	**176**	6.5	**187**	11.5	**167**	4.1
179	1.4	**200**	2.7	**143**	9.0	**180**	1.3	**195**	3.8	**171**	2.7
		202	5.4	**147**	1.5	**190**	1.3	**203**	1.3	**173**	20.3
		204	9.5	**155**	3.0	**196**	1.3	**205**	5.1	**175**	1.4
		208	6.8	**168**	7.5	**198**	1.3	**225**	2.6	**179**	4.1
		210	4.1			**200**	2.6	**227**	1.3	**183**	1.4
		222	8.1							**185**	5.4
										191	18.9
										193	2.7

Az átlagos heterozigozitás mértéke 80%-os, mely a 75% és 86% szélső értékek között változott. A CHO4g10 primer alkalmazása eredményezte a legtöbb homozigóta allélt (47%).
A legpolimorfabb SSR lókusz a CH05e03 (PIC = 0.84) volt, mely 15 különböző allélméret változatot tartalmazott a vizsgált fajták esetében, 149-193 bázisszám tartományban.

4.2.2. A génbank gyűjtemény vizsgált tételeinek genetikai variabilitása

A vizsgált genotípusok (fajták, tájfajták, klónok) molekuláris elkülönítése már három SSR marker (CH05d11, CH05e03, CH04e03) felhasználásával is sikeres volt (**14. táblázat**). A két legpolimorfabb marker (CH05d11, CH05e03) használata esetén, is csak 2 genotípus pár (‘Dániel-féle renet’ – ‘Téli arany parmen’ és ‘Chieftain’ – ‘Téli fehér kálvil’) nem volt elkülöníthető egymástól, azonban a harmadik marker (CH04e03) bevonásával ez az elkülönítés is lehetővé vált.

14. táblázat: A legpolimorfabb SSR markerekkel végzett elkülönítési lehetőségek. A számok a nem elkülöníthető fajtákat számszerűsítik a megfigyelt és a számított értékek alapján

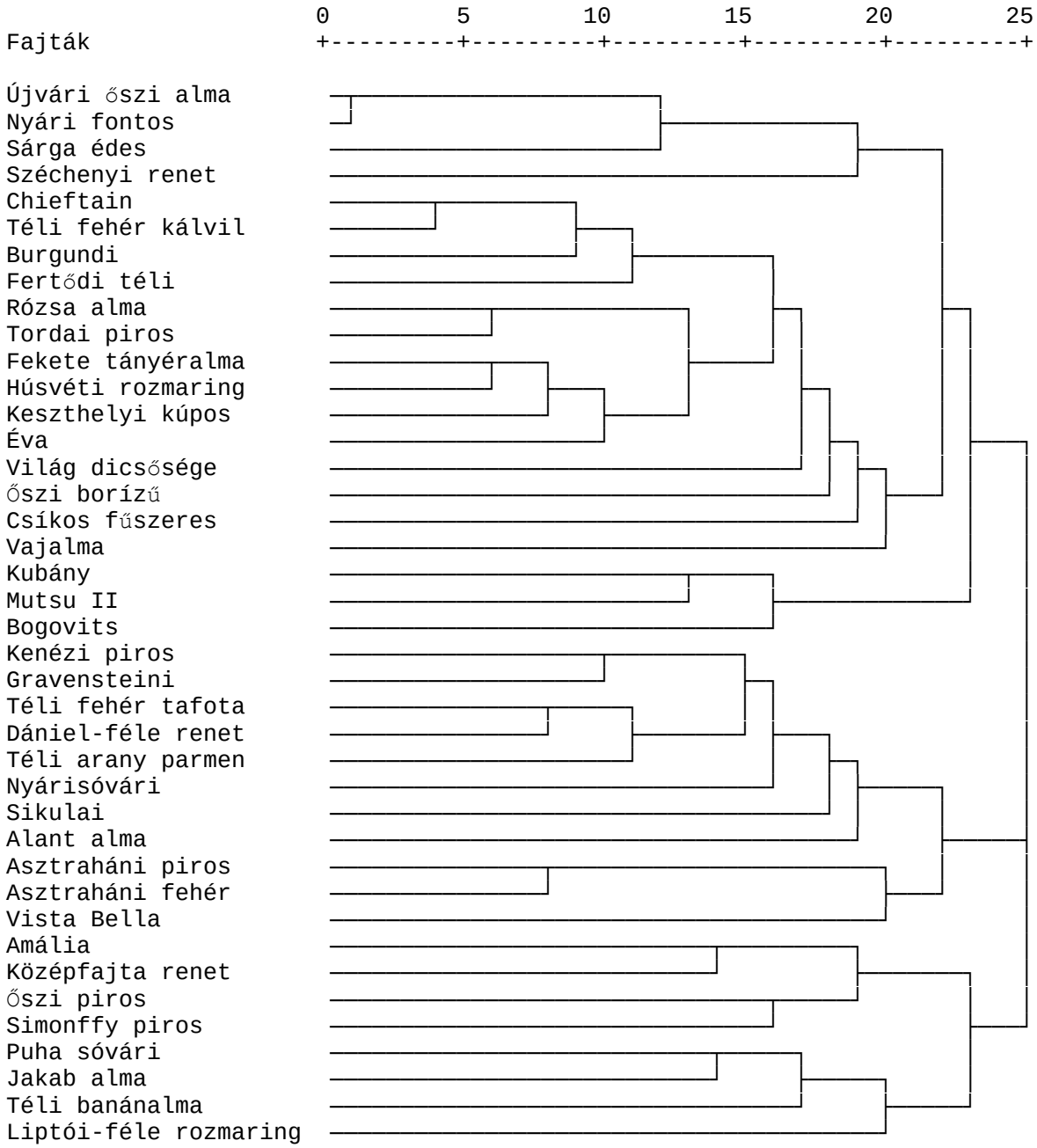
Marker Kombináció	Elkülöníthetetlen párok száma	
	Valós	Számított
CH05d11	46	88.3
CH05d11 + CH05e03	4	12.4
CH05d11 + CH05e03 + CH04e03	**0**	2.1
CH05d11 + CH05e03 + CH04e03 + CH04g10	**0**	0.4

Annak a valószínűsége, hogy két különböző fajta ugyanazokkal az allélekkel legyen jellemezhető (Probability of Identity), az összes vizsgált lókusz esetén alacsony (2.53×10^{-5}), mely aránypárba rendezve: 1 : 39525. Ez a tény megerősíti az SSR markerek alkalmazáságát az alma fajták esetében, valamint azt a tényt, hogy a magyar gyűjtemény vizsgált genotípusai között nagy a genetikai variabilitás. Korábbi munkánkban (Galli *et al.* 2005) ez az érték jóval alacsonyabb volt (1.79×10^{-4}).

Egyezőségi mátrixokat számoltunk az SSR adatokból. Az UPGMA alapú dendrogram adatait az **21. ábra** mutatja. Bebizonyosodott, hogy minél több SSR markert alkalmazunk annál pontosabb eredményt kapunk. Ez indokolta mind a 6 SSR marker felhasználását a vizsgált 40 genotípus elkülönítéséhez. Ez megfelelő felbontást biztosított a dendrogramnak az egyes fajták (tételek) elkülönítéséhez.

A legközelebbi kapcsolatot, tehát a legkisebb genetikai távolságot, (több mint 73%-os egyezés) az ’Újvári őszi alma’ és a ’Nyári fontos alma’ mutatja. Számos genotípus-pár mutat teljes különbözőséget, amik elkülönítése egyszerűen megoldható a vizsgált primerekkel (pl.‘Világ dicsősége’ – ‘Őszi piros renet’, ‘Bogovits alma’ – ‘Puha sóvári’, ‘Asztraháni piros’ – ‘Sárga édes’). Az ‘Asztraháni piros’ és ‘Asztraháni fehér’ fajták – melyeket könnyen akár rügymutáns fajtáknak is gondolhatnánk – csupán 50%-os hasonlóságot mutatnak, mely alapján a csak szomatikus mutáció, mint genetikai háttér eltérés, elképzelhetetlen (**43. ábra**).

A nagy genetikai variancia érték megerősíti a génbanki célú gyűjtések és gyűjtemények nemesítési jelentőségét. SSR markerek fejlesztése ezekre a genotípusokra olyan – nemesítést is támogató – módszer, mely lehetővé teszi az új, betegségeknek ellenállóbb, jobb gyümölcs minőségű alma fajták előállítását.



43. ábra: 40 Magyarországon termesztésbe vont fajta, tájfajta, 6 SSR marker eredménye alapján készített dendrogramja.

4.2.3. A génbank gyűjtemény tájfajtáinak és a kereskedelmi fajtáknak molekuláris összehasonlítása

Korábban a SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézetében Galli *et al.* (2005) 66 kereskedelmi almafajtát vizsgált a fentiekben ismertetett 6 SSR markerrel. Eredményeinek összehasonlítása a magyar gyűjtemény vizsgálatával, kapcsolatos adatainkkal, további figyelemre méltó információval szolgálhat.

A tájfajták (magyar gyűjtemény tételei) esetében nagyobb PIC értékeket kaptunk, különösen a CH04g10, CH05d11 markerek esetében. A PIC értékek alapján a kísérletünkben vizsgált gyűjteményben fenntartott fajták és tájfajták jobban elkülöníthetőek egymástól (PIC: 0,8). mint a korábbi kísérletben (Galli *et al.* 2005) vizsgált kereskedelmi fajták és genotípusok (PIC: 0,72) (**11. táblázat**).

Figyelemre méltó továbbá, hogy azok a primerek melyek nem bizonyultak alkalmasnak a kereskedelmi fajták elkülönítésére, meglepően használhatóak voltak a gyűjtemény egyes genotípusai esetében. Ez az eredmény is megerősíti azt a feltételezést, hogy a magyar alma génbank gyűjteménykülönböző genotípusai (fajták, tájfajták, klónok) jelentős változatossággal rendelkeznek.

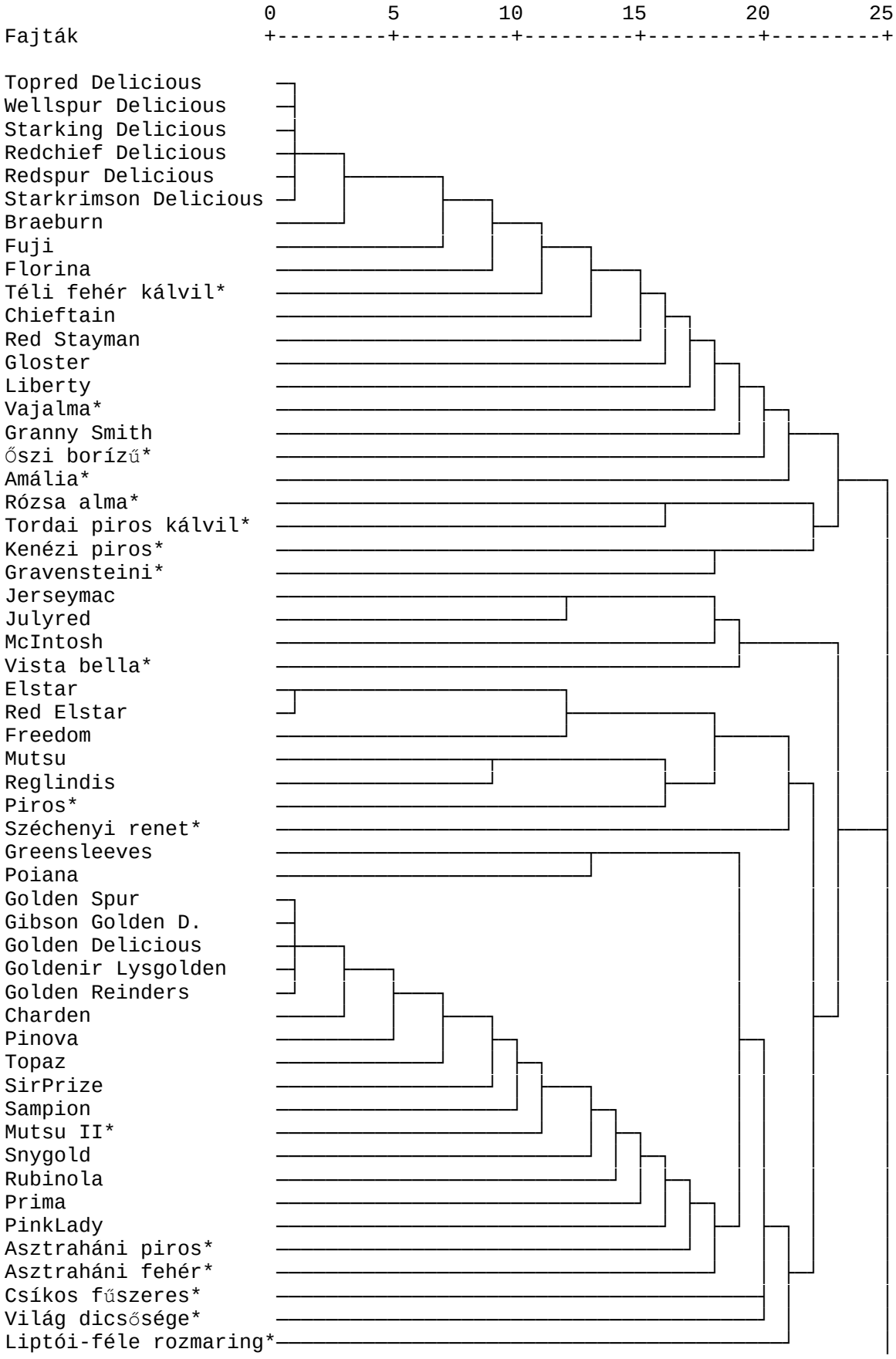
4.2.4. A génbank gyűjtemény és a kereskedelmi fajták közös dendrogramja

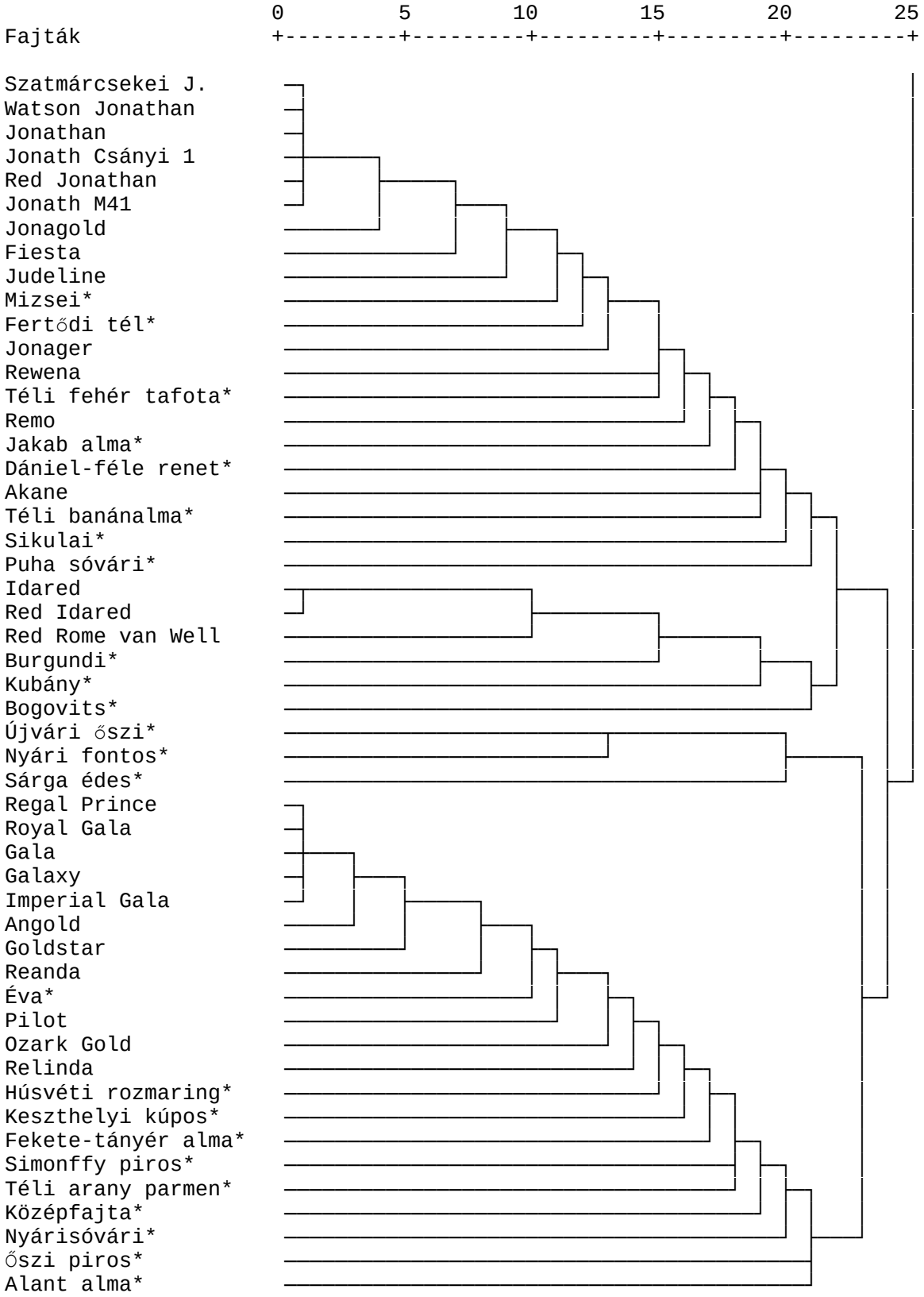
Következő lépésben már 105 almafajtának (66 kereskedelmi fajta és 40 génbanki tétel/tájfajta) mikroszatellit mintázatát hasonlítottuk össze egy dendrogramban a hasonlóságok felderítése végett. Korábbi munkánk eredményét is felhasználva (Galli *et al.* 2005) a közös dendrogramra alapozott összehasonlítást elvégeztük a 66 kereskedelmi és 40 fajta/tájfajta esetében. A **44. ábra** szerint nincs származási különbség a két csoportban, mert – e vonatkozásban - mind a tájfajták, mind a kereskedelmi fajták nagyfokú homológiát mutatnak.

A dendrogrammon **(44. ábra)** látható, hogy a tájfajták szinte beágyazódnak a kereskedelmi fajták közé, egy részük nagyobb azonosságot mutat a kereskedelmi fajtákkal, mint az egyes tájfajtákkal. Az természetesen visszavezethető arra, hogy a Magyarországon termelt fajták, mint régi genotípusok, részt vehettek az új kereskedelmi fajták szülővonalainak kialakításában. Ez egyben magyarázat is arra, hogy a tájfajták egyes esetekben nagyobb hasonlóságot mutathatnak a kereskedelmi fajták szülő fajtáival, mint a kísérletben szereplő egyéb tájfajtákkal. Ezt a **44. ábrán** látható dendrogram is megerősíti.

A legtöbb génbanki tétel/tájfajta a *’Gala’* alma csoporttal mutat azonosságot (13/40 = 32.5%). Az átlagos PIC érték a 40 génbanki genotípus és 66 kereskedelmi fajta összevonása esetében 0,76.

A dendrogram eredményei alapján látható, hogy az ’Idared’, mely maga is ’Jonathan’ szülővel végzett keresztezésből származik, egyazon leszármazási csoportban van a ’Jonathannal’. Ugyanígy az ’Elstar’ és a ’Gala’ csoport, melyben a ’Golden Delicious’, mint szülő szerepel ugyanazon leszármazási ágban.


0 5 10 15 20 25
Fajták
Topred Delicious
Wellspur Delicious
Starking Delicious
Redchief Delicious
Redspur Delicious
Starkrimson Delicious
Braeburn
Fuji
Florina
Téli fehér kálvil*
Chieftain
Red Stayman
Gloster
Liberty
Vajalma*
Granny Smith
őszi borízű*
Amália*
Rózsa alma*
Tordai piros kálvil*
Kenézi piros*
Gravensteini*
Jerseymac
Julyred
McIntosh
Vista bella*
Elstar
Red Elstar
Freedom
Mutsu
Reglindis
Piros*
Széchenyi renet*
Greensleeves
Poiana
Golden Spur
Gibson Golden D.
Golden Delicious
Goldenir Lysgolden
Golden Reinders
Charden
Pinova
Topaz
SirPrize
Sampion
Mutsu II*
Snygold
Rubinola
Prima
PinkLady
Asztraháni piros*
Asztraháni fehér*
Csíkos fűszeres*
Világ dicsősége*
Liptói-féle rozmaring*



44. ábra: A 66 kereskedelmi fajta és 40 magyar génbanki genotípos/fajta (csillaggal jelölve) 6 SSR markerre alapozott dendrogramja

4.2.5. A magyar génbank vizsgált genotípusainak elkülönítése európai standard SSR markerekkel

Annak érdekében, hogy meghatározhassuk az általunk alkalmazott primerek valóban alkalmasak az almafajták közötti különbségek kimutatására, továbbá hogy a magyar génbank gyűjtemény vizsgált tételit/tájfajtát egy nemzetközi standardnak is megfeleltessük, azokat az Európai Alma Munkacsoport elfogadott primer sorozatával is teszteltük.

Európai Alma Munkacsoport primer pár sorozata, a korábban közölt (Liebhard *et al.* 2002) 140 tagú SSR primer pár csoportból lettek kiválasztva. Azokat már több országban (Franciaország – Laurens *et al.* 2004; Olaszország – Guarino *et al.* 2006; Svédország – Garkava-Gustavsson *et al.* 2008; valamint Spanyolország – Pereira-Lorenzo *et al.* 2008) sikerrel alkalmazták a fajták és tájfajták valamint szinonim fajták elkülönítésére.

A magyar génbank gyűjtemény 37 genotípusának vizsgálata során, az Európai Alma Munkacsoport 8 mikroszatellit markerével kapott allélméret adatokat a **15. táblázat, azok** százalékos gyakoriságát a **16. táblázat tartalmazza.**

15. Táblázat: 37 fajta/tájfajta, valamint a ’Golden Delicious’ almafajta, 8 SSR marker által kapott allélméretei bázispárban (bp).

Fajták/Markerek	CH01h02 L1	CH01h02 L2	CH02c06	CH02c09	CH02c11 L2	CH02d08 L1	CH02d08 L2	CH04c06 L1	CH04c06 L2	CH04e05	COL
Puha sóvári	197:201	235:243	248	231:243	222	211:215:225	332	170	178:186:195	174:182	236:243
Kenézi piros	203	235:247	228:242	237:243	216:222	211:215	332	170	175	170:174:182	236
Rózsa alma	203	243:245	216:250	231:253	208:216:222	211:229	328	157:170	178	174	236:239
Őszi borízű	206	237:249	216:230:252	253	206:216	223:225	330	157:170	175:186:193	174:177:182	222:232
Fekete tányéralma	203	235:247	216:230:252	253	206	223:225	330	157:170	175:178	174:177:182	222:236
Világ dicsősége	201:203	243:245	216:242	253	206:226	229	330	170	178	174:182:209	222:232:241
Újvári őszi	203	239:249	228:250:252	231:243	214:222	211:225	325:327:330	157:170	183	174:201	222:232:241
Sárga édes	201	237:243	244:252	247:251	216:222	217	333	157:170	183	174:182	236:253
Kubány	203	247	216:234:250	231:239:241	222:228	225	332	170	175:178	174:198:203	236:253
Éva	203	235:245	216:230:250	229:241:255	216:222	211:229	328	157:170	186:191	174:182:201	232:241
Chieftain	206	237:249	250	229:243	208:222	211:229	325	157:170	178:186:193	182:203	222:234
Széchenyi renet	203	235:243	216:238	247	206:222	211	329	157:170	178:193	174:182:207	222:234
Vista Bella	203	235:247	250	231:239:241	222:226	217	326:329	165:170	186:193	174:201	234:243
Asztraháni piros	203	235	216:252	241	216	211:225	326	170	183:191	174:182	236:243
Húsvéti rozmaring	203:206	247	216:220:252	241:247	222	211:217	325:332	170	175:183:193	174:182	236:243
Nyári fontos	201:203	235:245:247	228:252	231:243	216:222	211:225	325:332	170	175:183:193	170:174:182	232:241:253
Burgundi	203	235:247	216:238	231:239	226	211	325	157:170	175:178	174:182:196	239:243
Mutsu II.	203:208	235:239:247	238:250	231	208:218	223:225	324:331	165:170	175:178	174:182	222:234
Asztraháni fehér	203:206	235:239	216:222:250	243:247	218:222	215:225	330	157:170	173:193	182:201:203	222:243
Jakab alma	203	235	250	243:247	214:222	211	325	157:170	173:195	182:201	234
Sikulai	203	235:243	250	231	216:222	217:225	332	157:170	173:195	177:182:201	222:234:241
Keszthelyi kúpos	203	235:247	216:222:242	243	214	211	325	157:170	175:193	174:182:203	234
Gravensteini	203	235	248	231:243	206:214:222	211	325	157:170	186:191	174:182:198	234:241:243
Téli fehér tafota	201:203	235:247	250	231:239	222	223	330	170	175:183	174:201	236:241
Őszi piros renet	203	247	250	253:257	222	223:225	330	157:170	178:186:193	174:201	234
Liptói-féle rozmaring	201	247	216:250	231:243	214:218	217:225	332	157:170	183:193	182	222:234:241
Téli fehér kálvil	201:206	235	250	253	216:222	215	326	170	173:193	201	234:241
Vajalma	201	235	228	247	216:226	211	326	170	183:193	182:207	234
Tordai piros	201:208	243	250	247	206:214	209:215	328:330	157:170	173:193	174:182:201	222:232

15. Táblázat folytatása **Fajták/Markerek**	**CH01h02 L1**	**CH01h02 L2**	**CH02c06**	**CH02c09**	**CH02c11 L2**	**CH02d08 L1**	**CH02d08 L2**	**CH04c06 L1**	**CH04c06 L2**	**CH04e05**	**COL**
Téli banánalma	201:208	247:249	234	231:255	218:228	223	332	157:170	173:193	174:182:203	232:243
Csíkos fűszeres	201:203	231:237	216	253	216:222	225	324:329	157:170	173:186:193	182:198	229:236
Nyári sóvári	203	235	250:257	231:247	216:222	211	324:332	170	186:193	172:198	241
Középfajta renet	201:203	231:247	230:252	231:243	214:226	211:215:223	324:329	157:170	173:186:193	174:182	232:243
Simonffy piros	201	237	216:248	231:247	206:218	209	325:330	170	173:193	174:182	241
Dániel-féle renet	197:201	235	244:248	243:253:255	206:216	211:223	328:335	157:170	178:186:193	174:203	222:234:241
Fertődi tél	197	243	250	255	218:222	215	326:330	157:170	186:193	174:182:196	229:234
Bogovits	203	239	228:230	247	222:228	211	326:328	157:170	178:193	182:209	222:234
Golden Delicious	203:208	245:247	234:238	241:255	218	223	332	170	175:178	174:198	222:234

16. Táblázat: A 8 SSR primer esetében kapott allél méretek (bp) és százalékos megoszlásuk (%) a vizsgált tájfajták esetén. L1, L2 jelöli a kétlókuszos markereket

CH01h02 L1		CH01h02 L2		CH02c06		CH02c09		CH02c11		CH02d08		CH04c06 L1		CH04c06 L2		CH04e05		COL	
Méret	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%	**Méret**	%
197	5.66%	**235**	33%	**216**	21.43%	**228**	3.03%	**206**	11.59%	**209**	3.39%	**157**	36.51%	**173**	11.25%	**170**	3.33%	**222**	17.10%
201	24.52%	**237**	6%	**220**	1.43%	**231**	24.24%	**208**	4.34%	**211**	32.20%	**165**	3.17%	**175**	13.75%	**174**	31.11%	**229**	2.63%
203	49.05%	**239**	10%	**222**	2.86%	**237**	1.52%	**214**	8.69%	**215**	11.86%	**170**	60.32%	**178**	16.25%	**177**	3.33%	**232**	10.52%
206	9.43%	**243**	12%	**228**	7.14%	**239**	6.06%	**216**	18.84%	**217**	8.47%			**183**	8.75%	**182**	31.11%	**234**	21.05%
208	7.54%	**245**	10%	**230**	7.14%	**241**	9.09%	**218**	11.59%	**223**	15.25%			**186**	15%	**196**	2.22%	**236**	13.15%
		247	22%	**234**	4.29%	**243**	18.18%	**222**	33.33%	**225**	22.03%			**191**	3.75%	**198**	5.55%	**239**	2.63%
		249	6%	**238**	5.71%	**247**	15.15%	**226**	7.24%	**229**	6.78%			**193**	26.25%	**201**	11.11%	**241**	15.78%
				242	4.29%	**251**	3.03%	**228**	4.34%					**195**	3.75%	**203**	6.66%	**243**	11.84%
				244	2.86%	**253**	10.61%									**207**	2.22%	**253**	3.94%
				248	5.71%	**255**	7.58%									**209**	2.22%		
				250	24.29%	**257**	1.52%												
				252	11.43%														
				256	1.43%														

A saját és az európai primerek összehasonlítása ugyanazon a genotípusokon, lehetőséget ad, hogy meghatározhassuk melyik sorozat mutat jobb elkülönítést, ezáltal jobb alkalmazhatóságot.

Az Európai sorozat SSR primer párjainak segítségével megbízható alléleket szaporítottunk fel a magyar génbank gyűjtemény 37 genotípusán/tájfajtáján. Összesen 84 polimorf allél szaporodott fel. A legkevesebb allél (4 db) a CH04c06, míg a legtöbb (15 db) a CH02c06 lókuszban amplifikálódott. A primerenként az átlagos allélszám 10,5 volt. (**17. táblázat**).

Két marker, a CH01h02 és a CH04c06, vizsgálatainkban két lókuszosnak bizonyult (ezeknél az **15., 17. táblázatban** L1, L2 jelöléseket használtunk). Ezek gyengébb elkülönítő eredményeket mutattak. A megismételt reakciók is megerősítették az eredményeket.

Kontrollként a 'Golden Delicious' almafajtát választottuk, és a vele kapcsolatos eredményeket, allélméreteket a korábbi vizsgálatok (Garkava-Gustavsson *et al.* 2008). eredményeinek tükrében értékeltük.

17. Táblázat: A kísérletekben használt 8 SSR marker fontosabb adatai, Garkava-Gustavsson *et al.* (2008) és a saját eredmények alapján. Az allélméret oszlop esetében az L1, L2 megkülönböztetés a két lókuszos markerek külön lókuszait jelöli.

SSR	forward primer szekvencia reverse primer szekvencia *5' → 3'*	Allél méret	Allél szám	PIC	Allél méret	Allél szám	PIC
		Garkava-Gustavsson *et al.* 2008			Saját eredmények		
CH01h02	*aga gct tcg agc ttc gtt tg* *atc ttt tgg tgc tcc cac ac*	L1: 201-204 L2: 235-255	4 7	0,42 0,72	L1: 197-207 L2: 235-255	5 7	0,67 0,8
CH02c06	*tga cga aat cca cta atg ca* *gat tgc gcg ctt taa cat*	197-263	15	0,91	216-256	13	0,86
CH02c09	*ta tgt acc aac ttt gct aac ctc* *aga agc agc aga gga gga tg*	231-255	10	0,85	229-257	11	0,86
CH02c11	*tga agg caa tca ctc tgt gc* *ttc cga gaa tcc tct tcg ac*	206-236	12	0,9	206-228	8	0,81
CH02d08	*tcc aaa atg gcg tac ctc tc gca* *gac act cac tat ctc tc*	205-254	13	0,74	209-229	7	0,8
CH04c06	*gct gct gct gct tct agg tt* *gct tgg aaa agg tca ctt gc*	L1: 157, 170 L2: 167-195	2 11	0,44 0,84	L1: 157-170 L2: 173-195	3 9	0,5 0,84
CH04e05	*agg cta aca gaa atg tgg ttt g* *atg gct cct att gcc atc at*	174-224	14	0,69	170-209	11	0,78
COL	*agg aga aag gcg ttt acc tg* *gac tca ttc ttc gtc gtc act g*	204-241	10	0,71	222-253	10	0,85
		Átlagosan 9,8 allél/lókusz Átlagos PIC érték: 0,72			Átlagosan 10,5 allél/lókusz Átlagos PIC érték: 0,78		

Az Európai standard sorozatban lévő primerek közül a CH02c06 és CH02c09 marker szolgáltatta a legjobb elkülönítési képességet a maguk 15 illetve 10 alléljával. Mindegyik SSR marker rendelkezett legalább egy vagy kettő olyan allélmérettel melyek gyakran jelentek meg a fajtákban.

Az Európai 8 SSR primer párral kapott eredményeinket összehasonlítottuk a korábbi kísérletünk adataival (Wichmann *et al.* 2007), amelybe a magyar génbank gyűjtemény 40 tételét/tájfajtát vontunk be. Mindkét esetben, Galli *et al.* (2005) által kiválasztott 6 primer párral dolgoztunk, és a 40 vizsgált tételből 37 volt azonos. Az eredményeket a **11. táblázat** tartalmazza.

A két táblázat (**11. és 17. táblázatok**) összehasonlításakor látható, hogy a PIC értékek a korábban használt 6 SSR markernél 0,75-0,86 (átlag PIC: 0,8), míg az európai munkacsoport 8 SSR markerénél 0,51-0,86 (átlag PIC: 0,78) között változott. Az európai marker készlettel meghatározott átlagos PIC érték csak akkor volt nagyobb (PIC: 0,82), mint a 6 általunk választott primer párokkal kapottnál, amennyiben a CH01h02, CH04c06 két lókuszos primerek közül csak az L2-ben kapott alléleket vettük figyelembe. Ez utóbbi esetben már egyértelmű, hogy az európai marker sorozat jobb elkülönítést tesz lehetővé a kísérleteinkben vizsgált fajták esetében.

A korábbi kísérleteinkben alkalmazott CH05d11 (0,86) és CH05e03 (0,84) markerek, viszont az európai munkacsoport által javasolt primerek értékeihez képest magasabb PIC értékűnek bizonyultak az újfehértói génbankban fenntartott tételek/fajták elemzése során (**17. táblázat**). Véleményünk szerint érdemes volna ezeket a több lókuszos markereket (CH01h02, CH04c06), a 8 SSR markeres sorozatban alkalmazott CH05d11 és CH05e03 markerekkel felváltani. A jobb elkülönítő hatás eléréséhez lehetségesnek tartjuk ezen markerek kicserélését, mely tovább javítaná a sorozat alkalmasságát, azáltal, hogy annak PIC értékét 0,82-ről 0,84-re emelné.

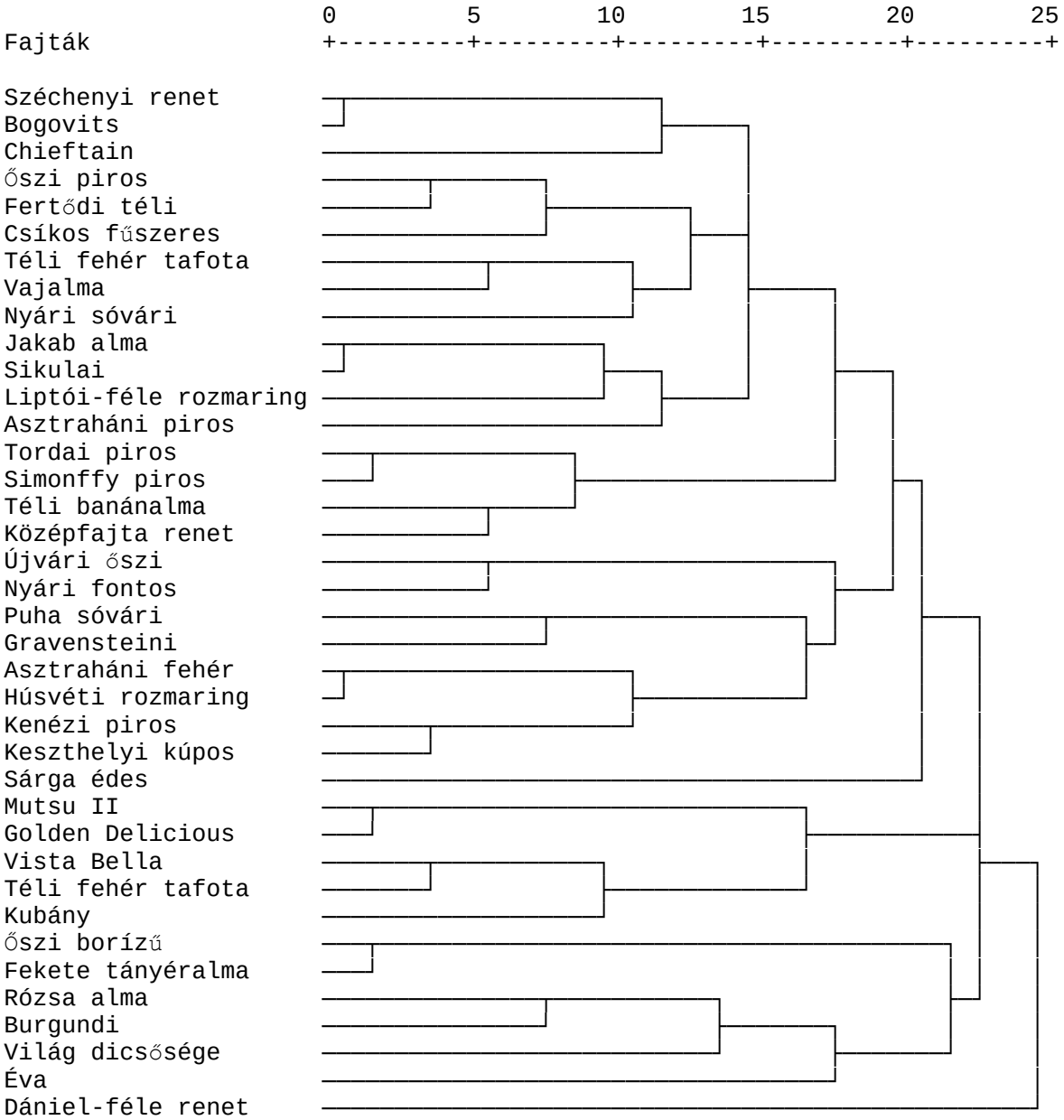
4.2.6. A magyar génbank 37 genotípusának a 6 saját és a 8 európai markerekkel kapott dendrogramjainak összehasonlítása

Az európai 8 standard SSR marker adatokból számolt egyezőségi mátrixok alapján UPGMA alapú dendrogramot szerkesztettünk (**45. ábra).** A dendrogram szerint a legközelebbi kapcsolat az ’Újvári őszi alma’ és a ’Nyári fontos alma’, ’Jakab alma’ és a‘Sikulai’, valamint az ’Asztraháni fehér’ és a ’Húsvéti rozmaring’ között van.

Közeli rokoni kapcsolat tételezhető fel még, 6 génbanki tétel (‘Bogovits alma’ és a ‘Széchenyi renet’, ‘Őszi borízű’ és a ‘Fekete-tányér alma’, ‘Tordai-piros’ és a ’Simonffy piros’) valamint az egyértelműen idegen eredetű ’Mutsu II’ és a referenciának alkalmazott ’Golden Delicious’ között. A ’Mutsu II’ egyik szülője a ’Golden Delicious’, míg a japán ’Indo’ a másik szülő, tehát a szülő utód kapcsolatot vizsgálatunk megerősítette.

A többi fajta esetében a rokonsági kapcsolatok meghatározása nehézségekbe ütközött, mert a középkorban kialakult fajtákról van szó.

A ’Sikulai’ – ’Asztraháni fehér’ páros esetében a megjelenési forma, az elágazás igen hasonló, ebből rokonságra lehet következtetni.

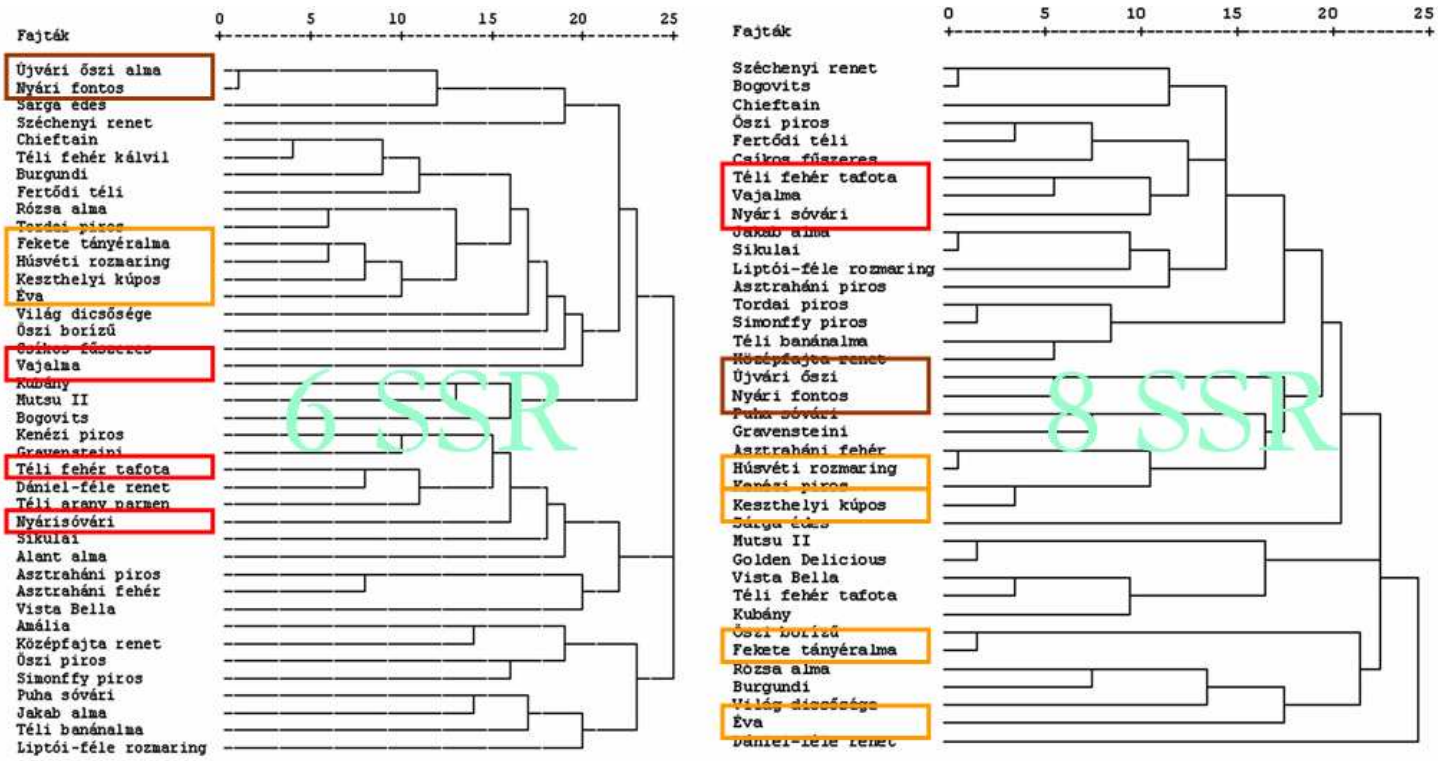


45. ábra: 37 fajta/tájfajta 8 SSR primer pár (Európai standard sorozat) allélmintázatára alapozott dendrogramja

Korábbi elemzésünk, melyet 6 SSR markerrel végeztünk (Wichmann *et al.* 2007) szintén nagyfokú hasonlóságot mutatott az ’Újvári őszi alma’ és a ’Nyári fontos alma’ között **(43. ábra, 4.2.2. pont)**. Az eredmények azt igazolják, hogy vizsgált tájfajták jól elkülöníthetők az alkalmazott marker sorozattal.

A két különböző SSR sorozattal kapott allélmintázatok alapján készített dendrogramok nem fedik egymást. A 8 SSR-es és 6 SSR-es sorozatok eredményei között csak kiemelkedően nagy homológia esetében sikerült az azonosságot detektálnunk **(43., 45. ábra)**.

Amennyiben a két sorozat eredményeit összehasonlítjuk a 37 genotípuson, a ’Nyári fontos’, ’Újvári őszi’ (**46. ábra** mindkét dendrogramján barna színnel jelölve) alma fajta párok között találunk csak nagyfokú azonosságot. A többi fajta esetében sajnos ez nem figyelhető meg. A **46. ábrán** színnel megjelöltünk mindkét dendrogram esetében egy-egy jól elkülönülő klasztert (6 SSR-es sorozat esetében aranysárga, 8 SSR-es sorozat esetében piros színnel jelölve). Mindkét példa jól bizonyítja, hogy az egyik dendrogramban egy klaszterbe tartozó fajták, a másik dendrogramban nem klaszterződnek. A **46. ábra** két dendrogramján a vizsgált fajták klaszterződése, hogy az SSR-ra alapuló megközelítés nem alkalmas a fajták rokonsági fokának (genetikai távolságának) egyértelmű meghatározására.



46. ábra: Fajták és tájfajták 8 SSR-es (Európai standard sorozat) és 6 SSR-es sorozatának allélmintázatára alapozott dendrogramok összehasonlítása

Összefoglalva megállapítható, hogy az SSR primer párokkal végzett PCR technika alkalmas az alma fajták elkülönítésére, pedigré elemzésre. Nem alkalmas viszont egy kiválasztott sorozat alapján a rokoni kapcsolatok, a genetikai távolság meghatározására.
A nagy genetikai variancia (molekuláris polimorfizmus) megerősítik a hazai alma génbank genetikai és nemesítési jelentőségét és fontosságát az alma genetikai diverzitásának megőrzésében. A molekuláris eredmények sejtetni engedik, hogy az alma génbankban fenntartott tájfajták, fajták, és gyűjtött genotípusok, mint genetikai tartalékok, a gének allélváltozatainak gazdag tárházával rendelkeznek. Alátámasztják továbbá az alma genetikai tartalékok gyűjtésének, fenntartásának, vizsgálatának és megőrzésének kiemelt jelentőségét.

4.2.7. Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis kialakítása

Az alma gyűjtemények tesztelése során kapott eredmények alapján létrehoztuk a Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázist (MAMA), melyet a Szent István Egyetem honlapjáról a következő linken lehet elérni:
http://www.mkk.szie.hu/dep/gent/genetika.htm

A honlap mind magyar, mind angol nyelven olvasható. Itt bemutatásra kerülnek a Magyarországon termelt tájfajták, valamint a kereskedelmi fajták allél méretei a vizsgált 6 SSR primer pár esetében a „*Magyarországon termelt tájfajták / Hungarian Varieties*”, valamint „*Kereskedelmi Világfajták / Commercial Varieties*” oldalakon. A fajta nevekre kattintva gyorsabban kereshetőek ki a kívánt adatok. A „*Teljes fajtalista / List of Varieties*” oldalon szerepelnek a fajta elnevezések és hogy melyik csoporthoz is tartoznak. A képernyő bal oldalán (*Menü*) a fajták az alkalmazott 6 mikroszatellit (SSR) primerrel alapján ellenőrizhetőek. „*Kapcsolódó cikkek és poszterek*” menüpont alatt az mikroszatellites alma vizsgálatokról megjelent publikációk és poszterek láthatóak. Az adatok XLS és TXT formátumban is elérhetőek.

4.3. Rügymutánsok molekuláris elkülönítése

Kutatásaink célja olyan molekuláris markerek és technikák keresése és tesztelése volt, melyekkel esetleg sikeresen lehetne a rügymutációkat nagy valószínűséggel kiváltó retrotranszpozonok jelenlétét, helyét a genomban meghatározni.

A rügymutánsok általában valamilyen fenotípusos bélyegben, pl. gyümölcs színében, fa méretben valamint elágazási hajlamukban különböznek a kiinduló fajtától, illetve egymástól. A fajtakörök klónjai végeredményben 1 vagy 2 tulajdonság kivételével, teljesen megegyeznek a szülőfajtával. A rügymutációk kialakulásának genetikai háttere még nem teljesen tisztázott, de valószínűleg retrotranszpozonok állhatnak a mutációk hátterében.

A rügymutánsok közötti genetikai különbségek annyira csekélyek, hogy az eddig kipróbált RAPD, AFLP, SSR stb. technikákkal még egyetlen laboratóriumnak sem sikerült „rügymutáns-specifikus” markereket azonosítani. Rügymutánsok esetében a fajták meghatározása és a szülő vonalak kiválasztása meglehetősen nehéz. A jelenlegi tanulmányban a megbízható markert azonosítása a cél, melyekkel karakterizálható és megkülönböztethetők a rügymutánsok egymástól, valamint a kiinduló fajtától.

Az alkalmazott molekuláris megközelítés (3-as pontok az alkalmazott technikákat, a 4-es pontok az elért eredményeket tartalmazzák):

1. Vizsgált genotípusok gyűjtése és DNS izolálás (3.1.3. és 3.2. pont)
2. SSR technika alkalmazása (3.4.1.; 3.4.1.1. **és 4.3.1. pont**)
3. AFLP technika alkalmazása (**4.3.2. pont**)
4. S-SAP technika alkalmazása (3.4.2. **és 4.3.3. pont**)

4.3.1. SSR markerek alkalmazása

Mivel a különböző alma fajták mikroszatellit markerekkel elkülöníthetők voltak egymástól, ezért először a már ismertetett SSR markerekkel próbáltuk a rügymutánsokat elkülöníteni. Mivel a korábban alkalmazott 6 tagú SSR marker sorozat alkalmatlan volt erre a feladatra (Galli *et al.* 2005), az új európai SSR sorozattal próbálkoztunk.

A rügymutáns csoportokon belül sajnos még egy bázispárnyi különbséget sem találtunk a nagyfelbontású ALF módszerrel. A rügymutánsok vizsgálata során a 8 mikroszatellit markerrel kapott allélméret adatokat a **18. táblázat** tartalmazza.

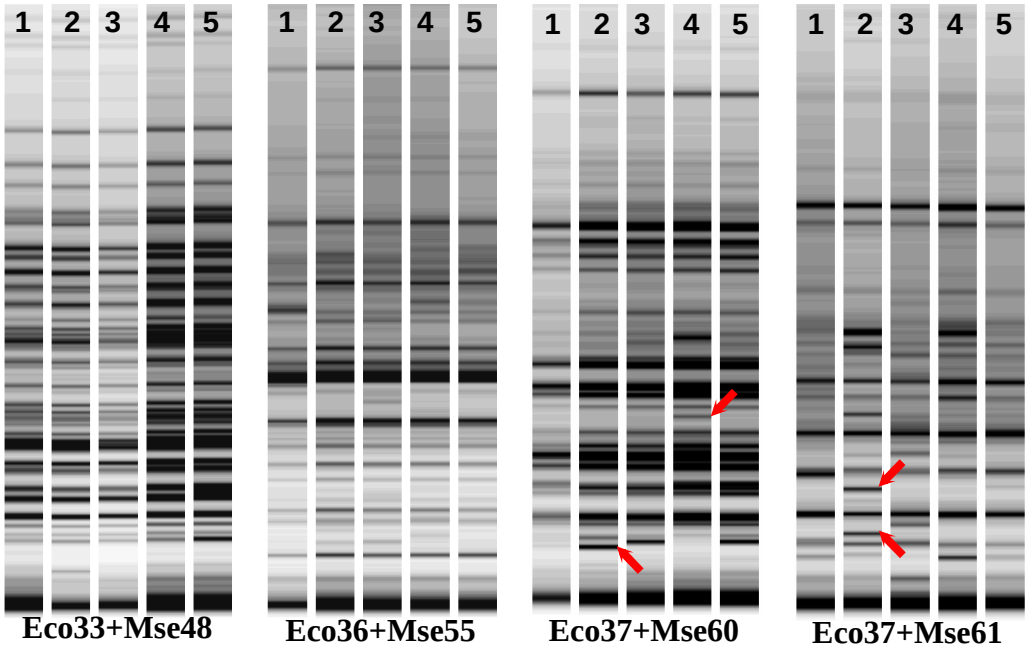
18. Táblázat: 27 rügymutáns fajta/klón 8 SSR marker (ALF) által kapott allélméretei bázispárban (bp).

Fajták / SSR primerek	CH01h02 L1	CH01h02 L2	CH02c06	CH02c09	CH02c11 L2	CH02d08 L1	CH02d08 L2	CH04c06 L1	CH04c06 L2	CH04e05	COL
Jonathan	203	235:247	246:253	234:249	203:233	228	228	157:170	187	174:198	235
Jonathan M41	203	235:247	246:253	234:249	203:233	228	228	157:170	187	174:198	235
Jonathan Csány1	203	235:247	246:253	234:249	203:233	228	228	157:170	187	174:198	235
Red Jonathan	203	235:247	246:253	234:249	203:233	228	228	157:170	187	174:198	235
Szatmárcsekei Jonathan	203	235:247	246:253	234:249	203:233	228	228	157:170	187	174:198	235
Watson Jonathan	203	235:247	246:253	234:249	203:233	228	228	157:170	187	174:198	235
Golden Delicious	203	247	240:253	241:255	203:224:236	222	222	170	175:179	174:195	224:236
Golden Delicious Lys	203	247	240:253	241:255	203:224:236	222	222	170	175:179	174:195	224:236
Goldenir (Lysgolden)	203	247	240:253	241:255	203:224:236	222	222	170	175:179	174:195	224:236
Golden Reinders	203	247	240:253	241:255	203:224:236	222	222	170	175:179	174:195	224:236
Golden Spur	203	247	240:253	241:255	203:224:236	222	222	170	175:179	174:195	224:236
Gibson golden Delicous	203	247	240:253	241:255	203:224:236	222	222	170	175:179	174:195	224:236
Elstar	203	247	240:253	241:255	203:228:236	222	222	170	175:179	174:195	222:233
Red Elstar	203	247	240:253	241:255	204:228:236	222	222	170	175:179	174:195	222:233
Gala	201	235:247	201:235	235:244	203:223:236	224	224	170:179	233	174:195	233
Galaxy	201	235:247	201:235	235:244	203:223:236	227:234	224	170:179	233	174:195	233
Imperial Gala	201	235:247	201:235	235:244	203:223:236	227:234	224	170:179	233	174:195	233
Regal Prince (Gala Must)	201	235:247	201:235	235:244	203:223:236	227:234	224	170:179	233	174:195	233
Royal Gala	201	235:247	201:235	235:244	203:223:236	227:234	224	170:179	233	174:195	233
Idared	201	231:241	233:247	244:249	203:233	233	226	170:181	233	174:198	234
Red Idared	201	231:241	233:247	244:249	203:233	233	226	170:181	233	174:198	234
Starking Delicious	201	231:241	216:247	246:253	203:214:236	225:235	211:216	170:179	233	174:201	223:235
Starkrimson Delicious	201	231:241	216:247	246:253	203:214:236	225:235	211:216	170:179	233	174:201	223:235
Redchief Delicious	201	231:241	216:247	246:253	203:214:236	225:235	211:216	170:179	233	174:201	223:235
Redspur Delicious	201	231:241	216:247	246:253	203:214:236	225:235	211:216	170:179	233	174:201	223:235
Topred Delicious	201	231:241	216:247	246:253	203:214:236	225:235	211:216	170:179	233	174:201	223:235
Wellspur Delicious	201	231:241	216:247	246:253	203:214:236	225:235	211:216	170:179	233	174:201	223:235

4.3.2. AFLP technika alkalmazása

Az SSR technika sikertelensége, szükségessé tette részletesebb analízist lehetővé tevő módszer kipróbálását. Az AFLP technika, egy bázispárnyi különbség detektálást is lehetővé teszi.

Hasító enzimeket (adapterek: *EcoRI 33, EcoRI 36, EcoRI 37, EcoRI 44, MseI 48, MseI 55, MseI 60, MseI 61*) használtunk a felbontás növelése érdekében. Mint látható (**47. ábra**) némely esetben olyan fragmentumok is megjelentek egyes rügymutánsok esetében, melyek a többiben hiányoztak. A polimorf AFLP fragmentumokból konvertált SCAR markerek azonban nem bizonyultak alkalmasnak a rügymutánsok elkülönítésére. A velük kimutatható különbségek egyediek és nem genotípus-specifikusak voltak.



47. ábra: Golden Delicious rügymutánsok AFLP mintázata négy szelektív primer kombinációt alkalmazva. A nyilak a feltételezett genotípus specifikus fragmentumokat jelölik, melyeket a gélből kivágtuk, szekvenáltuk és SCAR markerekké alakítottuk (a szövegben nincs részletezve). A SCAR markerek azonban egyed-specifikusnak bizonyultak. 1: Golden Delicious, 2: Goldenir (Lysgolden), 3: Golden Reinders, 4: Golden Spur, 5: Gibson Golden Delicious

4.3.3. S-SAP technika alkalmazása

Az előző két pontban közölt eredményekből nyilvánvaló, hogy azok alkalmazásával, a kívánt célt nem tudtuk elérni. Emiatt új megközelítéssel próbálkoztunk, a S-SAP technikával. Ezt az indokolta, hogy a rügymutánsok kialakulása, feltételezhetően az ugráló elemek (retrotanszpozonok) beépülése következtében létrejövő mutációkkal is magyarázható. Ezt erősítette meg Venturi *et al.* (2006) közleménye is, melyben e módszer alkalmazásával a ’Gala’ rügymutánsok sikeres elkülönítéséről számolt be.

Vizsgálatainkban összesen 24 primer kombináció (3 Ret-LTR × 8 adapter specifikus primer) termékét elemeztük és értékeltük. A különböző primer kombinációkkal végzett reakciók 11-71 fragmentumot szaporítottak fel (**19. táblázat**), ami azt jelzi, hogy a vizsgált retrotranszpozonok nagy számban fordulnak elő az alma genomjában. Összesen 4368 fragmentumot sikerült felszaporítanunk. Az Ret-LTR3 + EcoRI-33 primer kombináció adta legnagyobb, Ret-LTR2 + MseI-55 primer kombináció, pedig a legalacsonyabb fragmentum számot mind a 6 rügymutáns csoport esetében.

A nagyszámú fragmentum ellenére csak egy kombinációval (Eco-33 és Ret-LTR2) sikerült polimorfizmust detektálnunk. Ebben az esetben viszont – nemzetközileg elsőként - sikerült a ’Jonathan’ alapfajtát megkülönböztetni a rügymutánsaitól (**48. ábra**). Az összes többi esetben a genotípusok egymástól elkülöníthetetlenek voltak (**49. ábra**). A rügymutánsok esetében, felszaporodott fragmentumokat a **19. táblázatban** foglaltuk össze.

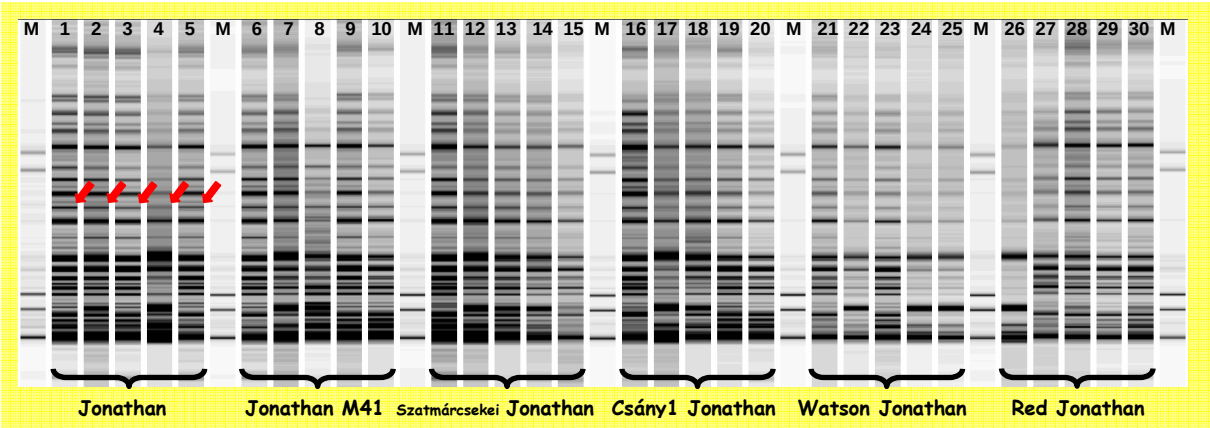
Eredményünk megerősíti ennek a megközelítésnek megalapozottságát, azonban, figyelemmel a retrotranszpozonok nagy számára, a többi fajtakör esetében további részletes vizsgálatokra van szükség.

19. Táblázat: A különböző primer kombinációkkal felszaporított S-SAP fragmentumok száma a különböző szomatikus mutánsok esetében

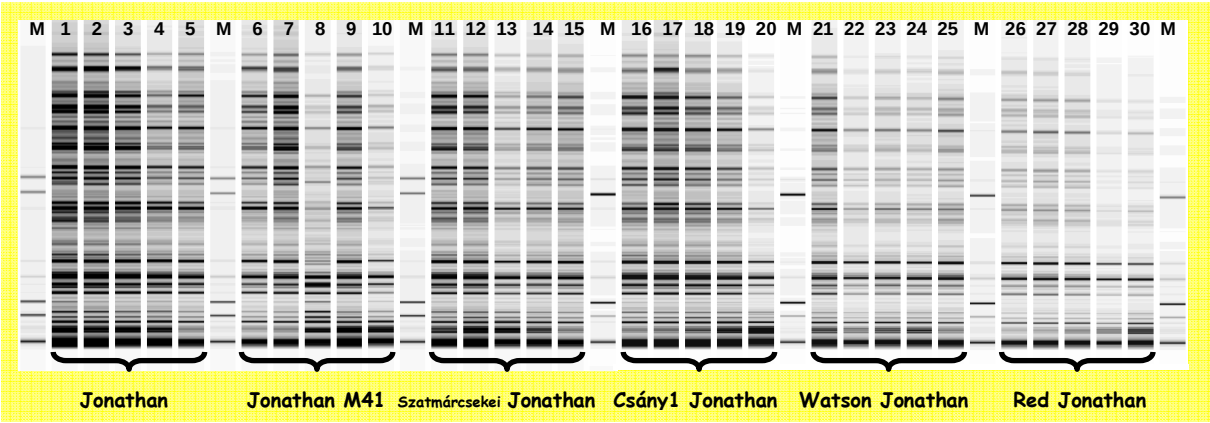
Primer kombináció	Fragmentumok (Jonathan fajtakör)	Fragmentumok (Starking Delicious fajtakör)	Fragmentumok (Gala csoport)	Fragmentumok (Golden Delicious fajtakör)	Fragmentumok (Elstar csoport)	Fragmentumok (Idared csoport)
Ret-LTR1 + MseI-48	21	18	23	19	20	18
Ret-LTR1 + MseI-55	16	11	14	14	15	17
Ret-LTR1 + MseI-60	30	24	29	20	28	26
Ret-LTR1 + MseI-61	27	25	27	30	23	29
Ret-LTR1 + EcoRI-33	36	31	33	30	29	31
Ret-LTR1 + EcoRI-36	24	19	26	22	27	24
Ret-LTR1 + EcoRI-37	32	28	30	26	25	22
Ret-LTR1 + EcoRI-44	27	23	28	21	24	20
Ret-LTR2 + MseI-48	19	27	20	25	21	23
Ret-LTR2 + MseI-55	13	11	10	15	24	13
Ret-LTR2 + MseI-60	23	20	24	25	29	24
Ret-LTR2 + MseI-61	24	21	26	20	19	22
Ret-LTR2 + EcoRI-33	35	31	36	30	33	37
Ret-LTR2 + EcoRI-36	38	35	33	36	31	38
Ret-LTR2 + EcoRI-37	45	44	41	39	48	42
Ret-LTR2 + EcoRI-44	46	46	38	40	41	38
Ret-LTR3 + MseI-48	32	29	33	34	26	36
Ret-LTR3 + MseI-55	17	19	15	14	13	16
Ret-LTR3 + MseI-60	31	33	36	38	37	27
Ret-LTR3 + MseI-61	39	36	41	42	43	39
Ret-LTR3 + EcoRI-33	71	67	61	65	68	56
Ret-LTR3 + EcoRI-36	43	38	40	41	35	31
Ret-LTR3 + EcoRI-37	33	35	37	38	39	36
Ret-LTR3 + EcoRI-44	40	38	35	36	37	41

Az alma esetében – a többi csonthéjas fajhoz képest – még kevés retrotranszpozon (3 db) ismert. A polimorfizmus hiánya ezzel magyarázható. Ugyanis a többi fajtakör esetében nagy valószínűséggel a mozgékony elemek más csoportjai okozhatják a mutációkat.

Kísérleteinkben kapott egyetlen polimorf fragmentum SCAR markerré történő konvertálása folyamatban van. A szekvenálása bizonyította, hogy a polimorfizmust valóban retrotranszpozon beépülése okozta



48. ábra: A Jonathan alapfajta és 5 rügymutánsának az Eco-33 és a Ret-LTR1 (Cy-5 jelölt) primerekkel kapott S-SAP virtuális mintázata. A nyilak a polimorfizmust jelzik.



49. ábra: A Jonathan alapfajta és 5 rügymutánsának az Eco-33 és a Ret-LTR2 (Cy-5 jelölt) primerekkel kapott S-SAP virtuális mintázata.

A bemutatott technikával tehát csak a ’Jonathan’ alapfajtát sikerült elkülönítenünk a rügymutánsaitól, de nem sikerült a ’Jonathan’ rügymutánsokat egymástól molekulárisan megkülönböztetni. A többi fajtakörökön belül, még az alapfajtát sem sikerült

rügymutánsaitól elkülönítenünk. A továbblépést további – más fajokon már leírt – retrotanszpozonok tesztelése jelenthetné.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

5.1. RGA markerek azonosítása és tesztelése:

- 14 RGA jelölt fragmentumot klónoztunk sikerrel és töltöttünk fel az NCBI adatbázisba, melyből 9 szekvenálásával bizonyítottuk, hogy azok a rezisztencia génekben ismert konzervatív régiókkal homológ, vagy részben homológ szekvenciákat tartalmaznak. Ebből arra következtettünk, hogy az általunk klónozott és vizsgált RGA jelölteknek szerepük lehet a rezisztencia kialakításában.
- A 9 RGA-ra tervezett SCAR marker tesztelésekor 8 SCAR marker egymástól ugyan különböző, de mind a fogékony mind a rezisztens fajtákban azonos fragmentumot szaporított fel. Ebből arra következtettünk, hogy az általunk izolált és vizsgált RGA jelöltekre tervezett SCAR markerek valószínűleg olyan a fertőzést követő növényi válasz reakcióban részt vevő gén(ek) specifikus fragmentumait szaporították fel, melyek mind a rezisztens, mind a fogékony fajtákban megtalálhatóak.
- Egy esetben (ARGA-4-es primer) a rezisztens ’Remo’ fajtában viszont egyáltalán nem kaptunk fragmentumot. Mivel a többi rezisztens fajtában ez a marker minden esetben felszaporított fragmentumot, az eredményből arra következtettünk, hogy a ‘Remo’ fajtában a primer kapcsolódási helyén mutáció következhetett be ami megakadályozta azt, hogy az ARGA-4 SCAR marker fragmentumot szaporítson fel.

5.2. Alma genotípusok molekuláris jellemzése:

- Elsőként határoztuk meg az újfehértói magyar alma génbankban fenntartott 40 genotípus (fajta, tájfajta, klón) molekuláris ujjlenyomatát 6 mikroszatellit lókuszban. Az általunk alkalmazott 6 primer párral az összes vizsgált genotípus egymástól megkülönböztethető.
- Elsőként határoztuk meg az Európai Standard SSR primerek (9 mikroszatellit marker) felhasználásával az újfehértói magyar alma génbankban őrzött 37 genotípus (fajta, tájfajta, klón) ujjlenyomatát. Eredményeink bizonyították, hogy a primerek alkalmazhatóak a magyar alma génbank gyűjtemény egyes tételeinek molekuláris jellemzésére.
- A saját 6 SSR markerrel és az Európai 8 SSR standard markerrel kapott eredmények összehasonlítása alapján javaslatot tettünk az Európai Standard sorozatban két, több lókuszos marker (CH01h02 és CH04c06) cseréjére az általunk alkalmazott 6 primer

pár közül a CH05d11 és CH05e03 markerekkel. Ezek felhasználásával a PIC értékek tovább javíthatóak (0,78->0,84).

- A magyar alma génbank gyűjtemény 37 genotípusának (fajták, tájfajták) két különböző primer sorozattal (6 és 9 tagú) való elemzésével kapott dendrogramokkal bizonyítottuk, hogy az SSR módszer valóban alkalmas a fajták megkülönböztetésére, azonban alkalmatlan a fajták genetikai távolságának (rokonsági fokának) meghatározására.
- Részt vettünk a Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis (Hungarian Apple Microsatellite Database) honlap létrehozásában és bővítésében.

5.3. Rügymutánsok genetikai elkülönítése:

- Az általunk használt molekuláris technikákkal (SSR, AFLP) nem sikerült molekuláris eltérést találnunk a 3 rügymutáns fajtakör és 3 rügymutáns csoport fajtái között. Ebből arra következtettünk, hogy a genom nem kódoló részét vizsgáló módszerek alkalmatlanok a rügymutánsok közötti molekuláris különbségek kimutatására.
- Egyre több kísérleti eredmény utal arra, hogy a rügymutánsok megjelenésének molekuláris hátterében retrotranszpozonok tételezhetők fel. A retrotranszpozon szekvencia specifikus megközelítés (S-SAP módszer) alkalmazásával sikerült a ’Jonathan’ alapfajtát a többi ’Jonathan’ rügymutánstól elkülöníteni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

REZISZTENCIAGÉNEKKEL KAPCSOLT MARKEREK

A gyümölcstermesztésben, napjainkban a különböző kórokozók és kártevők jelentős termésveszteséget okozhatnak. A vegyszeres növényvédelem fontos és bizonyos esetekben elengedhetetlen, azonban egyre inkább megfogalmazódik az igény, a környezet vegyszerterhelésének mérséklését biztosító, illetve az emberi egészséget nem veszélyeztető technológiák nagyobb arányú bevezetése iránt. Ezekben a törekvésekben kiemelt szerephez jut a rezisztencianemesítés, melynek célja a betegségeknek és kórokozóknak ellenálló/rezisztens fajták előállítása.

A különböző növények, patogénekkel szembeni rezisztencia génjei nagyfokú strukturális konzervativizmust mutatnak, ezek az ún. Nucleotide-Binding Site vagy az Leucine-Rich Repeat szekvenciák. Az ilyen típusú szekvenciákra tervezett primerek lehetőséget adnak a rezisztencia génekhez kapcsolt markerek azonosítására az alma genomban.

Célunk a rezisztenciagénekkel szorosan kapcsolt markerek azonosítása és tesztelése volt, a rezisztenciagén(ek) jelenlétének, illetve hiányának pontos és megbízható kimutatására, az általunk vizsgált genotípusokon (gyűjteményben).

A növényi mintákat a Magyar Alma Génbank gyűjteményben, az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft újfehértói telephelyén gyűjtöttük. A DNS izolálást a QIAGEN cég DNeasy kit-jével végeztük. Az NCBI génbanknak 10 különböző növényfaj izolált rezisztenciagénjeinek konzervált régióira – összerendezésüket (Bioedit szoftver) követően - degenerált primereket terveztünk.
Ezekkel a primerekkel PCR reakciókat indítottunk rezisztens, illetve fogékony genotípusokból. Kísérleteinkben mind a rezisztens, mind a fogékony genotípusokban azonos méretű fragmentumokat kaptunk.

A fragmentumokat ligáltuk majd a ligátumokkal kompetens sejteket transzformáltunk és ezeket X-gal, IPTG és ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük, a kék-fehér

szelekció céljából. A szelektív táptalajon kinövő fehér kolóniákból masterplate-et készítettünk. A néhány nap után is fehéren maradt mintákból kolónia PCR-t indítottunk ugyanazokkal a degenerált primerekkel, amelyekkel a fragmentumok felszaporítását is végeztük. Ezzel a technikával tehát az egyedi szekvenciájú fragmentumokat tudtuk felszaporítani.

Összesen 12 kolónia esetében kaptunk amplifikációt. A kolónia PCR-rel pozitívnak bizonyuló kolóniákból folyékony LB tenyészetet indítottunk, majd azokból nagy tisztaságú plazmid DNS-t izoláltunk, és az inszerteket szekvenáltuk.

A kapott szekvenciákat az NCBI adatbankban végzett BLAST analízissel értékeltük. Az értékelés során kiderült, hogy RGA jelöltjeink közül 5 (NCBI azonosító: EF455013-EF455017) nem tartalmaz olyan szekvencia motívumokat, melyek eddigi publikált adatok szerint a rezisztencia kialakulásáért felelősek. Ezek a motívumok minden rezisztencia gén, RGA jelölt esetében szerepelnek. További 9 RGA jelölt esetében azonban bizonyítottuk, hogy a rezisztenciáért felelős motívumok (P-loop, RNSB-A, Kináz-2, RNSB-B, RNSB-C, GLPL) szekvenciái jelen vannak és aminosav szinten nagyfokú homológiát mutatnak korábban leközölt RGA szekvenciákkal.

Annak érdekében, hogy azonosítani tudjuk a markereinkkel megjelölt rezisztenciagéneket, azokat SCAR markerekké konvertáltuk. A 9 SCAR marker alkalmazásakor azonban – egy genotípus kivételével - minden fajtában (rezisztens, fogékony, alany) azonos méretű fragmentum szaporodott fel. Mivel a növényi genom akár több száz, az általunk tesztelt konzervált régiókkal rendelkező szekvenciát tartalmazhat, elképzelhető hogy egy általános növényi rezisztenciáért felelős fragmentumot sikerült izolálnunk, ami minden almafajtában megtalálható.

Kizárólag az Arga-4-es primer alkalmazása esetén kaptunk egy fragmentum hiányában különbséget. A ’Remo’ fajta esetében egy fragmentum sem szaporodott fel. Mivel a többi rezisztens fajtában ez a marker minden esetben felszaporított fragmentumot az eredményből arra következtettünk, hogy a ‘Remo’ fajtában a primer kapcsolódási helyén mutáció következhetett be ami megakadályozta azt, hogy az Arga-4 SCAR marker fragmentumot szaporítson fel. További vizsgálatokat indokoltnak tartjuk.

MAGYAR ALMA GÉNBANK GENOTÍPUSAINAK ÉS KERESKEDELMI FAJTÁK MOLEKULÁRIS UJJLENYOMATA

Az almafajták egyre növekvő száma (több mint 15 ezer fajta a világon) megköveteli az egyes genotípusok egyértelmű és pontos azonosíthatóságát és elkülöníthetőségét más klónoktól, fajtáktól, stb. Erre a célra legjobban felhasználható markerek a molekuláris markerek. Előnyük, hogy megjelenésüket környezeti és episztatikus hatások nem befolyásolják, számuk korlátlan, mivel elvileg a genom valamennyi allélformája és azok kombinációi alkalmasak az azonosításra.

Célunk olyan módszer kidolgozása, illetve fejlesztése volt, mely alkalmas „molekuláris ujjlenyomat" készítésére az általunk vizsgált minden egyes fajtára, továbbá felhasználásával azok származása (pedigré), esetleg rokonsági foka is maghatározható.

Az almanemesítési programokban a jövőben elengedhetetlenné válik megbízható genetikai markerek keresése és felhasználása a fajták és származékaik azonosításában. Almában „genetikai ujjlenyomatok" készítésére a legmegfelelőbb genetikai elemek a mikroszatellitek, vagy más néven egyszerű tandem elrendeződésű szekvencia ismétlődések (Simple Sequence Repeats: SSR). Az ismétlődő elemek számában az egyes genotípusok között nagymértékű variabilitás figyelhető meg, továbbá kodomináns jelleget mutat.

Az alma génbank tételek vizsgálata során 6 SSR primer párral sikerült megbízható és ismételhető mikroszatellit alléleket felszaporítanunk a vizsgált 40 genotípus (fajta, tájfajta, klón) esetében. Az eltérő allélmintázatok alkalmasnak bizonyultak a fajták megkülönböztetésére. Összesen 71 polimorf allélt detektáltunk (átlag 11,8 allél / lókusz) és a markerek átlagos PIC is igen nagynak (0,8) bizonyult. Az ismételt PCR reakciók és futtatások allélméretei minden esetben megegyeztek. A korábbi SSR marker vizsgálatok eredményeivel (Galli *et al.* 2005) is összevetettük ezeket az értékeket, s megállapítottuk, hogy átlagos PIC értékeik nem voltak nagyobbak, mint vizsgált fajtáink esetében kapott eredmények.

Annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott fajta allélmintázata mind a 6 lókusz esetében megegyezzen (PI: Probability of Identity) $2{,}53 \times 10^{-5}$-nek adódott,

ami 1 : 39525 aránynak felel meg. Végeredményben a molekuláris ujjlenyomat rendkívül megbízható azonosítást tesz lehetővé.

Az alma génbank tételek vizsgálati eredményeit összehasonlítottuk 66 kereskedelmi fajtán kapott molekuláris adatokkal (Galli *et al.* 2005). A kereskedelmi fajták esetében a PIC értékek igen magasak voltak, különösen a CH04e03, CH05d11 markerek alkalmazásakor, azonban a PIC értékek alapján a tájfajták jobban elkülöníthetőek egymástól (átlagos PIC: 0,8), mint a kereskedelmi fajták (átlagos PIC: 0,72). Az összehasonlításból az is kiderült, hogy számos génbanki tétel nagyobb hasonlóságot mutat a vizsgált kereskedelmi fajtákkal. A PIC eredmények összehasonlításából az is kitűnik, hogy a kereskedelmi fajták ősei – feltehetően egy sokkal szűkebb nemesített növényanyagból kerültek ki, hiszen átlagos PIC értékeik kisebb értéket mutattak.

Következő lépésben az „Európai Alma Munkacsoport” által elfogadott marker sorozatot teszteltük tájfajtáinkon. SSR primer párok segítségével összesen 84 polimorf allélt sikerült felszaporítottunk 37 fajta/tájfajta esetében. A legkevesebb allél (4) a CH04c06, míg a legtöbb (15) a CH02c06 lókuszban amplifikálódott. A primerenként átlagos allélszám 10,5 volt. Két marker, a CH01h02 és a CH0406 két lókuszosnak bizonyult, tehát több helyen szaporodott fel értékelhető allélméret. Elkülönítési szempontból mindkét esetben az L1-es rontotta le az átlagos PIC értékeket.

Tájfajták esetében elvégzett kísérleteink esetében alkalmazott CH05d11 (0,86) és CH05e03 (0,84) markerek, az európai munkacsoport által alkalmazott primerek értékeihez képest is magas PIC értékűnek bizonyultak. Véleményünk szerint érdemes volna a több lókuszos markereket (CH01h02, CH04c06), a kísérleteinkben alkalmasabbnak tartott CH05d11 és CH05e03 markerekkel kicserélni a standard sorozatban, mely növelné a sorozat alkalmasságát (0,78-ról 0,84-re változtatná az átlagos PIC értéket tájfajták esetében).

A két marker sorozat dendrogramjának összevetése esetén az ’Újvári őszi alma’ és a ’Nyári fontos alma’ nagyfokú hasonlóságot mutatott. A többi fajta esetében, azonban igen jelentős eltéréseket tapasztaltunk. A két különböző sorozattal végzett elemzés eredményei nem átfedők, az eredmények között csak a kiemelkedően nagy homológia esetében sikerült az azonosságot detektálnunk. A két sorozat eltérő eredményei miatt a

technika nem tekinthető alkalmas módszernek a fajták közötti rokoni kapcsolatok megállítására, azonban, mint ahogy az eredmények is mutatják, a fajták azonosítására és elkülönítésére kifejezetten alkalmas az SSR technika.

A Magyar Alma Mikroszatellit Adatbázis (Hungarian Apple Microsatellite Database) létrehozásában és bővítésében tevékenyen vettünk részt. A mért adatokat és eredményeket az adatbázisban is feltűntettük. Mivel nyílt adatbázisról van szó az adatokhoz bárki hozzáférhet. Nemesítők, fajtaminősítő intézetek és szaporítóanyag előállító vállalatok számára már napjainkban is, de a jövőben minden bizonnyal fontos és elengedhetetlen követelmény lesz az almafajták pontos azonosíthatósága.

RÜGYMUTÁNSOK MOLEKULÁRIS ELKÜLÖNÍTÉSE

Új fajták kiinduló alapanyagai sok esetben rügymutációk. Ezek a mutációk olyan fenotípusos változásokat eredményezhetnek, mint a gyümölcs színe vagy alakja, a fa mérete és alakja, elágazási hajlam, stb. A rügymutánsok az alapfajta klónjainak tekinthetők, melyek csak egy, vagy néhány gén mutáns allélváltozatában különböznek az alapfajtától, illetve egymástól. A fajtakörön belüli rügymutánsok közötti genetikai különbségek tehát igen csekélynek minősíthetőek.

A rügymutációkban gyakran retrotranszpozon jelenlétét mutatták ki, **célunk** ezért olyan molekuláris markerek és technikák keresése és tesztelése volt, melyekkel sikeresen lehetne ezeket a különbségeket detektálni**.** Ennek érdekében AFLP és SSR markereket, valamint egy új módszert (S-SAP) is bevontunk vizsgálatainkba. Megközelítésünk lényege, hogy a retrotranszpozonokat határoló DNS szekvenciák közötti polimorfizmus kimutatása esetleg lehetőséget ad a fajtakörök egyes klónjai molekuláris elkülönítésére.

A fajták ujjlenyomat vizsgálatainak eredményei bizonyították a különböző alma genotípusok megbízható elkülöníthetőségét mikroszatellit markerekkel. Erre az eredményünkre alapozva megpróbáltuk a rügymutásokat is molekulárisan elkülöníteni, a már ismertetett SSR markerekkel. Miután a 6 tagú SSR marker sorozat alkalmatlannak bizonyult erre a célra, az új európai SSR sorozat (9 SSR marker) alkalmazásával próbálkoztunk. Azonban a rügymutáns csoportokon belül még néhány bázispárnyi különbséget sem sikerült detektálni a nagyfelbontású ALF express II. készülékkel sem.

Ezt követően próbálkoztunk az AFLP technikával, ami akár egy bázispárnyi különbség kimutatását is lehetővé teszi. Különböző hasító enzimeket (adapterek: *EcoRI 33, EcoRI 36, EcoRI 37, EcoRI 44, MseI 48, MseI 55, MseI 60, MseI 61*) használtunk a felbontás növelése érdekében. Némely esetben olyan fragmentumok is megjelentek egyes rügymutánsok esetében, melyek a többiből hiányoztak. A polimorf AFLP fragmentumokból átkonvertált SCAR markerek azonban nem bizonyultak alkalmasnak a rügymutánsok elkülönítésére és a velük kimutatható különbségek egyedieknek és nem genotípus-specifikusnak bizonyultak. Végeredményben az AFLP technika alkalmazásával sem tudtunk a rügymutánsok között polimorfizmust detektálni.

Miután sem az SSR, sem az AFLP technikával sem sikerült eredményt elérnünk, az S-SAP technikával próbálkoztunk. Az S-SAP módszer kifejlesztésével lehetővé vált, hogy a retrotranszpozonok genomon belüli – maguknak a kedvező jellegekkel bíró rügymutánsoknak a kialakulásához vezető – áthelyeződéseiből származó polimorfizmusokat lehessen detektálni. Ez a technológia kombinálja az AFLP technika felbontó képességét egy kiválasztott primer szekvencia specifitásával (ebben az esetben LTR szekvenciák a célzott elemek a genomban). A technika lényege, hogy a retrotranszpozon primerek 5’ végét festjük csak meg, s ezáltal jelenítik meg a fragmentumot, melyet a retrotranszpozon primer és a különböző hasító enzimek együttes használata szaporítana fel.

A retrotranszpozon alapú polimorfizmus keresést az indokolta, hogy a rügymutánsok megjelenésének egyik valószínűsíthető oka az ugráló genetikai elemek (retrotanszpozonok) DNS kódoló szakaszaiba való beépülése következtében létrejövő mutációk.

Összesen 24 primer kombináció (3 Ret-LTR × 8 adapter specifikus primer) termékét elemeztük és értékeltük. A különböző primer kombinációkkal végzett reakciók 11-71 fragmentumot szaporítottak fel, ami azt jelzi, hogy a vizsgált retrotranszpozonok száma az alma genomjában meglehetősen nagy. Összesen 4368 fragmentumot sikerült felszaporítanunk. Az Ret-LTR3 + EcoRI-33 primer kombináció adta a legmagasabb, Ret-LTR2 + MseI-55 primer kombináció pedig a legalacsonyabb fragmentum számot mind a 6 rügymutáns csoport esetében. Mindössze egyetlen egy kombinációval (Eco-33 és Ret-LTR1) sikerült polimorfizmust detektálnunk, mellyel a ’Jonathan’ alapfajta vált megkülönböztethetővé a rügymutánsaitól. Az összes többi esetben a genotípusok

egymástól elkülöníthetetlenek maradtak, még egyedi szintű polimorfizmust sem tudtunk kimutatni.

A vizsgált rügymutáns csoportok esetében a ’Jonathan’ fajtakörön kívül nem sikerült eltérést deketálnunk az általunk alkalmazott 3 molekuláris technikával. A ’Jonathan’ fajtakörön belül is csak az alapfajtát sikerült elkülönítenünk a csoport többi rügymutánsától, ugyanis egy plusz fragmentum szaporodott fel az alapfajtában, mely hiányzott az összes rügymutánsában. A jövőben célszerűnek látszik a fragmentumot SCAR markerré konvertálni.
Az egyes fajtakörök klónjai között a DNS kódoló szakaszai szekvencia eltéréseinek kimutatására és bizonyítására, az alapfajta és az egyes rügymutánsok szekvenálása ad majd lehetőséget a jövőben.

7. SUMMARY

RESISTANCE GENE ASSOCIATED MARKERS

The applied molecular approaches: bioinformatic analysis of NCBI database, design of degenerate primers and PCR reaction with degenerate primers. Cloning fragments into plasmid vector, then transforming competent cells. Testing recombinant bacteria - colony PCR. Plasmid isolation, sequencing and evaluation of sequences. SCAR marker design and testing.

We were looking for sequences that are identical in different plant species or at least show a high rate of homology. We were seeking conserved regions of plant resistance genes in NCBI gene bank for designing degenerate primers. Bioedit software was applied for alignment of different conserved regions from different plants.

With these primers we were able to amplify fragments from both TIR-NBS-LRR and CC-NBS-LRR type resistance genes. After designing the primers PCR reactions were started using isolated DNA from resistant and susceptible genotypes as template. Since it is well-known that in plant genome hundreds of this kind of sequence exists we expected that we might obtain fragments which appear only in resistant genotypes. Unfortunately, we could not detect any size difference. Same size fragments were obtained in high copy number for disease resistant and susceptible genotypes as well.

Subsequently, amplified fragments with TIR1 F-and P-loop-R degenerate primers were cloned into pGEM T-easy vector. For ligation PCR products were used in order to clone all sequences which have the same size but differ in sequence. From white colonies regrown in selective medium masterplate was created.

PCR was started with the same degenerate primers from colonies which remained white after a few days. With these primers amplification of the fragments was performed. With this approach we have propagated the unique cloned sequences.

Purified plasmid DNA was isolated from 12 colonies which were positive with colony PCR. For fragment sequencing T7 and SP6 universal primers were used. Their nucleotide sequences were converted into amino acid sequences by Bioedit software then similarity was examined with other RGA candidates at amino acid level. With BLAST application protein sequences which probably have an important role in various resistances were compared to our amino acid sequences.

The evaluation revealed that 5 RGA candidates (NCBI ID: EF455013-EF455017) do not contain any sequence motifs essential in resistance development according previous publications. These motifs are present in each resistance gene and RGA. However, in case of other 9 RGAs, the alignment proved that resistance patterns (P-loop, RNSB-A, Tyrosine kinase-2, RNSB-B,-C RNSB, GLPL) are present and show high level of homology at amino acid level with previously descibed RGA sequences.

In order to identify these RGAs, these were converted to SCAR markers. In all cases (resistant, susceptible subjects) - except for one genotype - SCAR markers reproduced the same size of fragment. Since plant genome contains even hundreds of sequences which contain the conserved regions that we tested, it is possible that the isolated fragments are responsible for the general resistance of plants.

Only in case of Arga-4 primer a fragment without difference between resistant and susceptible subjects was received. There was no amplified fragment in case of 'Remo' variety. As in the rest of resistant subjects amplified fragments were detected in all case, we conclude that a mutation might have happened at the primer hybridization site in case of 'Remo' and this is why Arga-4 SCAR marker is not successful for fragment amplification. Further tests are necessary.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF HUNGARIAN APPLE GENBANK GENOTYPES AND COMMERCIAL VARIETIES WITH SSR MARKERS

Applied molecular techniques: selection of SSR primers and start of PCR reaction. Determination of allele sizes on polyacrylamide gel, statistical evaluations and dendrogram preparation.

Each of the applied 6 SSR generated reliable microsatellite alleles in all 40 genotypes (cultivars, varieties). A total of 71 polymorphic alleles were amplified (average 11.8 allele / locus) and average PIC values (0.8) of markers proved to be high. The repeated PCR reactions showed the same results.

The probability of that two randomly chosen varieties display the same genotype at all investigated loci was calculated to be very low (2.53 × 10-5 which means 1 : 39525). This confirms the high potential of SSRs for differenetation of apple varieties.

In the next step the similarity matrices were calculated from 66 previously described commercial cultivars (Galli et al. 2005) in order to compare the results with that of the varieties. In case of commercial varieties PIC values were very high, especially in case of CH04e03, CH05d11 markers. However, according to PIC values the examined varieties (40) were more different from each other (average PIC: 0.8) than the commercial varieties (average PIC: 0.72). The comparison also showed that there are many more similarities among varieties than among the tested commercial cultivars. The comparison of PIC results also shows that the ancestors of commercial cultivars presumably with a much smaller plant material have been selected since the average PIC values showed a smaller value than in case of varieties.

In the next step, "European Standard" marker set was adopted for 37 varieties. A total of 84 polymorphic alleles were amplified (average 10.5 allele / locus) and average PIC values (0.72) of markers proved to be high. CH02c06 marker proved to be the best with its 15 alleles for distinction while CH04c06 proved to be the weakest with its 4 amplified alleles. Two markers (CH0406 and CH01h02) proved to be multi loci.

CH05d11 (0.86) and CH05e03 (0.84) markers showed high PIC values comparing with markers from "European Standard" set markers. In our opinion, it would be worth to replace multi loci markers (CH01h02 and CH04c06) to marker CH05d11 and CH05e03 and this would increase the suitability of the series (average PIC would increase from 0.78 to 0.84).

When comparing the dendrogram results of the two marker sets, only 'Újvári őszi' and 'Nyári fontos' show high degree of resemblance. In case of other varieties, however,

very significant differences observed. Results of the two analyses were not overlapping, only the extremely high homology can be detected in both cases. The technique – because of the results of the two different series – is not considered to determinate the relationship between species, however, as the results show, identification and isolation of varieties specifically suited to the SSR technique.

With all of these data a webbased databank were established – Hungarian Apple Microsatellite Databank (MAMA: Magyar Alma Mikroszatellit Adatbank) – containing all SSR allele sizes of the examined cultivars (both commercial and cultivars from this study). Since the aforementioned markers showed enough power to discriminate the cultivars we recommend to employ these for determining the differences and phylogenetic distances of various apple cultivars. The webbased databank may be useful for breeders, breeding agencies and propagate institutes to determinate cultivars since their work could be done easier and more controllable.

MOLECULAR DIFFERENTATION OF BUD MUTANTS

Applied molecular techniques: SSR, AFLP and S-SAP.

Results of fingerprints of varieties proved the reliability to differentiate apple genotypes using microsatellite markers. Based on these results, we tried to discriminate bud mutants molecularly using already described SSR markers. After the 6 set series of SSR markers (Galli et al. 2005) proved to be unsuitable for this purpose the new European SSR set (9 SSR markers) was involved in our experiment. However, we were not able to detect even a single base-pair difference within bud mutants by the high-resolution ALF Express II machine.

Subsequently, AFLP technique was applied which can detect one base pair difference. Different restriction enzymes were used in order to increase the resolution. In some cases, we were able to detect fragments successfully which were missing in other sports. However, SCAR markers converted from polymorphic AFLP fragments did not appear to be suitable for the separation of sports. The detectable differences remain unique and have non genotype-specific nature. In this way they were able to detect differences between individuals – which was not included among our objectives – and not between

bud mutants. In conclusion, AFLP technique was not adaptable to detect polymorphism between sports.

Since neither SSR nor AFLP techniques were suitable to achieve our goal we involved S-SAP technique for trial. With the development of S-SAP it became possible to detect displacements of retrotransposons within the genome. This technology combines the resolution ability of AFLP technique with selected primer sequence specificity (in this case, the target sequences for LTR elements in the genome). Altogether 24 primer combinations (3 Ret-LTR 8 adaptor specific primers) were carried out, their PCR products were visualized. 11-71 multiple bands were produced (altogether 4368 with the 24 primer combination) suggesting that the copy number of these retrotransposon elements is relatively high in apple genome. Ret-LTR3 + EcoRI-33 primer combination produced the most while Ret-LTR2 + MseI-55 primer combination the less multiple band. Surprisingly, only one combination (Eco-33 and Ret-LTR1) was appropriate for identifying polymorphism between the progenitor ‘Jonathan’ and its bud mutants. In other cases, the mutants were indistinguishable from each other; differences were not found even between different individuals within the same somatic mutants. Converting the found bands into a more reliable SCAR marker is under progress.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Heszky László egyetemi tanár és Dr. Galli Zsolt tudományos munkatárs fáradhatatlan segítségét és magas színvonalú szakmai irányítását a kísérletek és tanulmányaim során. Köszönettel tartozom a publikációim és dolgozatom elkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért. Köszönöm tanácsaikat és kutatói szemléletem megalapozását. Köszönettel tartozom Dr. Kiss Erzsébet professzor asszonynak az intézet igazgatójának, a vizsgálatok és laboratóriumi munka során tanúsított segítőkészségéért és szakmai tanácsaiért. Köszönöm a tanszék doktoranduszainak – Szabó Zoltán, Kovács László, Tóth Zoltán, Tisza Viktória, Szőke Antal, Pilinszky Katalin, Veres Anikó, Molnár Stella, Galbács Zsuzsa, Lágler Richárd, Koncz Tímea – segítségét.

Köszönöm a tanszék összes dolgozójának kedvességét, barátságos és segítőkész hozzáállását munkámhoz és tanulmányaimhoz.

Külön köszönet illeti Dr. Szabó Tibort, az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft, tudományos főmunkatársát, együttműködő-készségét. Köszönöm az évek során kérdéseimre adott magas szakmai színvonalú válaszait.

Köszönettel tartozom Családomnak kitartó szeretetükért és támogatásukért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Aarts N, Metz M, Holub E, Staskawicz BJ, Daniels MJ, Parker JE (1998) Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 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

Aderhold R (1902) Ein Beitrag zur Frage der Empfänglichkeit der Apfelsorten für Fusicladium dendriticum (Wallr) Fuckel und deren eziehungen zum Wetter. Arb Ksl Gesdh Amt Biol Abt 2

Afunian MR (2003). Molecular approaches to improving disease resistance in apple and pear http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/40644883

Agrawal DC, Töpfer R, Zyprian E (2006): Grapewine DNA polymorphisms revealed by microsatellite-derived markers from soybean and rice. Vitis, 45 (2) 81-84

Ameline-Torregrosa C, Wang B, O'Bleness MS, Deshpande S, Zhu H, Roe B, Young ND and Cannon SB (2008) Identification and Characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in the Model Plant Medicago truncatula. Plant Physiology 146:5-21

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD & Sorrels ME (1993): Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36:181-186.

Anderson PA, Lawrence GJ, Morrish BC, Ayliffe MA, Finnegan EJ, Ellis JG (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. Plant Cell 9, 641-651

Antonius-Klemola K, Kalendar R, Schulman AH (2006): TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. Theoretical and Applied Genetics, 112: 999-1008.

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

Ballvora A, Ercolano MR, Weiss J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C (2002) The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. Plant Journal 30, 361-371

Batlle I, Alston FH (1996) Genes determining leucine aminopeptidase and mildew resistance from the ornamental apple, 'White Angel'. Theor Appl Genet 93:179–182

Bassil NV, Postman JD, Neou C (2005) Pyrus microsatellite markers from genbank sequences. Acta Hort.; 671:289-92.

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 transsgenic cultivated variety. Proc Natl Acad Sci USA101:886-890

Benaouf G, Parisi L (2000) Genetics of host-pathogen relationships between Venturia inaequalis races 6 and 7 and Malus species. Phytopathology 90:236-242

Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC (1999) The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. Plant Cell 11, 781-792

Bennetzen JL (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. Plant Mol Biol 42:251–269

Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ (1994) RPS2 of Arabidopsis thaliana: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science 265, 1856-1860

Bertani, G (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. J. Bacteriol. 62:293-300.

Beyermann B, Nürnberg P, Weihe A, Meixner M, Epplen JT, Börner T (1992) Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. Theor. Appl. Genet. 83: 691-694.

Bittner-Eddy PD, Beynon JL (2001) The Arabidopsis downy mildew resistance gene, RPP13-Nd, functions independently of NDR1 and EDS1 and does not require the accumulation of salicylic acid. Molecular Plant-Microbe Interaction 14, 416-421

Bödecs L.-né, Tomcsányi P. (1979): Alma. In: Tomcsányi P. (ed.): Gyümölcsfajtáink. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 36–83.

Borhan MH, Holub EB, Beynon JL, Rozwadowski K, Rimmer SR (2004) The arabidopsis TIR-NB-LRR gene RAC1 confers resistance to Albugo candida (white rust) and is dependent on EDS1 but not PAD4. Molecular Plant-Microbe Interaction 17, 711-719

Botella, MA, Coleman MJ, Hughes DE, Nishimura MT, Jones JDG and Somerville SC (1997) Map positions of 47 *Arabidopsis* sequences with sequence similarity to disease resistance. Plant J. 12:1197-121

Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FL, Laurent PL, Kneppers TJ, Hille J, Nijkamp HJ (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to Alternaria alternata f. sp. lycopersici toxins and fumonisin B1. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97, 4961-4966

Breto MP, Ruiz C, Pina JA, Ası´ns MJ (2001) The diversification of Citrus clementina Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. Mol Phylog Evol 21:285–293

Brini W, Mars M and Hormaza JI (2008). Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis L.*) studied with Scientia Horticulturae 115, 4: 337-341

Brisset MN, Faize M, Heintz C, Cesbron S, Chartier R, Tharaud M and Paulin JP (2002). Induced resistance in *Erwinia amylovora* in apple and pear. Acta Hortic. 590:335-338

Brown AG (1975) Apples. In: Janick J, Moore JN (eds) Advances in fruit breeding. Purdue University Press, West Lafayette, Ind., pp 3–37

Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A (2002) The barley stem rust-resistance gene Rpg1 is a novel diseaseresistance gene with homology to receptor kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99, 9328-9333

Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. Plant Cell 12, 2033-2046

Bus VGM, Van de Weg WE, Durel CE, Gessler C, Parisi L, Rikkerink E, Gardiner S, Meulenbroek B, Calenge F, Patocchi A, Laurens F (2004) Delineation of a scab resistance gene cluster on linkage group 2 of apple. Acta Hortic 663:57–62

Bus VGM, Rikkerink EHA, van de Weg WE, Rusholme RL, Gardiner SE, Bassett HCM, Kodde LP, Parisi L, Laurens FND, Meulenbroek EJ, Plummer KM (2005a) The Vh2 and Vh4 scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. Mol Breed 15:103–116

Bus VGM, Laurens FND, Van de Weg WE, Rusholme RL, Rikkerink EHA, Gardiner SE, Bassett HCM, Plummer KM (2005b) The Vh8 locus of a new gene-for-gene interaction between Venturia inaequalis and the wild apple Malus sieversii is closely linked to the Vh2 locus in Malus pumila R12740-7A. New Phytol 166:1035–1049

Bus VGM, Rikkerink EHA, Aldwinckle HS, Caffier V, Durel C-E, Gardiner S, Gessler C, Groenwold R, Laurens F, Le Cam B, Luby J, MacHardy W, Meulenbroek B, Kellerhals M, Parisi L, Patocchi A, Plummer K, Schouten HJ, Tartarini S, van de Weg WE (2009) A proposal for the nomenclature of Venturia inaequalis races. Acta Hortic 814:739–746

Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. Cell 88, 695-705

Caffier V, Laurens F (2005) Breakdown of Pl2, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. Plant Pathol 54:116–124

Caffier V, Parisi L (2007) Development of apple powdery mildew on sources of resistance to Podosphaera leucotricha, exposed to an inoculum virulent against resistance gene Pl-2. Plant Breed 126:319–322

Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EM, Lange W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler FM, Jung C (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science 275, 832-834

Calenge F, Faure A, Goerre M Gebhardt C, Van de Weg WE, Parisi L Durel C-E (2004) 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

Calenge F, Drouet D, Denancé C, Van de Weg WE, Brisset MN, Paulin JP and Durel CE (2005) Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. Theoretical and Applied Genetics 111:128:135

Calenge, F., and Durel, C.-E. (2006). Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. Mol. Breed. 17:1-11. (doi: 10.1007/s11032-006-9004-7)

Chen XM, Line RF and Leung H (1998) Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. Theor. Appl. Genet. 97:345–355

Clement D, Lanaud C, Sabau X, Fouet O, Le Cunff L, Ruiz E, Risterucci AM, Glaszmann JC and Piffanelli P (2004) Creation of BAC genomic resources for cocoa (Theobroma cacao L.) for physical mapping of RGA containing BAC clones. Theor. Appl. Genet. 108:1627–1634

Chevalier M, Lespinasse Y, and Renaudin S (1991). A microscopic study of different classes of symptoms coded by the gene Vf in apple for resistance to scab (Venturia inaequalis). Plant Pathol. 40:249-256.

Chisholm ST, Coaker G, Day B and Staskawicz BJ (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803-814.

Collins N, Drake J, Ayliffe M, Sun Q, Ellis J, Hulbert S, Pryor T (1999) Molecular characterization of the maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. Plant Cell 11, 1365-1376

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

Cooley MB, Pathirana S, Wu HJ, Kachroo P, Klessig DF (2000) Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. Plant Cell 12, 663-676

Cornman RS, Arnold ML (2009) Characterization and comparative analysis of sequence-specific amplified polymorphisms based on two subfamilies of IRRE retrotransposons in Iris missouriensis (Iridaceae). Genetica 135:25–38

Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes D, Chung GJ, and Specht JE (1999): An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. Crop Sci, 39 1464-1490

Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O.Conner PA, Ries SM, Goffreda J, and Voordeckers A (1992). Breeding apples for scab resistance: 1945.1990. Fruit Var. J. 46: 145.166.

Dayton DF (1977) Genetic immunity to apple mildew incited by Podosphaera leucotricha. HortScience 12:225–226.

Dayton DF and Williams EB (1968). Independent genes in Malus for resistance to Venturia inaequalis. Proc Am Soc Hort Sci 92: 89–94.

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.

Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002) Resistance to Ralstonia solanacearum in Arabidopsis thaliana is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99, 2404-2409.

Dondini L, Pierantoni L, Gaiotti F, Chiodini R, Tartarini S, Bazzi C, Sansavini S (2005). Identifying QTLs for fire blight resistance via a European pear (Pyrus cummunis L.) genetic linkage map. MOL. BREED. 4(14): 407-418.

Di Gaspero G, Cipriani G (2003) Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. Mol. Genet. Genomics 269:612–623

Diener AC, Ausubel FM (2005) Resistance to Fusarium oxysporum 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. Genetics 171: 305–321

Dilbirligi M, Erayman M, Sandhu D, Sidhu D and Gill KS (2004) Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. Genet. 166:461–481

Dixon MS, Hatzixanthis K, Jones DA, Harrison K, Jones JD (1998) The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. Plant Cell 10, 1915-1925

Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JD (1996) The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. Cell 84, 451-459

Dunemann F, Bracker G, Markussen T, Roche P (1999) Identification of molecular markers for the major mildew resistance gene Pl2 in apple. Acta Hort 484:411–416

Dunemann F, Peil A, Urbanitz A, Garcia T (2007) Mapping of the apple powdery mildew resistance gene Pl1 and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. Plant Breeding 126, 476-481.

Durel C-E, Van de Weg WE, Venisse J-S, Parisi L (2000) Localisation of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima×Fiesta cross. In: Integrated control of pome fruit diseases. IOBC-WPRS Bull 23:245-246

Durel CE, CalengeF, Parisi L, Van de Weg WE, Kodde LP, Liebhard R, Gessler C, Thiermann M, Dunemann F, Gennari F, Tartarini F, Lespinasse Y (2004) Overview on position and robustness of scab resistance QTL and major genes by alignment of genetic maps in five apple progenies. Acta Hortic 663:135–140

Ellis THN, Poyser SJ, Knox MR, Vershinin AV, Ambrose MJ (1998) Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. Molec Gen Genet 260:9–19

Erdin N, Tartarini S, Broggini GAL, Gennari F, Sansavini S, Gessler C, Patocchi A (2006) Mapping of the apple scab-resistance gene Vb (submitted)

Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, Kloos DU, Phillips MS, Ganal MW (2002) The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. Plant Journal 31, 127-136

Evans KM, James CM (2003) Identification of SCAR markers linked to Pl-w mildew resistance in apple. Theor Apple agenet 106:1178-1183

FAOSTAT 2010. szeptember 02.: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor

Fazio G, Staub JE, Katzir N (2002). Development and characterization of PCR markers in cucumber (cucumis sativus l.). Journal of the American Society for Horticultural Science.

Fischer, C., A.A. Bondarenko & E.S. Artamanova, (1994). Results on the stability of scab resistance in apple breeding. In: Progress in Temperate Fruit Breeding, pp 81–86. Kluwer, Dordrecht, Boston, London.

Flavell RB, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT (1992) Selectable marker genes: safe for plants? Biotechnology 10:141–144

Flor HH (1971) Current status for the gene-for-gene concept. Ann Rev Phytopathol 9:275–296

Forsline PL, Dickson EE, Djangaleau AD (1994): Collection of wild Malus, Vitis and other fruit species genetic resources in Kazakstan and neighbouring republics. HortScience, 39: 4333.

Fourmann M, Charlot F, Froger N, Delourme R, Brunel D (2001). Expression, mapping, and genetic variability of Brassica napus disease resistance gene analogues. Genome 44:1083–1099

Gáborjányi R, Király Z (eds) (2007) Molekuláris Növénykórtan. Agroinform kiadó, Budapest. p. 338.

Galindo LM, Gaitan-Solis E, Baccam P and Tohme J (2004). Isolation and characterization of RNase LTR sequences of Ty1-copia retrotransposons in common bean (Phaseolus vulgaris L). Genome, 47: 84–95

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

Galli Z, Wichmann B, Balazs BD, Kiss E and Heszky LE (2007): Identification of new disease resistance gene analog markers in apple: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/151515090

Galli P, Broggini GAL, Kellerhals M, Gessler C and Patocchi A (2010). High-resolution genetic map of the *Rvi15* (Vr2) apple scab resistance locus. Mol.Breeding DOI 10.1007/s11032-010-9391-7.

Gallott JC, Lamb RC, Aldwinckle HS (1985) Resistance to powdery mildew from some small-fruited Malus cultivars HortScience 20, 1085–7.

Garcia-Martinez J and Martinez-Izquierdo JA (2003). Study on the evolution of the Grande retrotransposon in the Zea genus. Mol. Biol. Evol. 20: 831–841.

Gardiner SE, Bus V, Bassett H, Goodman M, Greer L, Ranatunga C, Rikkerink E, Forster R (1999) Identification of molecular markers linked to major resistances to apple scab, powdery mildew and woolly apple aphid in apple. Abstracts of plant and animal genome VII, San Diego

Gardiner SE, Bus V, Rikkerink E, Rusholme R, Meech S, Cook M, Murdoch J, Gleave A, Bassett H, Crowhurst R (2003) Targeted resistance gene mapping in apple using resistance gene analogues from an EST database. Abstracts of plant and animal genome X, San Diego

Gardiner SE, Bus V, Rusholme R, Chagné D, Rikkerink EHA (2007). Apple. In: Genome mapping and molecular breeding, vol. 4. Kole C (ed) Springer, Heidelberg, pp 1-62

Garkava-Gustavsson L, Kolodinska Brantestam A, Sehic J, Nybom H (2008). Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis – Hereditas 00: 1-14. Lund, Sweden. eISSN 1601-5223.

Gassmann W, Hinsch ME, Staskawicz BJ (1999) The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR–NBS–LRR family of disease-resistance genes. Plant Journal 20, 265-277

Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfrancheschi L (2006). Venturia inaequalis resistance in apple. Critical Reviews in Plant Science 25:473-503

Gianfranceschi, L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, and Gessler C (1998): Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor. Appl. Genet., 96 1069–1076

Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. Plant Journal 36, 353-365

Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. Molecular cell 5, 1003-1011

Guarino C, Santoro S, De Simone L, Lain O, Cipriani G, Testolin R, (2006). Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple (Malus domestica Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 81, 39–44.

Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R (1997): Microsatellites in Malus x domestica (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theor Appl. Genet., 94 249-254

Graham MA, Marek LF and Shoemaker RC (2002) Organization, expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean. Genet. 162:1961–1977

Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. Science 269, 843-846

Gribbon BM, Pearce SR, Kalendar R, Schulman AH, Paulin L, Jack P (1999). Phylogeny and transpositional activity of Ty1-copia group retrotransposons in cereal genomes. Mol. Gen. Genet. 261: 883–891.

Grube RC, Radwanski ER, Jahn M (2000) Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. Genet. 155:873–887

Gu K, Yang B, Tian D, Wu L, Wang D, Sreekala C, Yang F, Chu Z, Wang GL, White FF, Yin Z (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 435, 1122-1125

Gygax M, Gianfranceschi L, Liebhard R, Kellerhals M, Gessler C, Patocchi A (2004) Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vbj derived from Malus baccata jackii. Theor Appl Genet 109:1702–1709

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Halterman D, Zhou F, Wei F, Wise RP, Schulze-Lefert P (2001) The MLA6 coiled-coil, NBS-LRR protein confers AvrMla6-dependent resistance specificity to Blumeria graminis f. sp. hordei in barley and wheat. Plant Journal 25, 335-348

Halterman DA, Wise RP (2004) A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley MLA6 and MLA13 alleviates dependence on RAR1 for disease resistance signaling. Plant Journal 38, 215-226

Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol. 166(4):557-80.

Han YP, Kseni G, Schuyler SK (2007) Multiple-copy cluster-type organization and evolution of genes encoding O-methyltransferases in the apple. Genetics 176:2625–2635

Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ (1998). The effect of the lacY gene on the introduction of IPTG inducible promoters, studied in Echerichia coli and Pseudomonas fluorescens. Curr. Microbiol. 36 (6): 341–7.

Hammond-Kosack KE, Jones JD (1997) Plant Disease Resistance Genes. Annual Review Plant Physiologyogy and Plant Molecular Biology 48, 575-607

Hammond-Kosack KE and Parker JE (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr. Opin. Biotechnol. 14: 177-193.

Hattendorf A and Debener T (2007). Molecular characterization of NBS-LRR-RGAs in the rose genome. Physiologia Plantarum 129: 775–786.

Hemmat M, Weeden NF, Szewc-McFadden AK, Hokanson SC (1998): Mapping of Malus domestica Microsatellites in Apple and Pear. Plant & Animal Genome VI Conference, San Diego

Hemmat M, Brown SK (2002) Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. J Am Soc Hortic Sci 127:365-370

Hemmat M, Brown SK, Aldwinckle HS, Weeden NF (2003). Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from 'Antonovka' and 'Hansen's baccata #2'. Acta Hortic. 622: 153-161.

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

Hough LF (1944). A survey of the scab resistance of the foliage on seedlings in selected apple progenies. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci 4:260-272

Hough LF and Shay JR (1952). Inheritance of cedar rust resistance in apple. Phytopathology 42:19.

Huang L, Brooks SA, Li W, Fellers JP, Trick HN, Gill BS (2003) Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. Genetics 164, 655-664

Huang S, van der Vossen EA, Kuang H, Vleeshouwers VG, Zhang N, Borm TJ, van Eck HJ, Baker B, Jacobsen E, Visser RG (2005) Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. Plant Journal 42, 251-261

Huettel B, Santra D, Muehlbauer J and Kahl G (2002) Resistance gene analogues of chickpea (Cicer arietinum L.): Isolation, genetic mapping and association with a Fusarium resistance gene cluster. Theor. Appl. Genet. 105:479–490.

Hunger S, Di Gaspero G, Mohring S, Bellin D, Schafer-Pregl R, Borchardt DC, Durel CE, Werber M, Weisshaar B, Salamini F and Schneider K (2003) Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (Beta vulgaris L.). Genome 46: 70–82

Irigoyen ML, Loarce Y, Fominaya A and Ferrer E (2004) Isolation and mapping of resistance gene analogs from the Avena strigosa genome. Theor. Appl. Genet. 109: 713–724

Jaccard, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44:223-270.

James CM, Clarke JB and Evans KM (2004a) Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene Pl-d in apple. Theoretical and Applied Genetics 110:175-181

James CM, Evans KM (2004b) Identification of molecular markers linked to the mildew resistance genes Pl-d and Pl-w in apple. Acta Hort 663:123–127

Jansen RC (1994) Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. Genetics 138: 871–881

Johal GS, Briggs SP (1992) Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. Science 258, 985-987

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JD (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to Cladosporium fulvum by transposon tagging. Science 266, 789-793

Jones J DG and Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444 323–329

Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE, Dean RA (2004) The Fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. Plant Journal 39, 283-297

Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based finger- printing techniques. Theor Appl Genet, 98:704–711

Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11746–11750.

Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, Fischer R, Prufer D (2001) Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98, 6511-6515

Kellerhals M, Dolega E, Dilworth E, Koller B and Gessler C (2000). Advances in marker-assisted apple breeding. Acta Hort. 583: 535–540

Kellerhals M und Christen D (2006). Innovative Obstzüchtung von ACW. Schweiz. Z. Obst- und Weinbau 15, 8-11.

Kellerhals M, von Burg S, Knobel PA, Patocchi A, Duffy B, Christen D, Frey J (2007). Sélection de nouvelles variétés de pommes à Agroscope ACW. Revue suisse Vitic Arboric Hortic. 39, 287-292.

Khan MA, Duffy B, Gessler C, Patocchi A (2006). QTL mapping of fire blight resistance in apple. Molecular Breeding 17, 299-306.

Khan MA, Duffy B, Durel C-E, Denancé C, Kellerhals M, Patocchi A, Gessler C (2007) Development of markers linked to the 'Fiesta' 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. Genome 50, 568-577

King GJ, Alston FH, Batlle I, Chevreau E, Gessler C, Janse J, Lindhout P, Manganaris AG, Sansavini S, Schmidt H, Tobutt KR (1991) ''The European Apple Genome mapping Project''—developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. Euphytica 56: 89–94

Király Ildikó, Dr. Pedryc Andrzej Piotr, Dr. Halász Júlia, Deák Tamás, Dr. Tóth Magdolna (2009): Parent identification of Hungarian apple cultivars using SSR markers. *Acta Horticulturae* 839, 471-477.

Király Z (2004) Védekezési mechanizmusok az élővilágban. Magyar Tudomány, 2004/10 1090

Kiss E. (1999): Növényi molekuláris genetika I. Egyetemi jegyzet. SZIE Genetika és Növénynemesítés Tanszék, Gödöllő

Koch T, Kellerhals M and Gessler C (2000). Virulence pattern of Venturia inaequalis field isolates and corresponding differential resistance in Malus domestica. J. Phytopathol. 148:357-364.

Kobayashi S, Goto-Yomomato N, Hirochika H (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science 304:982.

Kohpayegani JA and Behbahani M (2008). Genetic Diversity of Some Populations of Iranian Melon Using SSR Markers. Biotechnology. 7:1:19-26

Korban SS and Chen H (1992). Apple. In Litz R and F. A. Hammerschlag (Eds). Biotechnology of perennial fruit crops. CAB Intl., Wallingford, UK, pp. 203-227.

Kovács S (1984). Új almafajták előállítása. Folyóiratcikkek és szakkönyvek ajánló bibliográfiája a Magyar Mezőgazdasági Bibliográfia alapján az Országos Mezőgazdasági Könyvtár állományából B 15669.

Knight RL, Alston FH (1968) Sources of field immunity to mildew (Podosphaera leucotricha)in apple. Canadian Journal of Genetics and Cytology 10, 294–8.

Kumar A, Bennetzen JL (1999). Plant retrotransposons. Annu Rev Genet. 1999;33:479-532.

Labra M, Imazio S, Grassi F, Rossoni M and Sala F (2004). Vine-1 retrotransposon-based sequence-specific amplified polymorphism for Vitis vinifera L genotyping. Plant Breed. 123: 180–185.

Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Res, 21 1111-1115

Lamboy WF, Yu F, Forsline PL, Weeden NF (1996): Partioning of allozyme in wild populations of Malus sieversii L. and implication for germplasm collection. Journal of the American Society for Horticultural Science, 121 (5): 982-987.

Laurens, F. (1999). Review of the current apple breeding programmes in the world: objectives for scion cultivar improvement. Acta Hort. 484: 163–170.

Laurens F, CE Durel, and M Lascostes (2004) Molecular characterization of French local apple cultivars using SSRs. Acta Hort. 663: 639-642

Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG (1995) The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. Plant Cell 7, 1195-1206

Lee SY, Seo JS, Rodriguez-Lanetty M, Lee DH (2003) Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. Mol Gen Genomics 269: 101–108

Lee SY, Choi YJ and Lee DH (2003). Overexpression of the Apple MbR7 Encoding a TIR-NBS-LRR Type of R gene Induce Enhanced Resistance of Transgenic Arabidopsis Infection with Bacterial Pathogen
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/37574596

Lee SY, Seo JS, Rodriguez-Lanetty M and Lee DH (2008): Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/21745045

Leigh F, Kalendar R, Lea V, Lee D, Donni P, Schulman AH (2003). Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. Mol Gen Genet 269:464–474

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

Lesemann, S and Dunemann, F (2006) Recent findings on the biodiversity of the apple powdery mildew pathogen. Gesunde-Pflanzen 58:117-123

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

Lespinasse Y, Godicheau M, Olivier JM (1979) Etudes enterprises dans le cadre de la re«sistance a` la tavelure du pommier. In: Proc EUCARPIA Fruit Section Symp Tree Fruit Breed, Angers, France, pp 97Đ110

Lespinasse Y, Aldwinckle H (2000) Breeding for resistance to fire blight. In: Vanneste J-L (ed) Fire blight: the disease and its causative agent: Erwinia amylovora. CAB Int, Wallingford, pp 253–273

Liebhard 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

Liebhard L, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C (2003): Creating a saturated reference map for the apple (Malus x domestica Borkh.) genome. Theor. Appl. Genet., 106 1497-1508

Liu JJ and Ekramoddoullah AK (2003) Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (Pinus monticola Dougl. Ex. D. Don.). Mol. Genet. Genomics 270:432–441

Lou QF and Chen JF (2007) Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits. Genome 50(9):802-810

Mac Hardy WE (1996) Apple scab biology, epidemiology, and management. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.

Madsen LH, Fukai E, Radutoiu S, Yost CK, Sandal N, Schauser L and Stougaard J (2005). LORE1, an active low-copy-number TY3-gypsy retrotransposon family in the model legume Lotus japonicus. Plant J. 44: 372–381.

Mago R, Nair S, Mohan M (1999). Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. Theor Appl Genet 99:50–57

Maliepaard C, Alston FH, Van Arkel G, Brown LM, Chevreau E, Dunemann F, Evans KM, Gardiner S, Guilford P, Van Heusden AW, Janse J., Laurens F, Lynn JR, Manganaris AG, Den Nijs APM, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmidt H, Tartarini S, Verhaegh JJ, Vrielink-Van Ginkel M, and King GJ (1998). Aligning male and female linkage maps of apple (Malus pumila Mill.) using multi-allelic markers. Theor. Appl. Genet. 97:60-73.

Malnoy M, Xu M, Borejsza-Wysocka E, Korban SS, Aldwinckle HS (2008) Two receptor-like genes, Vfa1 and Vfa2, confer resistance to the fungal pathogen Venturia inaequalis inciting apple scab disease. Mol Plant icrobe Interact 21:448–458.

Marathe R, Anandalakshmi R, Liu YL and Dinesh-Kumar SP (2002). The tobacco mosaic virus resistance gene, N. Molec. Plant Pathol. 3: 167-172.

Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganal MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262, 1432-1436

Markussen T, Kruger J, Schmidt H, Dunemann F (1995) Identification of PCR-based markers linked to the powdery mildew resistance gene Pl1 from M. robusta in cultivated apple. Plant Breed 114:530–534

McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub EB, Dangl JL (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of Arabidopsis. Plant Cell 10, 1861-1874

McHale, L., Tan, X., Koehl, P., and Michelmore, R. W. (2006) Plant NBSLRR proteins: Adaptable guards. Genome Biol. 7:212

McIntyre CL, Casu RE, Drenth J, Knight D, Whan VA, Croft BJ, Jordan DR and Manners JM (2005) Resistance gene analogues in sugarcane and sorghum and their association with quantitative trait loci for rust resistance. Genome 48:391–400

Merdinoglu D, Butterlin G, Bevilacqua L, Chiquet L, Adam-Blondon AF and Decroocq S (2005). Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. Mol. Breed. 15:349–366.

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

Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. Plant Cell 10, 1307-1319

Mindrinos M, Katagiri F, Yu GL, Ausubel FM (1994) The A. thaliana disease-resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. Cell 78:1089–1099

Mimura M, Coyne CJ, Bambuck MW and Lumpkin TA (2007) SSR Diversity of Vegetable Soybean [Glycine max (L.) Merr.]. Genetic Resources and Crop Evolution, 54:497–508

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

Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BE and Dangl JL (2003). Recognition and response in the plant immune system. Annu. Rev. Genet. 37: 579-609.

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

Oraguzie NC, Yamamoto T, Soejima J, Suzuki T, De Silva HN (2005) DNA fingerprinting of apple (Malus spp.) rootstocks using Simple Sequence Repeats. Plant Breeding 124:197-202

Palara U, Sansavini S, Grandi M (1987). Cultivar e selezioni di melo resistenti alla ticchiolatura. Frutticoltura, 9/10: 37-43.

Pan Q and Wendel JF (2001) Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. J. Mol. Evol. 50:203–213

Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumès J and Krüger J (1993) A new race of Venturia inaequalis virulent to apples with resistance due to the Vf gene. Phytopathol 93: 533–537

Paris HS, Yonash N, Portnoy V, Mozes-Daube N, Tzuri G, Katzir N (2003). Assessment of genetic relationships in Cucurbita pepo (Cucurbitaceae) using DNA markers. Theor Appl Genet 106:971–978

Patocchi A, Gianfranceschi L, Gessler C (1999) Towards the map-based cloning of Vf: fine and physical mapping of the Vf region. Theor Appl Genet 99:1012–1017.

Patocchi A, Bigler B, Koller B, Liebhard 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

Patocchi A, Bigler B, Koller B, Kellerhals M, Gessler C (2004) Vr2: a new apple scab resistance gene. Theor Appl Genet 109:1087–1092

Patocchi A, Walser M, Tartarini S, Broggini GAL, Gennari F, Sansavini S, Gessler C (2005) Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene Vm. Genome 48:630–636

Patocchi A, Frei A, Frey JE, Kellerhals M (2009) Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: Venturia inaequalis virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes. Mol Breed (online first). 10.1007/s11032-009-9295-6

Pearce SR, Knox M, Ellis THN, Flavell AJ, Kumar A (2000). Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in Pisum. Mol Gen Genet 263:898–907

Pedryc A., Ruthner Sz., Bisztray Gy. (2002): The use of SSR markers in family Rosaceae. International Journal of Horticultural Science, 8 (2): 29-32.

Peil A, Garcia-Libreros T, Richter K, Trognitz FC, Trognitz B, Hanke MV, Flachowsky H (2007) Strong evidence for a fire blight resistance gene of Malus robusta located on linkage group 3. Plant Breeding 126, 470-475.

Pelsy F (2007) Untranslated leader region polymorphism of Tvv1, a retrotransposon family, is a novel marker useful for analyzing genetic diversity and relatedness in the genus Vitis. Theor Appl Genet 116:15–27

Penuela S, Danesh S and Young ND (2002) Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of non-TIR NBS-LRR genes in soybean. Theor. Appl. Genet. 104:261–272.

Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM and Díaz-Hernández MB (2008), Genetic assessment of local apple cultivars from La Palma, Spain, using simple sequence repeats (SSRs) Scientia Horticulturae 117:160-166.

Pethő F és Karádi I (1978). Almatermesztés a házikertben. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.

Pilotti M, Tizzani L, Brunetti A, Gervasi F and Gallelli A (2009). Gene candidates for pathogen perception in Corylus avellana http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/225349356

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

Quint M, Dussle CM, Melchinger AM and Lubberstedt T (2003) Identification of genetically linked RGAs by BAC screening in maize and implications for gene cloning, mapping and MAS. Theor. Appl. Genet. 106:1171–1177

Radwan O, Bouzidi MF, Nicolas P and Mouzeyar S (2004) Development of PCR markers for the Pl5/Pl8 locus for resistance to Plasmopara halstedii in sunflower, Helianthus annuus L. from complete CC-NBS-LRR sequences. Theor. Appl. Genet. 109:176–185

Rajesh PN, Coyne C, Meksem K, Sharma KD, Gupta V and Muehlbauer FJ (2004) Construction of a HindIII Bacterial Artificial Chromosome library and its use in identification of clones associated with disease resistance in chickpea. Theor. Appl. Genet. 108:663–669

Reim S, Flachowsky H, Michael M and Hanke MV (2006): Assessing gene flow in apple using a descendant of Malus sieversii var. sieversii f. niedzwetzkyana as an identifier for pollen dispersal. ENVIRON BIOSAFETY RES. 5: 89-104

Rikkerink EHA, HilarioE, Thrush A, Gardiner SE, Bassett HC, Jordan M, Bus VGM, Forster RLS and Crowhurst RN (2006). PCR-based cloning of fragments from the Apple NBS LRR gene class and phylogenetic analysis identifies clades widely conserved in the Rosids: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/108947215

Rossi M, Araujo PG, Paulet F, Garsmeur O, Dias VM, Chen H, Van Sluys MA and D'Hont A (2003). Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. Mol. Genet. Genomics 269:406–419

Scott KD, Eggler P, Seaton G, Rosetto EM, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2000): Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor. Appl. Genet., 100 723-726

Seglias N, Gessler C (1997) Genetics of apple powdery mildew resistance from Malus zumi (Pl2). Integrated control of pome fruit diseases. IOBC-WPRS Bulletin 20(9):195–208

Senior ML, Chin ECL, Lee M, Stuber CW, Smith JSC (1996). Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the Genbank database: map construction. Crop Sci. 1996;36:1676-1683

Schornack S, Ballvora A, Gurlebeck D, Peart J, Baulcombe D, Ganal M, Baker B, Bonas U, Lahaye T (2004) The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIRNB- LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. Plant Journal 37, 46-60

Schulman AH, Flavell AJ, Ellis TH (2004) The application of LTR retrotranspons as molecular markers in plants. Methods Molec Biol 260:145–173

Shen KA, Chin DB, Arroyo-Garcia R, Ochoa OE, Lavelle DO, Wroblewski T, Meyers BC, Michelmore RW (2002) Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. Molecular Plant-Microbe Interaction 15, 251-261

Shen XL, Guo WZ, Zhu XF, Yuan YL, Yu J, Kohel RJ, Zhang TZ (2005) Molecular mapping of QTLs for fiber qualities in three diverse lines in Upland cotton using SSR markers. Mol Breed 15:169–181

Silbereisen R, Götz G and Hartmann W (1996). Obstsorten-Atlas.Eugen Ulmer.

Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, Van de Weg VE, Van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F, Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A (2006) Microsatellite markers spanning the apple (Malus x domestica Borkh.) genome. Tree Genetics & Genomes (2006) 2: 202–224

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, VosP (1998) Dissection of the Fusarium I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. Plant Cell 10, 1055-1068

Simon CJ, Weeden NF (1991) Elucidation of crab apple lineage by direct examination of rDNA sequences. Malus 5:4–6

Soengas P, Velasco P, Padilla G, Ordas A, Cartea ME (2006). Genetic relationships among Brassica napus crops based on SSR markers. HortScience 41, 5:1195-1199

Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang J (2003) Gene RB cloned from Solanum bulbocastanum confers broad spectrum resistance to potato late blight. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100, 9128-9133

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. Science 270, 1804-1806

Soriano JM, Joshi SG, van Kaauwen M, Noordijk Y, Groenwold R, Henken B, van de Weg WE, Schouten HJ (2009) Identification and mapping of the novel apple scab resistance gene Vd3. Tree Genet Genomes 5:1614–2942. doi: 10.1007/s11295-009-0201-5

Stankiewicz-Kozyl M, Pitera E, Gawronski SW (2005) Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U 211. Plant Breeding 124:63–66

Sun X, Cao Y, Yang Z, Xu C, Li X, Wang S, Zhang Q (2004) Xa26, a gene conferring resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant Journal 37, 517-527

Sun J, Fang JG, Wang F, Sun QB, Zhang Z (2010). Characterisation of RNaseH-LTR sections of Ty1-copia retrotransposons in apple and fingerprinting of four apple clones by S-SAP analysis. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 85, 53-58

Soleiman, V.D., Baum, B.R. & Johnson, D.A. (2005): Genetic diversity among barley cultivars assessed by sequence-specific amplification polymorphism. Theor. Appl. Genet. 110 (7): 1290–1300.

Soleiman, V.D., Baum, B.R. & Johnson, D.A. (2007): Analysis of genetic diversity in barley cultivars reveals incongruence between S-SAP, SNP and pedigree data. Genetic Res. and Crop Evol. 54 (1): 83–97.

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

Surányi D. (1998): A gyümölcsfajok és -fajták származása és keletkezése. 17-41. p. In: Soltész M. (Szerk.): Gyümölcsfajtaismeret és –használat. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 511 p.

Swiderski MR, Innes RW (2001) The Arabidopsis PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. Plant Journal 26, 101-112

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

Tahara M, Aoki T, Suzuka S, Yamashita H, Tanaka M, Matsunaga S, and Kokumai S (2004). Isolation of an active element from a high-copy-number family of retrotransposons in the sweetpotato genome. Mol. Genet. Genomics, 272: 116–127.

Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE, Staskawicz BJ (1999) Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96, 14153-14158

Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y, Dinesh-Kumar SP (2002) RCY1, an Arabidopsis thaliana RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. Plant Journal 32, 655-667

Taler D, Galperin M, Benjamin I, Cohen Y, Kenigsbuch D (2004) Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. Plant Cell 16, 172-184

Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR and Grandbastien MA (2005). Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. Theor. Appl. Genet. 110: 819–831.

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. Procedings of the Eucarpia symposium on fruit breeding and genetics, Angers

Terpó A. (1974): Gyümölcstermő növényeink rendszertana és földrajza. 139-219. p. In: Gyuró F. (Szerk.): A gyümölcstermesztés alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 797p.

Tessier CJ, David P, This J, Boursiquot M & Charrier A (1999): Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in Vitis vinifera L. Theor. Appl. Genet. 98:171-177.

Thomas MR, Scott NS (1993): Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor Appl Genet, 86 985-990

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

Tor M, Brown D, Cooper A, Woods-Tor A, Sjolander K, Jones JD, Holub EB (2004) Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP27 encodes a receptor-like protein similar to CLAVATA2 and tomato Cf-9. Plant Physiology 135, 1100-1112

Trognitz FC and Trognitz BR (2005) Survey of resistance gene analogs in Solanum caripense, a relative of potato and tomato, and update on R gene genealogy. Mol. Genet. Genomics 274:595–605

Ueda H, Yamaguchi Y and Sano H (2006). Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance proten, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. Plant Molec. Biol. 61:31-45.

van Leeuwen H, Garcia-Mas J, Coca M, Puigdomenech P and Monfort A (2005) Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. Mol. Genet. Genomics 273:240–251

van der Biezen EA, Freddie CT, Kahn K, Parker JE, Jones JD (2002) Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. Plant Journal 29, 439-451

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

van der Vossen EA, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs S (2005) The Rpi-blb2 gene from Solanum bulbocastanum is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. Plant J 44: 208–222

Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MK, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagné D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F

and Viola R (2010). The genome of the domesticated apple (Malus × domestica Borkh.). Nature Genetics 42, 833 - 839

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

Venturi S, Franceschi PD, Dondini L, Sansavini S (2009) Retrotransposon based markers to discriminate sports in pear. Acta Hort 814:701–704

Vicente JG, King GJ (2001) Characterisation of disease gene-like sequences in Brassica oleracea L. Theor Appl Genet 102:555–563

Vidal S, Cabrera H, Andersson RA, Fredriksson A, Valkonen JP (2002) Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. Molecular Plant-Microbe Interaction 15, 717-727

Vinatzer BA, Patocchi A, Tartarini S, Gianfranceschi L, Sansavini S, Gessler C (2004) Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in Malus germplasm. Plant Breed 123:321–326

Virscek-Marn M, Javornik B, Stampar F and Bohanec B (1999). Assessment of genetic variation among regenerants from in vitro apple leaves using molecular markers. Acta Hort. 484 pp. 299–303.

Visser T, Verhaegh JJ (1976) Review of tree fruit breeding carried out at the Institute for Horticultural Plant Breeding at Wageningen from 1951–1976. In: Proceedings of the Eucarpiameeting of tree fruit breeding, Wageningen, 1976, pp 113–132

Visser T, Verhaegh JJ (1980) Resistance to powdery mildew (Podosphaera leucotricha) of apple seedlings growing under glasshouse and nursery conditions. In: Proceedings of the Eucarpia meeting of fruit tree breeding, Angers, 1979, pp 111–120

Volk GM, Richards CM, Henk AD, Reilley AA, Bassil NV and Postman JD (2006). Diversity of wild Pyrus communis based on microsatellite analyses, J. Am. Soc. Horticultural Sci. 131 pp. 408–417.

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

Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994): Survey of plant short tandem repeats. Theor Appl Genet, 88 1-6

Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999) The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Plant Journal 19, 55-64

Wang YJ, Zhang HL and Zhang,C.H. (2008). Identification and Characterization of Resistance Gene Analogs (RGAs) from Pyrus Species. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/209981207

Warren RF, Henk A, Mowery P, Holub E, Innes RW (1998) A mutation within the leucine-rich repeat domain of the Arabidopsis disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. Plant Cell 10, 1439-1452

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

Way RD, Aldwinckle HS, Lamb RC, Rejman A, Sansavini S, Shen T, Watkins R, Westwood MN, Yoshida Y (1991) Apples (Malus). In: Moore JN, Ballington JR (eds) Genetic resources of temperate fruit and nut crops. Int Soc Hortic Sci, Wageningen, pp 1–62 (Acta Hortic vol 290)

Weber JL, May PE (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet, 44 388-396. p.

Weising K, Ramser J, Kaemmer D, Kahl G and Epplen JT (1991) Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. In: T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys and R. Wolff, Editors, DNA fingerprinting approaches and applications, Burkhauser, Basel pp. 312–328.

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.

Wichmann B, Galli Z, Kiss E, Szabo Z, Heszky L (2009) Identification of new disease resistance gene analog markers in apple: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nuccore&cmd=search&term=wichmann%20malus

Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. Cell 78, 1101-1115

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.

Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG (2001) Broad-spectrum mildew resistance in Arabidopsis thaliana mediated by RPW8. Science 291, 118-120

Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene Pm3b from hexaploid wheat. Plant Journal 37, 528-538

Yang S, Gu T, Pan C, Feng Z, Ding J, Hang Y, Chen J and Tian D (2008) Genetic variation of NBS-LRR class resistance genes in rice lines. Theor. Appl. Genet 116:165-177

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

Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T (1998) Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95, 1663-1668

Yu YG, Buss GR and Maroof MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11751–11756

Yu GX and Wise RP (2000) An anchored AFLP and retrotransposon-based map of diploid Avena. Genome 43:736–749

Yuksel B, Estill JC, Schulze SR and Paterson AH (2005). Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut. Mol. Genet.

Zeven AC, de Wet JMJ (1982): Musaceae. 140–141. p. In: Zeven AC, de Wet JMJ (editors) Dictionary of Cultivated Plants and Their Region of Diversity. Pudoc. Wageningen, The Netherlands.

Zeven AC, Zhukovsky PM (1975): Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, 219 p.

Zhao, G., Zhang, Z., Sun, H., Li, H. & Dai, H. (2007): Isolation of Ty1-copia-like retrotransposon sequences from the apple genome by chromosome walking based on modified sitefinding-polymerase chain reaction. Acta Biochim. Biophys. Sin. 39 (9): 675–683. Genomics 274:248–263

Zhao G, Dai H, Chang L, Ma Y, Sun H, He P and Zhang Z (2009). Isolation of two novel complete Ty1-copia retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of Malus domestica cv. Fuji. Tree Genetics & Genomes Volume 6, Number 1, 149-159

Zhou F, Kurth J, Wei F, Elliott C, Vale G, Yahiaoui N, Keller B, Somerville S, Wise R, Schulze-Lefert P (2001) Cell-autonomous expression of barley Mla1 confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a Rar1-independent signaling pathway. Plant Cell 13, 337-350

MELLÉKLETEK

1. Melléklet: A vizsgálatban vagy összehasonlításban szereplő fajták pedigréje (aláhúzással jelölve a rügymutánsok)

Fajták	Pedigré adatok
Akane	Szülő fajták: Jonathan x Worcester Pearmen
Angold	Antonovka o.p. x Golden Delicious
Braeburn	Lady Hamilton x Cox narancs renet véletlen magonca
Charden	Golden Delicious x Clochard Renet
Elstar	Golden Delicious x Ingrid Marie
Red Elstar	Elstar mutánsa
Fiesta	Cox narancs renet x Idared
Florina	Querina, Jonathan x PRI 612-1
Fuji	Szülő fajták: Delicious x Ralls Janet,
Gala	Szülő fajták: Golden Delicious x Kidd's Orange Red,
Imperial Gala	Gala mutáns
Regal Prince (Gala Must)	Gala mutáns
Gloster	Glockenapfel x Richared Delicious
Golden Delicious	Grimes Golden szabad megporzású magonca
Goldenir (Lysgolden)	Golden Delicious besugárzott magonca
Golden Reinders	Golden Delicious rügymutációja
Golden Spur	Golden Delicious spur típusu rügymutációja
Gibson Golden Delicious	Golden Delicious rügymutációja
Goldstar	Rubin x Vanda
Granny Smith	French Crab magonca
Greensleeves	James Grieve x Golden Delicious
Idared	'Jonathan x Wagener'
Red Idared	Idared mutációja
Jerseymac	NJ-24 x 'Julyred
Jonager	Egri piros x Jonathan
Jonagold	Szülő fajták: Golden Delicious, Jonathan
Jonathan	Esopus Spitzenberg véletlen magonca
Jonathan M41	Jonathan klón
Jonathan Csányi1	Jonathan rügymutációja
Red Jonathan	Jonathan rügymutációja
Szatmárcsekei Johathan	Jonathan klón
Watson Jonathan	Jonathan rügymutációja
Judeline	(Golden Delicious x Prima)x Malus floribunda 821 keresztezési program F5 nemzedéke
Julyred	N.J.21; (Petrel x Early McIntosh) x [Melba x Williams x Starr)]
Kró óriás	Jonathan x Egri piros
Liberty	'Macoun' x Purdue 54-12
Mizsei	Ismeretlen eredetű véletlen magonc

Mutsu	Golden Delicious x Indo
Ozark Gold	Golden Delicious x (Conrad x Red Delicious)
Pilot	Clivia x Undine
Pink Lady	Lady Williams x Golden Delicious
Pinova	Clivia (Oldenburg x Cox Orange) x Golden Delicious
Poiana	Nem közölt, valószinű jelzése:D1R57T120
Piros	Helios x Apollo
Prima	PRI 14-510 x NJ 123249
Rajka	Sampion x Katka
Reanda	Clivia x Malus floribunda, F3 nemzedék
Red Rome Van Well	Rome Beauty rügymutációja
Red Stayman	Winesap rügymutációja
Reglindis	James Grieve x Antonovka, F2 generáció
Relinda	Undine x Malus floribunda F3
Remo	James Grieve x Malus floribunda F3 nemzedék
Rewena	(Cox narancs renet x Oldenburg) x Malus floribunda F3 nemzedék
Rubinola	Prima x Rubin
Sampion	Golden Delicious x Cox narancs renet
Sir Prize	Tetrapl. Golden Delicious x PRI 14-152
Snygold	Golden Delicious magonca
Starking Delicious	Red Delicious színmutációja
Starkrimson Delicious	Starking rügymutációja
Redchief Delicious	Starkrimson Delicious rügymutációja
Redspur Delicious	Starking rügymutációja
Topred Delicious	Starking rügymutációja
Wellspur Delicious	Starking rügymutációja
Summerred	McIntosh x Golden Delicious
Topaz	Rubin x Vanda

2. Melléklet: A rezisztencia vizsgálatokban szereplő primerek tervezése

Arga-1

	start	hossz	TM	GC%
baloldali PRIMER	293	20	60.27	55.00
TGTTGCCTCCTACGCTTACC				
jobboldali PRIMER	657	20	60.09	50.00
GGGACGAACCAGAACTTGAA				

A PCR termék mérete: 365 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 TGCCTCCCATATCCCTATAAAGCGAACATCGGTTGCATTTGTATCTAAAAGCAAATCTAT
 61 TTCCTCCAGTTTAGAATCAATTCCGACAAACCTCTCTGAGGAATCTAACATTGACAACGT
121 AGGGTGCACTTTCTCCCATAGTGTATTGACGATTCCTTGGATAAGCTCTGTATCATACCT
181 ACAAGAAGAACAAATGACGTAAATAAAAAATCATCACACCGTAAAATAAAGTGCATGTTA
241 ACATCGAAACTCAATAGTAAAANNTTGGTCTTCTTAAGCTATAAACGTCAGTTGTTGCCT
                                                        >>>>>>>>
301 CCTACGCTTACCTATAATGCTTTGAATTCCACCCGGCAAGATTAGCCACCCTTTTTAATG
    >>>>>>>>>>>>
361 ACTTTCTCCACTCATTTACCTCCTCCATGTGTTGCCGATAATTTACTTCATGTTCCGCAA
421 AGGCTTCCCCAAAACTCCCTCGTTGATGGCGTACATCAGAAGGATCCACGCCATAAAAAA
481 TGGGAAAAATTCTCTTTTTCTCTTCCATGCAACGAACAATATGAGTAAGTTCTCGCAAAC
541 ACCAACTTGAAGAAGCAAAGTTTGTCGAAAGAACTATGATCGCAGACATTGATTGGTCAA
601 TTGCCCTCAGGAGCTCTGGATTGATATCTTTCCCTCTTTCAAGTTCTGGTTCGTCCCTGA
                                        <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
661 AAGTCTTGATTCCTCGCGCCTCCAACCGTTTGTATAAATGATCNGTAAAACCCCGGCGGG
721 TGTCTTCTCCTCTAAAACTTAGGAAGCGGCCGC
```

Arga-2

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	101	20	59.36	55.00
GGTGCTTGGCCACTCTTAGT				
jobboldali PRIMER	683	20	59.60	45.00
AGCCAAAGCATTTCAGAAGC				

A PCR termék mérete: 583 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 CCAATTCCGCCAATCCCCCAAATTCCAACCATGACAACATTTGATCTGTCACTTGNNNGA
 61 TGACTGATAATATCTTGAATGCGAGAATTGATACCAACCGGGTGCTTGGCCACTCTTAGT
                                          >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 TTGTTCGTGCTCATAAGCCATTTCGTAATAATATTGTCAACAATTTCTCTAATAAGATTT
181 GCTTCGCGCCTGAAAATTGAATTCATAAACATTATTGGGAATCAATGTAGGCTCACTAGT
241 ACATAAACAAATTTCTTTCCTTCTTTCCTTCTTTCCTTCATACACACACACACACATACT
301 AACTAGCTACTAGCTAGTATGTGATTTTGTGACCAACTTGAATAAAATAACGAAAGTCAT
361 TCATTAATTAAACTCCAATTACGGTTTGGTTTGATATGAGAAATTAAGGTGTATTAATTA
421 AGCATGCTAATTAATGTTTAGCTTCTGTAAAATGTCAATTAGACATGTTAATTATATGAG
481 AGATTTAACTCATTCACTAAAAAATTTCAAATCTTGAAAAGCAGCTGAATGATTACCCAT
541 TATCAGTGATATGGTGGCCAGACAAGTTCGCAGCTTCTGTAAGAGCCTTTCTCCACTGCT
601 TTACACTTTCTCGTTTAGCTTCACGTTTCGTGCCATCTTTTACTTTACTGATGCTCTTTT
661 TGTGCTTCTGAAATGCTTTGGCTAAAACTCCATCCTGCTTCCTGACATGTGAAGGATCAA
        <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
721 CATGATAGAATATTGGCAAAACATGTCGCCCCAGTTTGGATCTGCACTCCATGATCTTCA
781 CCAGCTCGTCAAGGCACCAACTTGAATCCGCATACCTCTTTGAGAAGACGATGATGGAGA
841 TCCTCGACCCTTCAATTTCCCGGAACAGTTCCTTTTTTATTTCTTCCCCTCTTTTTAGAT
```

```
901 CGTCCTCATCCATATAAGCCTGGTATCCCCTGTCTTTAAATGCCGCGTGCAGGTGGCCTG
961 TGAAGCCGTTGCGCGTGTCTTCACCTCTAAAACTCAAGAA
```

Arga-8

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	10	20	60.46	55.00
ATCGGGAAGACAACCCTAGC				
Jobboldali PRIMER	738	20	60.15	45.00
GCCAACAAAGCCACAGTTTT				

A PCR termék mérete: 729 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGGGAGGCATCGGGAAGACAACCCTAGCTAGATTAGTTTACGAGAGAATTTCTCATTAT
            >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 TTTGAAGGTAGCAGCTTTCTTGCTAATGTTAGAGAGGTGTGCTCTAAGGATGGTATAGTT
121 CATCTACAAAAGCAGCTTCTTTCTGAAATCTTAGGGGAAAATAACATACAAATTTGGAAT
181 GCTTATAGTGGAATCACTAGGATAAGTAGGTGTTTATGTAATAAAAAGGTTCTTCTCGTA
241 CTCGACGATGTGGATCAATTAGACCAACTGGAAAAGTTGGTCAAACAAAAAGAGTGGTTT
301 GGTTTTGGGAGTAGAGTCGTCGTTACAACTAGAGATGAACGTTTGTTAGTTGAACATGGT
361 ATAGAGATGGTATATGAGGTTAAGCCATTAACCCAAGATGAAGCTCTTTTTCTCTTTAGT
421 CGGAAAGCCTTTAAAGATGATGAGTTGGAAGAAGATTTTTTAGAACTGTCTAAATGTTTC
481 ATCAATTATGCAAGTGGTCTTCCATTAGCTCTTAAAACTTTAGAGTCTTTTTTGTACAAA
541 AGAGGTCGAGATGAATGGAAGAGTGCACTAGATAAACTGAAGCAAGCTCCTGATAGGAAA
601 ATTTTTGAAACATTGAAAATAAGTTATGATGGACTAGATGAGTTTGAGAAGAGAATCTTC
661 CTTGACATTGCATGTTTCCATAAGTCTTGTGAAAAGGAGCGAGTAATTGAAGGACTAGAA
                                                                <<
721 AACTGTGGCTTTGTTGGCACTCGCGTTGTGATTGAAGTTCTTATTGAGAAATCTCTCTTG
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<
781 TATATTTCATACGTGTGTATTTCATTCAATTCTCTGTCTATGCATGACTTGCTTCAACAT
841 ATGG
```

Arga-4

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	26	22	61.16	40.91
CTGCCAAAGCCATTTATAACCA				
Jobboldali PRIMER	816	22	59.93	40.91
TCGGATCAAATCATGCATAGTC				

A PCR termék mérete: 791 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGGGTGGAGTGGGGAAGACAACAGCTGCCAAAGCCATTTAtAACCAAATTCATCTTACG
                                >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 TTtGAATTCAAAAGTTTCCTTGATGACGTTAGCAATGTTACAAGTAAACATGGTCTGGTT
121 TATTTGCAAGAAAAACTTATTTCTGTCATCTTAAAaCAGAAGTCTGGATTAAGCAGTGTT
181 GATGAAGGTATCAGTTtGATAAAaCAACATCTCCAACGTAGAAGGGTACTTGTCATCATC
241 GACAATATAGATGACCTGAAACAACTGGATGCAATAGCTGTAAGTCACAATTGTTTTGGT
301 CCAGGAAGTAGAATTATTATAACGACACGAAATGAACATTTGCTAAAGCAAGTGGAAGTG
361 GACAAGACATATCCGCTTCGGGAAATGAAAAAGAGAGAAGCTTTGGAGCTCTTTAGTTGG
421 CATGCCTTTCGAAAAAGTTACCCTAATGAAGAATATCTTGAAGTCTCAGAAAAGGTTGTT
481 TCTTACTGTGGAGGTTTGCCACTAGCCCTTGAAGTTTTAGGTTCTTTTTTGTTTAAAAGA
541 CCTATTGCAGAGTGGAAAAGTCAATTGAAGAAATTGGTAAGAACTCCTAAAGGAGAAATA
601 ATAAAATCACTAAGAATAAGCTTTGAAGGGCTAGATGATACACAGAAGGCTATATTCCTT
661 GACATATCTTGTTTCTTTATTGGAAATGACAAAGACTACGTCGCAAAAGTATTAGATGGA
```

```
721 TGTGGATTTTTTGCAACAGAAGGAATCAGTGTCCTCCGTGAACGATGTCTTGTAACTGTT
781 GAAGGCAACAAGTTGACTATGCATGATTTGATCCGACAAATGGAATCACGAATTCTGGAT
                    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
841 CCGATACGAACGCGTCTGCAGCTGCGGGACCG
```

Arga-9

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	15	20	60.84	55.00
GAAGACAACAGCTGCCAACC				
Jobboldali PRIMER	759	21	60.10	47.62
TTCACGAAGGTCACTGATTCC				

A PCR termék mérete: 745 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGGGTGGAGTCGGGAAGACAACAGCTGCCAACCCCATTTATAACAAAATTCATCATGAG
                    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 TTCCAATTCAAAAGTTTCCTTGACAACGTTAGTGAAAAAGATCTGGTTGTTTCGCAAAAA
121 AAACTTGTTTCTGACATCTTGAAACAGACCAAGCCTGAGATAACCAGTGTTGATGAAGGT
181 ATCAGTCCGATAAAAAATCATCTCCAACGTAGAAGTGTACTTGTCATTATTGACAATGTA
241 GACAGAGTGGAACAACTAAATGCAATAGCTGGAAATCGTGATTGGTTTGGCCCAGGAAGT
301 AGAATTATCATAACGACACAAGATGAACGTTTACTAAAGCAAGTGAACATGAAAGTGGAC
361 AAGACATATCCACTTAAGGAAATGAATGACGAAGAAGCTCTGAAGCTCTTTAGTTGGCAT
421 CCCTTTGGAAATAGTTGGCCTAATGAAGGATATCTTGAACTCTCAAAGGAGGTTGTTTCT
481 TACTGTGGTGGTTTGCCACTAGCCCTTGAAGTTTTAGGTGGTTCTATGATTGAAAGAACC
541 CCAACGGAGTGGAAAAATCAGTTGGAGAAATTGAAAAAATTTCCTGAGGAAGGAATAATG
601 AAACCGCTAAGAGTAAGCTTTGAAAGGCTAGATCCTACACAGAAGGATATATTCCTTGAC
661 ATATCTTGTTTCTTTATTGGATGGGATAAGGACCGTGTCGCAAAAATATTAGATGGATGT
721 GAGTTTTTTGCAACAGTAGGAATCAGTGACCTTCGTGAACGATGCCTTGTAACTGTTGAA
                        <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
781 CATAACAGGTTGAATATGCACGACTTGCTACAACAAGGGG
```

Arga-10

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	1	22	61.12	45.45
ATGGCCAACATAGATGAAGTGG				
Jobboldali PRIMER	600	22	60.35	40.91
CAGAATTCGTGATTCCCTTTGT				

A PCR termék mérete: 600 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGGCCAACATAGATGAAGTGGCCCANCTGAATGCAATAGCTGGAAATCATGATTGGTTT
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 GGTCTAGAAAGTAGAATTATCATAACGACACGAGATGAACAATTNCTNCACCAAGTTGGA
121 GTGGACAAGATACATCGGCTTCATGAAATGAATGAAGAAGAAGCCATGGAGCTCTTTAGT
181 TGGCATGCCTTCAGAAATAGTCGGCCTAATGAAGGATATCTTAAACTCTCAAGAAAGATC
241 GTTTCTTACTGTCGAGGTTTGCCACTAGCACTTGAAGTTTTAGGCTCTTTTTTGATTAAA
301 AGAACCATAGCTGAGTGGGAAAGTCAATTGGAAAAATTGAAAAGAGCTCCTGAAGGAAAA
361 ATAATAACACCACTAAGAATAAGTTTTGAAGGGCTAGATGATACACAGAAGGTTATATTC
421 CTTGACATATCTTGTTTCTTTATTGGATGGGATAAGGACTATGTCACAAAAGTTTTAGAT
481 GGATGTGAATTGTCTGCAACAATAGGAATCAGTGTCCTTCGTCAACGATGCCTTGTAACT
541 TTTGAACGCAACGAGTTGAATATGCACGATTTATTCCGACAAAGGGAATCACGAATTCTG
                                                <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
601 GATCCGATACGNACGCNTCTGCAGCNTGCGGGACCG
```

Arga-25

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	19	22	59.84	40.91
GCAAACCCCATTTTCAATAGAG				
Jobboldali PRIMER	811	22	60.15	40.91
TCATTTCTTGGAACAAGTCGTG				

A PCR termék mérete: 793 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGGGTAAGACAACGGTTGCAAACCCCATTTTCAATAGAGTTCATCAAAGCTTTGAAGGT
                          >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 AAAAGTTTCCTTTCAAAAGTGAGGGAAGAGAGTATGGTTAAACTGCAAAACCAACTTCTT
121 TGTGATATCTTGAAACCGGCCAACATAGAGGTAAGCAGTGTGGATCAAGGAACCAAGGAG
181 ATACAAAAAAGACTTGGCAGCATAAGGGTACTTGTCATATTTGATGACATAGGTTGTGTG
241 GAACAACTAGAAGAGTTAGCTATAAAACACGAGTCGTTTGGTCGAGGGAGTAGAATTATA
301 ATAACCACAAGAGATGAACATTTGCTAAAGATGCTTGGAGTGGATACGATATATGAACTG
361 CCAGTAATGAATAGAGAAGAAGCTCTTATGCTACTTAGTTGGCATGCCTTTAGAAAGAAC
421 TATCCTGAGAAAGAGTATTTTGAACTCACAAGAGAAACTGCTGACTACTGTGGAGGTTTG
481 CCACTAGCACTTGAAGTTGTAGGTTCTTATCTATCTGGGAAAAGCATAAGTGCTTGGAAA
541 GGTGCATTGGAGAAATTGGAAAGTCATACTCATGAGAAGATTCATGAAAGACTTAAAATC
601 AGCTTTGATGAGCTAGCTGATGATGACCTGAAGGCTATATTCCTTGATATATCTTGTTTC
661 TTTACTGGAATGAACAAGGATTATGTCATGAAAATATTGGATGGCTGTGACTTATATCCA
721 GAAATCGGAATAAGTGTCCTCCAAGAGCAGTGCCTTGTAACTACTAATGATGATTTCACA
781 CTGGTGATGCACGACTTGTTCCAAGAAATGAATCACGAATTCTGGATCCGATACNNAACG
                <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
841 CGTCTGCAGCCATGCGGGACCGTC
```

Arga-26

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	13	21	62.18	42.86
AAAAGTTTCCTTGCCGACGTT				
Jobboldali PRIMER	732	22	57.10	40.91
GTTGCCTTCAACAGTTACAAGA				

A PCR termék mérete: 720 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGTTTGAATTCAAAAGTTTCCTTGCCGACGTTCGCGACACTTCAAGTAAACATGGTCTG
                  >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 GTTTATTTGCAAGAAACACTTATTTCTGACATCTTGAAACAGAAGTCTCAAATAAAAAGT
121 GTTGACTTAGGTATCAGTATGATACAACAAGTAGTTCAACATAGAAGGGTACTTATCATC
181 ATTGACGATATCGATGACCGGAAACAATTGGATGCAATAGCCCGAAGTCACGATTGGTTT
241 GGTCCAGGAAGTAGAATTATCATGACGACACGAAATAAACATTTACTAAAGCAAGTGGAA
301 GTGGACAAGACATATCCGCTTCGGGAAATGAATAAGGAAGAAGCTCTGGAGCTCTTTAGT
361 TGGCATGCCTTTAAAAAAAGTTGCCCTGATGAAGAATATCTTGAAGTCTCAAAAAATGTT
421 GTTTCTTATTGTGGAGGTTTGCCACTAGCCCTCGAAGTTTTAGGTTCTCTTTTGTTTAAA
481 AGACCCATTAAAGAGTGGAAAAGTCAATTGGAGAAATTGGAAAGAATTCCTGAAGGAGAA
541 ATAATAAAACCACTAAGAATAAGCTTTGAAGGGCTAAATGATACAGAGAAGGCTACATTC
601 CTTGACATATCTTGTTTCTTTATTGGAAAGGACAAGGACTATGTTGCCAAAATATTAGAT
661 GGATGTGGATTTTATGCAATAGTAGGAATCAGTGTCCTTTGCGAACGATGTCTTGTAACT
                                                        <<<<<<<<<<
721 GTTGAAGGCAACAATTTGAATATGCACGACTTATTCCAACATATG
    <<<<<<<<<<<<
```

Arga-27

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	77	22	60.21	40.91
TCCTTTCAAAAGTGAGGGAAGA				
Jobboldali PRIMER	784	22	59.44	45.45
CATGGAGTTCTCCGATTCCTAT				

A PCR termék mérete: 708 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 TTGGTGGCGTGGGAAAGACAACGGTTGCAAACCGCCATTTTCAATAGAGTTCATCAAAGC
 61 TTTGAAGGTAAAAGTTTCCTTTCAAAAGTGAGGGAAGAGAGTATGGTTAAACTGCAAAAC
                    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 CAACTTCTTTGTGATATCTTGAAACCAGCCAACATAGAGGTAAGCAATGTGGATCAAGGA
181 ACCAAGGAGATACAAAAAAGACTTGGCAGCATAAGGGTACTTGTCATAGTTGATGACATA
241 GATTGTGTGGAACAACTAGAAGAGTTAGCTATAAAACACGAGTCGTTTGGTCGAGGGAGT
301 AGAATTATTGTAACAACAAGAGATGAACAATTGTTAAAGTTTATCAGAGTCGATAAGACA
361 TGTTTGGCACAAACAATGAATGAAGAAGAAGCTCTTCAGCTCCTTAGTTGGCGTGCCTTT
421 CGAAAGAGCTATCCTAATGATGAAGAATTTCTTGAACTCGCAAGAAAAGTTGTTGATTAC
481 TGTGGAGGTTTGCCACTGGCGCTTGAAGTTTTAGGTTCTTATCTAAGTTCAAAAGGCAAA
541 AGAGAATGGAGAAGTGCACTGCGCAAATTGAAAAGAAAGCCTCACGGGAAGATTTATGAA
601 AAGCTTAAAATGAGCTACGATGGGCTAATTGATGATGACGTGAAGGCTATATTCCTTGAC
661 ATATGTTGTTTCTTTATTGGAATGAACAAGGACTATGTTATGACAATATTAGATGGCTGT
721 GACTTTGATCCAGATATAGGAATCGGAGAACTCCATGATCGGTGCCTTGTAACTGTTGAT
                    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
781 GAAGGAAACACCTTATAATGCACGATTTGTTCCGAGATATGGA
```

Arga-28

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	29	22	60.25	50.00
TTAGAGGGGTGTGCTCTAAGGA				
Jobboldali PRIMER	773	22	60.33	50.00
TGTCGGAGTAAGTCGTGCATAG				

A PCR termék mérete: 745 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 TTTGAAGGTAGCAGCTTTCCTGCTAATGTTAGAGGGGTGTGCTCTAAGGATGGCATAGCT
                                >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 CATCTACAAAAGCAGCTTCTTTCTGAAATCTTATGGGAAaATAACATACAAATTTGGAAT
121 GCTGATAGTGGAATCACTAGGATAAGTAGGTGTTTACGTAATAAAAAGGTTCTTCTCATA
181 CTCGACGATGTGGATCAATCAGACCAACTGGAAAAGTTGGTCAAACAAAAAGAGTCGTTT
241 GGTTCCGGGAGTAGAATCGTCATTACAACTAGAGATGAACGTTTGTTAGTTAAACATGAT
301 ATAGAGATGGTCTATGAGGTTAAGCCATTAACCCAAGATGAAGCTCTTTTTCTCTTTTGT
361 CGGAATGCCTTTAAAGATGATGAGTTGGAAGAAGATTTTTTAGAACTGTCCAGATGTTTC
421 ATCAGTTATGCAAGTGGTCTTCCATTAGCTCTTGAAACTTTAGGGTCTTTTTTGTACAAA
481 AGAGGTCGAGATGAATGGAAGAGTGCACTAGATAAACTGAAGCAAGCTCCTAATACGAAA
541 ATTTTTGACACATTGAAAATAAGTTATGATGGACTAGATGAGTTTGATAAGAGAATCTTC
601 CTTGACATTGCATGTTTCCATAACTTTCGTGAAAAGGAGCAAGTAATTGAAAGACTAGAA
661 AACTGTGGCTTTGTTGGCGCTCGCATTGTGATCGAAGTTCTTATTGAGAAATCTCTCTTG
721 TATAAATCATACAAGTATGTGTCTATGCACGACTTACTCCGACATATGG
                                <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

Arga-29

	start	hossz	TM	GC%
Baloldali PRIMER	70	22	60.24	40.91
AAGGTGGCCAATGTTGATAAAG				
Jobboldali PRIMER	715	22	60.02	40.91
CAAGTCGTGCATCCGTATAAAA				

A PCR termék mérete: 646 bp.

A primerek tapadási helyei:

```
  1 ATGACGGATAAAGGATTGGCCAAATTACAAAAGACACTTCTTTATGAGATTCTAGGGGGA
 61 GAAAAGTTGAAGGTGGCCAATGTTGATAAAGGAATCACTTTAATTAAGGAAAGATTAAGC
            >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 AGTAAAAGGATTCTCTTAGTTCTTGATGATGTGAACGACATGAAACAGTTACGCTGCTTA
181 GCTGGGGGATCAGATGGTTGGTTTGGCGcGGGTAGaTAccATTATCATAACTACGAGGGA
241 TnAGAAACTGTTAACTGCTCATCATCATAATATTTTGATATACGAGGTGGAGAAATTGAA
301 CGATCATGAATCTCTCGAGCTCTTCAGTTGGAATGCCTTCAAAAGCAAAGGACCTTTGGA
361 TGGTTATGCGGAACTTGCAGACCAGGCAATACGGTGGGCTCAAGGCCTTCCAATAATTTT
421 GAGAGTTTTAGGTTCACATCTGTACGGTGAAAGTATAGATAAGTGGCAAGCTATATTAAA
481 TGGTACGATCAAAAGCCGAGAAATTCATGACGTTTTCAAGATAAGTTATGATGCATTGGA
541 TGAAATGGTGAAGGAAGTTTTTCTCGACATTGCGTGCTTCTTTAACGGGGGAGGAAGTGA
601 CTATGTGATCGAAATATTAGAAGGTTGTGAGCTAAACCCCAAGTATAGCATTGACGTACT
661 CATACAGAAGGCCCTCGTAAATATAGATTGTGGTTTTATACGGATGCACGACTTGCTCCA
                                        <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
721 ACAAATGG
```

3. Melléklet: Rügymutánsok csoportonkénti gyümölcs bemutatása (Képeket készítette: Dr. Szabó Tibor)

Elstar fajtacsoport:

Elstar és Red Elstar

Jonathan fajtakör:

Jonathan, Jonathan M41, Jonathan Csány1, Red Jonathan, Szatmárcsekei Jonathan, valamint Watson Jonathan

Golden fajtakör:

Golden Delicious, Goldenir (Lysgolden), Golden Reinders, Goldstar, Gibson Golden Delicious

Starking Delicious fajtakör:

Starking Delicious, Starkrimson Delicious, Redchief Delicious, Redspur Delicious, Topred Delicious, Wellspur Delicious

Idared fajtacsoport:

Idared és Red Idared

Gala fajtacsoport:

Gala, Galaxy, Imperial Gala, Regal Prince (Gala Must), Royal Gala

4. Melléklet: 101 Malus eredetű RGA összehasonlító analízise a különböző rezisztencia motívumok összehasonlításával

```
                             P-loop                                                              RNSB-A-TIR
                        ----------------                                                        --------------

                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
FJ477238    ~~~~~~~~~~~~~~~MGKTTVAN~~~~~~~PIFNR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VHQSFEGKSFLSKVRE~~~~ESMVK~~~~LQNQLLCDILKPA~~NI
FJ477237    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
FJ477236    ~~~~~~~~~~~~MGGIGKTTLAR~~~~~~~LVYER~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ISHYFEGSSFLANVREVCSKDG~~~~IVHLQKQLLSEILGENNIQI
FJ477235    ~~~~~~~~~~~~MGGVGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHLTFEFKSFLDDVSNVTSKHGLVY~~~~LQEKLISVILKQ~~~KS
FJ477234    ~~~~~~~~~~~~MGGVGKTTAAN~~~~~~~PIYNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHEFQFKSFLDNVS~~~~EKDLVV~~~~SQKKLVSDILKQT~~KP
FJ477233    ~~~~~~~MTDKGLAKLQKTLLYEILGGEKLKVANVDKG~~~~~~~~~~~~~ITLIKERLSSKRILLVLDDVNDMKQLRCLAGGSDGWFGAGRYHYHNYEG
FJ477232    ~~~~~~~~~~~~LVAWERQRLQT~~~~~~~AIFNR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VHQSFEGKSFLSKVRE~~~~ESMVK~~~~LQNQLLCDILKPA~~NI
FJ477231    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~MFEFKSFLADVRDTSSKHGLVY~~~~LQETLISDILKQ~~~KS
FJ477230    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FEGSSFPANVRGVCSKDG~~~~IAHLQKQLLSEILWENNIQI
AF516631    ~~~~~~~~~~~~~~~~VWVVLEK~~~~~~~QLWPN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~*FIMMARLKLILIKECGFVSQTLF~~~~IRLRLPNP*SMVVPQFQ
AF516650    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTLAR~~~~~~~AVFSK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YHHSFNGQCYLEEV~SKK~~KNMVG~~~~LQEQLLRDILKRP~~DI
AF516649    ~~~~~~~~~~~~~VVLVRQRLLK~~~~~~~PFITD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FMKGLKVKVSLKK*~~~~GKRN*KN~~~~CKNNFFSISCKPRQ~R*
AF516648    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTVAK~~~~~~~AIFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~HHHSFDGASFLPNVRED~~~KKLVH~~~~SQNKLLSDILRSG~~NK
AF516647    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAR~~~~~~~AVYDE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IASRFEACCFLENVKEGFMKHGQ~~~~LHMQTQLLSSISNNKVGSS
AF516646    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTLVK~~~~~~~EVGKRAK~~~~~~~~~~~~~~~~ALNLFDEVAMAVFAQTP~DLSHIQQE~~~~IADFLGLK~~~~~LTG~
AF516645    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTLAK~~~~~~~AIYNR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FSDRFQGKSFLEKVRE~~~~KKLEK~~~~LQKQLIYDILQTT~~KT
AF516644    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTIAR~~~~~~~AVYNE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACQLEACCFLENVKEGFMKHGE~~~~LHMQTQPLSSISGNKVESF
AF516643    ~~~~~~~~~~~~WVVWVRQLLPM~~~~~~~PFITK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FIIASSLNVTLAMLATLNIDMVWFI~~~~CKNNLFLTCLNKPYSR*
AF516642    ~~~~~~~~~~~GXGGVGKTTLAN~~~~~~~LVYKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ISHDFEGCSFLANVREVCSKDG~~~~IAHLQKQLLSEILGENNMQI
AF516641    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHEFQFKSFLDNVS~~~~EKDLVV~~~~SQKKLVSDILKQT~~KP
AF516640    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAR~~~~~~~AVYNE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ISRRFEACCFLENVKEDFMKHGK~~~~LHMQTVLISSVSNNKVGSS
AF516639    ~~~~~~~~~~~GMGGMGKTTIAR~~~~~~~TVYDE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ISCRFEAGCFLKNVKEGFMKQGE~~~~LHMQTLLLSSISDNKVGIS
AF516638    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKITIAR~~~~~~~AVYDE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACQFEACCFLENVKEGFMKHGK~~~~LHMQKKLLSSISGNKVGSS
AF516637    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAK~~~~~~~AVYNE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FYDKFERKSFLEKVRE~~~~KKVEK~~~~LQKQLLSDILQTT~~KT
AF516636    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAR~~~~~~~AVYDE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACQFEACCFLENVKEGFMNHGE~~~~LHMQTQLLSSISGNKVGSS
AF516635    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTIAK~~~~~~~AVYNE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FYDKFERKSFLEKVRE~~~~KKVEK~~~~LQKQLLSDISQTT~~KT
AF516634    ~~~~~~~~~~~~WVESERLQLPK~~~~~~~GFITK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FIVSLSSKVSLPTLATLQVNTVWFI~~~~YKTNLFLTS*KRSLK*~
AF516633    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHREFKFKSFLADVSVNTSKHGLNY~~~~LQNKLIANILKK~~~KF
AF516632    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAK~~~~~~~AVYNE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FYDKFERKSFLEKVRE~~~~KKVEK~~~~LQKQLLSDILQTT~~KT
AF516630    ~~~~~~~~~~GMG~GIGKTTMAK~~~~~~~FVYKS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NFEIFERHSFLENIRETAEKPNG~~~LIQIQKQLLHDITNGRKIKI
AF516629    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTVAK~~~~~~~AIFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YQDTFEGKSFLQNVRE~~~~RKLVQ~~~~VQEQLLFDILKPS~~NI
AF516628    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTIAR~~~~~~~AVYEE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACQFEACCFLDNVKEEFSTCGA~~~~VHMQEKFLSRILNEKVQSL
AF516627    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTVAK~~~~~~~AIFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YQDKFAGKSFLASVRE~~~~VRLVD~~~~SQNTLLHDVLRSR~~NI
AF516626    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTAAN~~~~~~~SIYNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHRFQFKCYLGDVSNTERRYGLVD~~~~LQKQLVSSILKQTT~IC
AF516625    ~~~~~~~~~~~GMGGMG*NHHCQ~~~~~~~SCL*G~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NRLSI*SLLLS*KCQGRFLQAWC~~~~NTYAGRAFIQNIEGKGA
AF516624    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTLLT~~~~~~~KINNNFL~~~~~~~~~~~~~~~~HTPNDFDLVIWIEVSKDLKLENIQDS~~~~IGEKIXSC~~~~~DGSW
AF516623    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAR~~~~~~~AVYEK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACQFEACCFLDNVKEEFA~CGA~~~~VHMQEKFLSRILNEKVQSL
AF516622    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTVAK~~~~~~~AVFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~HHHSFAGASFLQNVRE~~~~KKLVD~~~~LQEQLLSDILKPA~~YI
AF516621    ~~~~~~~~~~GMG~GVGKTTIAK~~~~~~~FVYDL~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NFRRFQRSSFVENIREISEQSNG~~~LIQIRKQLLHDISTGRKVKI
AF516620    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LQNVRE~~~~RKLVQ~~~~VQEQLLFDILKPS~~NI
AF516619    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTIAR~~~~~~~AVYDE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACRFEACCFLENVKVGFMKHGE~~~~QHMQTELLSSISGNKVESF
AF516618    ~~~~~~~~~~~~~~~~~KTTLR*~~~~~~~NCL**~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NLLSI*SWLLS*KCQGGFHEAG*~~~~TTYADTTSI*YLRQQGG
AF516617    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NFKEGFMKHGK~~~~LHMQAELLSSISNNRVGSS
AF516616    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTIAR~~~~~~~AMYDK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~INHHFEGRCFLENVKGRFPTIDAGEAPLDMQAEILSSITNAKVGSS
AF516615    ~~~~~~~~~~~GMGGVGKTTLAQ~~~~~~~LVYND~A~~~~~~~~~~~~~~~~NVKAHFQKRIWVRVSEPFDETKIAKE~~~~ISGDATS~~~~~~~SST
AF516614    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YNE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FYDKFERKSS*KSEGEESRKIAKTT~~~~~TFRYLANDQDKGKECC
AF516613    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTLAR~~~~~~~AIYST~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YHHSFRGQRYLGEVRSKK~~KNMVS~~~~LQEQLLRDILKRP~~DI
AF516612    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~DTCCFLGNVKEGFMKHGE~~~~PHMQKKLLSGISGKKVGTS
AF516611    ~~~~~~~~~~~~~~~VGKTTLAK~~~~~~~AFYNR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FSDRFQGKSFLEKVRE~~~~KKLEK~~~~LQKQLLSDILPTT~~KT
AF516610    ~~~~~~~~~~~~~~GMGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHLFKFKSFLSDVSNTTSKHGLIY~~~~LQKTLVSDILKE~~~KY
AF516609    ~~~~~~~~~~~GMGGIGKTTIAR~~~~~~~AVYDE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACRFEASCFLENVKEGFMKHGK~~~~LPMQTQLLSSISDNKVGSS
DQ923745    ~~~~~~~~~~GIEFGVGKTTLAK~~~~~~~LAYDK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IFHHFEVHCFLGNIREVSKINRT~~~LIGL*KRLLFPMLKAKIEEI
DQ923739    ~~~~~~~~~~~~IGGVGKTTLAR~~~~~~~ANCSE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YHLCFSGLCYLEEVKSKK~~KNMVV~~~~LQ*QLLQDILKWP~~DI
DQ923737    ~~~~~~~~~~~RLVVWGKQQLPK~~~~~~~PFITK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FILCSNSKVSLPTLAAIQVNMV*FI~~~~CKKKLISDIWKN~~~ES
DQ923732    ~~~~~~~~~~~A*WGEGENDHC*~~~~~~~ASL**~~~~~~~~~~~~~~~~~~~HFFSFRSLAVFFLILERFINVVI*~~~LIYKDRFFFRS*GNKLPKY
DQ923744    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHNFQFKSFLADVSDTTSKHGLVY~~~~LQEKLISDILKQ~~~KS
DQ923743    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAE~~~~~~~AVFHR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LSCKFEASCFLRNVREREQKDG~~~~LVQLRNTIVKEVFKEKDLNI
DQ923742    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAE~~~~~~~AVFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LSSKFEACCFLRNVREREQKDG~~~~LEHLQNTLLSQILKEK~~~~
DQ923741    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAE~~~~~~~AVFHR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LSCKFEASCFLRNVREREQKDG~~~~LVQLRNTIVKEVFKEKDLNI
DQ923740    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTLAD~~~~~~~AVYHR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LSSKFEASCFLANVREESEKHG~~~~LNYLRNVLIREILKEKDLDI
DQ923738    ~~~~~~~~~~~~~GGGGKTTIAH~~~~~~~VVSER~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IRAQFEAYSFLANVREVSEKQG~~~~LVHLQKKLLSDILLESNVSM
DQ923736    ~~~~~~~~~~~RLGV*GRQRLQK~~~~~~~PFSAD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FIKCLKVVVSFQK*~~~~GKRIWLN~~~~CKSSFLVIS*N*LM*R*
DQ923735    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTTAE~~~~~~~VVFDR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IRSQFEAYSFLANVREVTQKQG~~~~LVHLQKQLLSDILFESNVDV
DQ923734    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLLT~~~~~~~QINNKLL~~~~~~~~~~~~~~~~HA~~DFDLVIWIVVSKDHNVETVQDK~~~~IGDKIGFS~~~~~SNSW
DQ923733    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHMFQFKSFLHDVSNTANKHDLVY~~~~LQKKIISDILKK~~~EF
DQ923731    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAK~~~~~~~LVYDR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IFHHFEAPCFLENVREASRADPT~~~LIRLQETLLSPTLKEK~~~I
AY378697    ~~~~~~~~~~GIEFGVGKTTLAK~~~~~~~LAYDK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IFHHFEVHCFLGNIREVSKINRT~~~LIGL*KRLLFPMLKAKIEEI
AY378696    ~~~~~~~~~~~~IGGVGKTTLAR~~~~~~~ANCSE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YHLCFSGLCYLEEVKSKK~~KNMVV~~~~LQ*QLLQDILKWP~~DI
AY378695    ~~~~~~~~~~~RLVVWGKQQLPK~~~~~~~PFITK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FILCSNSKVSLPTLAAIQVNMV*FI~~~~CKKKLISDIWKN~~~ES
AY369235    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLVH~~~~~~~KVLKR~E~~~~~~~~~~~~~~~~RVKGKFNPIIWLPFSGMREEEEQFSR~~FSFETCILDHLGKTL~~DG
AY369234    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLVK~~~~~~~KVYDD~D~~~~~~~~~~~~~~~~EVKKHFKPRAWITVSQSFRVEDLLKD~~~~IIHKLFDAIRRPVPEGV
AY369233    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAK~~~~~~~KVYDQ~P~~~~~~~~~~~~~~~~KVMAHFDCYAWITASQSYRVEDLLRT~~~~VIKKFYSSRKERFPEEI
AY369232    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAQ~~~~~~~LLYNN~D~~~~~~~~~~~~~~~~SVKEHFDVRAWACVSEDFDAFRVTKT~~~~LFQSIAS~~~~~~~KPC
```

```
AY369231    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAQ~~~~~~~VLYND~E~~~~~~~~~~~~~~~~QVKEHFDMNAWVCVSEQYDALRVIKT~~~~LIEQITE~~~~~~~KSC
AY369230    ~~~~~~~~~~~~~~GVGKTTLAQ~~~~~~~LLYND~E~~~~~~~~~~~~~~~~QVTEHFDTNAWVCVSEQYEGLRVIKT~~~~LIEEITK~~~~~~~KPC
AY369229    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAQ~~~~~~~LLYND~G~~~~~~~~~~~~~~~~QVKEHFDTNAWVCVSEQYEALRVIQT~~~~LIEEITK~~~~~~~KPC
AY369228    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAQ~~~~~~~LVFNNKN~~~~~~~~~~~~~~~~DAMKEFELKVWVSVSDDFDVVRVTKA~~~~ILESIKP~~~~~~~LPV
AY369227    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAQ~~~~~~~LVYND~A~~~~~~~~~~~~~~~~NVKAHFQKRIWVCVSEPFDETKIAKE~~~~ISGDATS~~~~~~~SST
AY369226    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAQ~~~~~~~LVYND~D~~~~~~~~~~~~~~~~KVKAYFEKRVWVCVSDPFDEIKIAKA~~~~ICGDNAP~~~~~~~NSN
AY369225    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTLAR~~~~~~~AVCSN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YQQSFSRQCYLEEVRSKK~~KKMVS~~~~LQEQLLRDILKQP~~DI
AY369224    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTVAK~~~~~~~AIFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~HHRNFDGASFLENVRE~~~~KKLVD~~~~LQEQFLSDILKPA~~YI
AY369223    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTVAKDIFNKYPAIFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YPDKFAGKSFLANVRE~~~~EKLVD~~~~VQNILLYDVLRSR~~NI
AY369222    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTVAK~~~~~~~AIFNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YQDTFEGKSFLQNVRE~~~~RKLVQ~~~~VQEQLLFDILKPF~~NI
AY369221    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTAAN~~~~~~~AIYNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHCFQFKCHLGDVSDTEHRYGLVY~~~~LQKQLVSNMLKQTA~IF

                              P-loop                                                           RNSB-A-TIR
                       ---------------                                                      -------------

AY369220    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTAAK~~~~~~~AIYNK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHNFQFKCFLADVSDTVSKYGLIY~~~~LQEQLVSNILKQTT~KF
AY369219    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHHKFQFKSFLHDISNTASKHGLVH~~~~LQEKLISDILKT~~~KS
AY369218    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTLAK~~~~~~~EVYREAL~~~~~~~~~~~~~~~~EEKLFDDVVIILNVKEKKDNEKFQKE~~~~IAKKLRMD~~~~~VDES
AY369217    ~~~~~~~~~~~~~~~GGKRQLPK~~~~~~~PFITK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FILTLNSRVSLMTLTTLQVDMVWFI~~~~YKKNLFRTS*IQCLK*~
AY369216    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTAAK~~~~~~~AIYNQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IHPMFQFKSFLADVRDATSKHGLVD~~~~LQNKLISDILKK~~~KP
AY369215    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTIAR~~~~~~~AVHEK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IACQFEACCFLDNVKEEFA~YGA~~~~VHMQEKFLSRILNEKVQSL
AY369214    ~~~~~~~~~~~~~GGVGKTTLAR~~~~~~~LVYER~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ISHDFEGSSFLANVRGVCSKDG~~~~IAHLQKQLLSEILWENNIQI
AY369213    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAK~~~~~~~LVYDK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IFHHFEVHCFLGNVREVSKINRT~~~LIGLQKRLLFPMLKEKIEEI
AY369212    ~~~~~~~~~~~~~GGRGKTTLAK~~~~~~~LVYDR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IFHHFEVHCFLENVREVSNVD~~~~~~~~LQKRLLRPMLKEKIEEI
AY369211    ~~~~~~~~~~~~~GGGGKTTLAK~~~~~~~LVYDR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IFHHFEVPCFLENVREASRADPT~~~LIRLQETLLSPMLKEK~~~I
AY369210    ~~~~~~~~~~GIEFGVGKTTIAK~~~~~~~HVYNS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NFIGFERSSFIENINERADRPNG~~~LVQIQMQLLSDILIGCEVKI
AY369209    ~~~~~~~~~~~~~~GVGKTTIAK~~~~~~~HVYNS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~NFRSFKGSSFIENIRETADRPNG~~~LVQIQKQLLFDILNGREVKI

                                                          Kináz-2
                                                    ------------------                             -----

               110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
FJ477238    EVSSVDQGTKEIQKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IRVLVIFDDIGCVEQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIKHESFGRGS
FJ477237    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~MANIDEVAXLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNHDWFGLES
FJ477236    WNAYSGITRIS~~RCLCN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDVDQLDQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KLVKQKEWFGFGS
FJ477235    GLSSVDEGISLIKQHLQR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLVIIDNIDDLKQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAVSHNCFGPGS
FJ477234    EITSVDEGISPIKNHLQR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RSVLVIIDNVDRVEQLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNRDWFGPGS
FJ477233    XETVNCSSS*YFDIRGGEIERS*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ISRALQLECLQKQRTFGWLCGTC~~~~~~~~~~~~~~~~~~RPGNTVGSRPSNN
FJ477232    EVSNVDQGTKEIQKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~IRVLVIVDDIDCVEQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIKHESFGRGS
FJ477231    QIKSVDLGISMIQQVVQH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLIIIDDIDDRKQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIARSHDWFGPGS
FJ477230    WNADSGITRIS~~RCLRN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLILDDVDQSDQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KLVKQKESFGSGS
AF516631    MSWTVSCSAC*NLSRARG~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FSLF*MMCGATTVKSGSA*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~GQH*SKVVLMAV
AF516650    KVSSVAEGTKEIGKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VKVLIVVDDIDDADQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIEHESFGPGS
AF516649    AVLLQAPPW*GKDFDA*R~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YLS*LMMQTM*SSYAN*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LEIATFLAR
AF516648    EVCTVDEGTKEIKRRLAN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KRVLVIVDNVDSDAQLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKHDSFGPGS
AF516647    DILDKGFQVML~~NGLGQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLIVIDDVDNLEQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGEQHSSFGGGS
AF516646    ~~QSLAGRANKLKERLSGNKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VLVILDNVWTQIDLEEVGIP~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~SCC
AF516645    KVSNVAAGTALVRERFRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LKVLVIVDDVDDVKKLC~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAGNCHSFGPGS
AF516644    DILKNGFQVML~~KSLGH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVVDDVDKLAQIEP~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGKEHS~FGGGS
AF516643    IVSVKGSV*SNDVFNIEK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YLLLLIM*IKWSN*VH*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LEIVSGLVL
AF516642    WNTYRGITMIS~~RCLCN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLILDDVDQLDQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KLVKQKEWFGFGS
AF516641    EITSVDEGISPIKNHLQR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RSVLVIVDNVDRVERLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNRDWFGPGS
AF516640    DISKNGFQVML~~NSLGQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLIVLDDVDTLEQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGGQHS~FGGGS
AF516639    DILSKGFQVML~~KSLGQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLIVVDDVDKLEQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGEQHS~FGGGS
AF516638    DILKNGFQVML~~KSLGH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLVVVDDVDKLAQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGNEH~~FGGGS
AF516637    KVSSVAAGTALVGERFRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LKVLVIVDDVDDVKQLR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELVGNCHSFGPGS
AF516636    DILKNGFQVML~~KTLGH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKLLLVVDDVDKLAQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGKEHS~FGGGS
AF516635    RVSSVAAGTTLVGERFRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LKVLVIFDDVDDVKQLR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELVGNCHSFGLGS
AF516634    DVLTKVPI**NNSFDIEG~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YLSSWTT*MKRYNCVQ*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LEVTIGLVQ
AF516633    EISCVDEGISLIKQQFRH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLVVMDNIDEAEQLH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAGSCDWFGPGS
AF516632    RVSSVAAGTTLVGERFRC~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LRVLVILDDVDDVKQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELVVNRHSFGLGS
AF516630    YSTSQGMSAIE~~DVISS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KRVLLVLDDVDDMDQLLG~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~EVIGMQDRLYPGS
AF516629    KVSSVDQGILEIVLRLHD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~QRILAIVDDIDCMEQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKHDSFGAGS
AF516628    GTLDRGYRMIL~~KRLQL~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLIVLDDVDDLFQIET~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGKQHS~FGGGS
AF516627    NVSKVDEGTEDIKRRLGN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LRVLVIVDDVDSVKQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKRDSFGPGS
AF516626    QINNVQRGISVVKGCLRP~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLLVIDNVDKVEQLS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGDREWFGPGS
AF516625    KFRNFG*RFQDDKERTS*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~EKGFPCS**RGQYRPN*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RLTGKATFIWLRQ
AF516624    KDKDHLRKAEDIFAALKSKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FVLLLDDIWERVDVAKIGVPI~~~~~~~~~~~~~~~~~~PD~~~~~~RENKS
AF516623    GTLDRGYRMIL~~KRLQM~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLIVLDDVDDLFQIET~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGKQHS~FGGGS
AF516622    VVSSMDEGTKEIEQRLGN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LRVLVVIDDLGSVAQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKPDSFGLGS
AF516621    HSIREGMTRIE~~DAISH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLALDDVDHKDQLLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VVFGMRDWFYPGS
AF516620    MVSSVDQGILEIVLRLHD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLAIVDDIDCMEQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKRDSFGAGS
AF516619    DILKNGFQVML~~KSLGH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVVDDVDKLAQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGKEHS~FGGGS
AF516618    DF*HIE*RFPGDVKKPWS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~EKSSYCC**CGQIRTN*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~SFTWRATFLWWWK
AF516617    DVSNKGFQVML~~NSLGR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLIVVDDVEELEQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGEPHS~FGGGS
AF516616    EILRNGFHKMV~~ERVGK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKILLVLDNVENPSQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGRQPP~FGGGA
AF516615    ~~~GLDHVSESMSRSIKGVK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLLVLDDVWSEDRKKWDQLKV~~~~~~~~~~~~~~~~~~SLMQNG~~~AEGS
AF516614    CRDRLGRGKISTLKSTCH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~I**CRRCEAATRIS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~WKLPLFWSGE
AF516613    KISSVAEGTKEIEKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~MKVLIVVDDIDDADQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIEHHSFGPGS
AF516612    DILNKGFHEML~~KRLCQM~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLVVVDDVDQLAQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLEKQRF~LGGGS
AF516611    KVRSVAAGTVLVGERFRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LKVLVIFDDVDDVKQLR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAGNCHSFGLGR
AF516610    EISSVAGGINLIKQQVVS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLLIMDNIDDVEQLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNQDWFGPES
AF516609    DISSKGFQVML~~TSLGQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLIVVDDVDESEQIEA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGEKHS~FGGGS
DQ923745    WDEECGIVFIK~~KCLRN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDV~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~W~~~~~
DQ923739    NESSVVEGTKEIEKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~MKVLVVVDDIDDADQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIKHESFGPGS
DQ923737    KISNVDEGIGLIKQEFQH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RTVLVIMDNIDEKEHLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAQNH~WFGPRS
```

```
DQ923732   GMNSVEPLSLRLASIIKR~~~F~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FSFLVMWMNQDNLKYWLER~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~GIGLVR
DQ923744   QISSVDGGISQIKQQFRH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLVIMDNIDEVEQLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNRDWFGLGS
DQ923743   ETSTIARHHPGQSKPFSSVA~F~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~SKSFCNLDPMCLNSA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923742   ~GPSIGSTFVR~~DRLSH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~TKVLIVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923741   ETSTIGSTLVR~~KRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~TKVLIVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923740   STPTIGSTSVR~~ERLSH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~TKALIVLDDVNASRQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLLGDHVRFGPGS
DQ923738   HNTHTGSSIIR~~HRLRT~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLIILDDVDRLEQLK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALCDHS~WFGPGS
DQ923736   VVSIRGLRR*KEDLAA*G~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YLS*LMK*IV*NNYMSW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~L*IVTRLVQ
DQ923735   HNVHMGISKIR~~QRLCN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RMVLIILDDVDQLEQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALCDHS~WFGSGS
DQ923734   KQKQQSDKAEHICRLLSKKK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FVLLFDDIWEPIEITKLGVPI~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~PN~~~~~~PHNKS
DQ923733   DISSVAEGISRIKDQFSH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLVIMDNIDGVDQLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNHNWFGHGS
DQ923731   LTQQWGINYTK~~RCLWN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDVDHINQLQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VLAGKEDWFGMGS
AY378697   WDEECGIVFIK~~KCLRN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDV~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~W~~~~
AY378696   NESSVVEGTKEIEKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~MKVLVVVDDIDDADQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIKHESFGPGS
AY378695   KISNVDEGIGLIKQEFQH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RTVLVIMDNIDEKEHLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAQNH~WFGPRS
AY369235   RIVDLGKILERLNQLFSG~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KRYLIVLMMS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369234   HDKNSNELKAIIKKFLQKRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YLIVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369233   DTMDEESLISTSREYLQQKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YIVVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

                                                   Kináz-2
                                              -------------------                          -------

AY369232   DKSDMRLLQVDLREHVMGKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLFVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369231   DVSDMNSLEIRLREQVRGKT~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLFVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369230   DNLEMNSLEVQLRQQLIGKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLLVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369229   DNLGMNSLEVQLSEQLMGKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLLVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369228   QVEEFSKMQHDLSEQLRGKK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLIVLDDIWNKGDRDLNDLWL~~~~~~~~~~~~~~~~~RLKSPFGVGAGGS
AY369227   ~~~GLDHVLESMSRSIKGVK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLLVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369226   ~~~ELDHVLQCVSKSIEGKR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~FLLVLDNVWTPDCKKWEKLRA~~~~~~~~~~~~~~~~~~PLIQHG~~~AH~~
AY369225   KVSSVAEGTKEIEKRLGS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~MKVLIVVDDIDDADQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ELAIEHKSFGSGS
AY369224   GVSCIDEGTKEIEQRLGN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~GRVLVVIDDLDSVEQID~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKPDSFGPGS
AY369223   KVSRVDEGTEDIKRRLGK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LRVLVIVDGVDSVKQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKRDSFGPGS
AY369222   MVSSVDQGILEIVLRLHD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLAIVDDIDCMEQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ALAIKRDSFGAGS
AY369221   LINSVGEGISVIKRLLRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLIVIDNVDKVEQLS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGDREWFGPGS
AY369220   QINSVDAGIGVIKQHLRR~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RIVLLVIDDVETVGQLN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIVGNRDWFSSGS
AY369219   KISSVDEGIGLIEDQFRH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLVIMDNIDEVGQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIAGNHDWFGPGS
AY369218   ~~EDMGTRANLLRARIKDGK~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~TLVILDDVLERTDFEAVGLVG~~~~~~~~~~~~~~~~~~V~~~~~~~~~PNC
AY369217   AMMLKASVR*KINFHIEG~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~YLSLWTT*IKRNNWMQ*~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LEIMIGLVQ
AY369216   EISCVDEGIVMIKQQFRH~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KRVLVIMDNIDEVEQLD~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~AIVGNHDWFGPGS
AY369215   GTLDRGYRMIL~~KRLQM~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLIVLDDVDDLFQIET~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~LLGKQHS~FGGGS
AY369214   WNADSGITRIS~~RCLRN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLILDDVDQSDQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KLVKQKEWFGSGS
AY369213   WDEEWGSILIK~~KCLSN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDVDDLKQLE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VLAGNQSWFGMGS
AY369212   WDEERGIIFTK~~KCLRN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDVDHKNQLQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VRAGKEDWFGRGS
AY369211   LTQQWGINYTK~~RCLWN~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~KKVLLVLDDVDHINQLQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~VLVGKEDWFGMGS
AY369210   QTVSEGIIKIE~~SAISS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RKVLLVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369209   HGVSEGLIKIE~~SAISS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~RRVLLVLDDVW~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

            RNBS-B                          RNBS-C                                  GLPL
         --------------                 ---------------------                     ---------
             210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
FJ477238   RIIITTRDEHLLKML~~GVDTIYELPVMNREEALMLLSWHAFRKNYP~EKE~~~~~~~~~~~~YFELTRETADYCGGLPLALEVVGSYLSGKSISAWKGA
FJ477237   RIIITTRDEQXXHQV~~GVDKIHRLHEMNEEEAMELFSWHAFRNSRPNEG~~~~~~~~~~~~~YLKLSRKIVSYCRGLPLALEVLGSFLIKRTIAEWESQ
FJ477236   RVVVTTRDERLLVEHG~~IEMVYEVKPLTQDEALFLFSRKAFKDDELEED~~~~~~~~~~~~~FLELSKCFINYASGLPLALKTLESFLYKRGRDEWKSA
FJ477235   RIIITTRNEHLLKQV~~EVDKTYPLREMKKREALELFSWHAFRKSYPNEE~~~~~~~~~~~~~YLEVSEKVVSYCGGLPLALEVLGSFLFKRPIAEWKSQ
FJ477234   RIIITTQDERLLKQVNMKVDKTYPLKEMNDEEALKLFSWHPFGNSWPNEG~~~~~~~~~~~~~YLELSKEVVSYCGGLPLALEVLGGSMIERTPTEWKNQ
FJ477233   FESFRFTSVR*KYR*VASYIKWYDQKPRNS*RFQDKL*CIG*NGEGSFSRH~~~~~~~~~~~~~CVLL*RGRK*LCDRNIRRL*AKPQV*H*RTHTEGPRK
FJ477232   RIIVTTRDEQLLKFI~~RVDKTCLAQTMNEEEALQLLSWRAFRKSYPNDEE~~~~~~~~~~~~~FLELARKVVDYCGGLPLALEVLGSYLSSKGKREWRSA
FJ477231   RIIMTTRNKHLLKQV~~EVDKTYPLREMNKEEALELFSWHAFKKSCPDEE~~~~~~~~~~~~~YLEVSKNVVSYCGGLPLALEVLGSLLFKRPIKEWKSQ
FJ477230   RIVITTRDERLLVKHD~~IEMVYEVKPLTQDEALFLFCRNAFKDDELEED~~~~~~~~~~~~~FLELSRCFISYASGLPLALETLGSFLYKRGRDEWKSA
AF516631   EYW*PQESMRLLI**EQQVTLLIWKS*VNNIVFQSLITCIFL**SR*VQDV~~~~~~~~~~~~~*RYW*QKL*RNVRVCLSLSRT~~~~~~~~~~~~~~~
AF516650   RIIITTRDEQVLNIH~~KVDKRYKAQEMTNEEAFELLSWHAFRNPCP~DKE~~~~~~~~~~~~~YIELARDVVDYRGGLPFALQND~~~~~~~~~~~~~~~
AF516649   GAESSSQLETNVC*KNLQLIRYIGRK*WTEKKLLSS*VGM~LSEVVVVLVN~~~~~~~~~~~~~ILRLKEKLSITVEDCHSHLRN~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516648   RIIITTRDQDLLKIL~~NLEAICPVQEMNNEEALELLSWHAFKKNYP~SKE~~~~~~~~~~~~~YVELSRKAVGYCGGLPFAFKV~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516647   RIIITTRDV~~LLLSG~~ADAVYRPNIFSDSGALELFRRYAFRTNQPTRD~~~~~~~~~~~~~YDDVSSRVIQYAQGLPLA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516646   KILVSSRNQDIFN~DIETKRNFPISVLPEQDAWTLFKDMAGRSIESPE~~~~~~~~~~~~~~~LRPVAQQVLRECAGLPLALKN~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516645   RIIITTRNERVLKEF~~GVDKIYQAEGMGREEALELLSWHAFRSSCC~PSQ~~~~~~~~~~~~~YLVLASEVVNYCGGLPLALKV~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516644   RIIITTRDV~~QLLSG~~ADAIYSPKLFRYAGALELFRQYAFRTNQPTRD~~~~~~~~~~~~~YDYLLWHVLQYAQGLPFALKD~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516643   EV*LS*QQEMSIY*IQ*E*I*DIQLRK*MKRKLLSFSVGIHLQIIA~LKKN~~~~~~~~~~~~~ILNCQRM*FLTVEDFHLHSRC~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516642   RVVVTTRDERLLVEHG~~IEMVYEVKPLTQDEALSLFSWKAFKDDELEED~~~~~~~~~~~~~FLELSKCFISYASSLSHSSHT~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516641   RIIITTRDERLLKQVNMKVDKTYPLKEMNEEEALKLFSWHAFGKSWPNEG~~~~~~~~~~~~~YLELSKEVVSYCG~~~~~~~~~~~SFTDTTHS~~~~~
AF516640   RIIITTRDS~~QLLSL~~ADAIYKPKILSEPRALELFRRYAFKKNQPTRD~~~~~~~~~~~~~YYILSSRAVKYAQGLPLALK~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516639   RIIITSRDS~~QLLSI~~ADVIYNPKTLSDSGALKLFRQHAFRNDQPTRD~~~~~~~~~~~~~YDDLSNRVVEYAQGLPLAF~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516638   RIIITTRDW~~QLLSI~~ADVIYSPKVFNDAGALELFRRYASEQSNPPK~~~~~~~~~~~~~IMIIFRGVSYNMLRVSHSLLKF~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516637   RIIITTRNESVLREF~~AVDKVYRAKVMDQEEALELLSWHAFRSSNC~PSQ~~~~~~~~~~~~~YLALEREVVNYCGGFPFALKKLWKDY~~~~~~~~~~~
AF516636   RIIITTRDV~~QLLSG~~ANAIYSPKVFNDAGALELFRRYAFRTKQSTKD~~~~~~~~~~~~~YDNLSRRVIQYAQGLPLALKK~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516635   RIIITTRNEHMLQEF~~AVDEIYPVEGMEQEEAFELLSWHAFGSKRC~PTE~~~~~~~~~~~~~YLELAGKVVDYCRGFPLALKM~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516634   EVELL*RHEMNVYY*MWTKY~~IRFKK*MKMKLWSSLVGLPLEIDG~LTKN~~~~~~~~~~~~~ILNSQKMLFLIVEVFHSL*RI~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516633   RIIITTRDERLLLN~~~~VDKVYPLQKMNEDEALELFSWHAFQKSCPNEE~~~~~~~~~~~~~YLEVSEKFVSYSGGFPLALKK~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516632   RIIITTRNEHVLNEF~~ADVIYRSQGMEREEALELFSWHAFRSSCC~PRK~~~~~~~~~~~~~YLNLAREVVDYCGGLPLALKD~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516630   KIIVTTTYAGLLNAHQ~~EVLSHDAETLNDDESLELFSLHAFGQDIPTER~~~~~~~~~~~~~YMDHSRRVVQHCGGLPLA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516629   RIIITTRDKHLLKML~~GVDTIYELPTMNREEALQLLSWHAFRKNYP~EEE~~~~~~~~~~~~~YFELTRKIADYCGGLPLAFKV~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516628   RIIITTRDK~~LVLSG~~ADAIYSPKVLSGDGALELFSQYAFRTKQPKRD~~~~~~~~~~~~~YDHLSSRAVRYAQGLPLALKIL~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516627   RIIITTRDKHLLEIL~~KADRICHLPAMNKEEALELLSRRAFNMNYP~MEG~~~~~~~~~~~~~YFELAREVVDYCGGLPLALKDL~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516626   IIIITTRDEHLLNPV~~RVNMRYAAEKMNKEEALELFSWHTFENNCPKEE~~~~~~~~~~~~~YLELSKKVVSYCGGLPLALKV~~~~~~~~~~~~~~~~
```

```
AF516625   *NYYNNTRCAITKQS*~CNILAQVFR*QGSS*PLYAICLQNKQTHKRPQTS~~~~~~~~~~~~HMPCHRICSRFAT~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516624   KLVFTTRSEEVCS~RMGAHKKIKVECLAWDRAWTLFQEKVGEETLYIHPD~~~~~~~~~~~~~IPTLAEMVAKECDGLPFAFKD~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516623   RIIITTRDK~~LVLSR~~ADAIYSPKVLSGDGALELFSQYAFRTKQPKRD~~~~~~~~~~~~~YDHLSRRAVRYAQGLPLALKK~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516622   RIIITSRNEHLLKIL~~DVDKICPLPAMNEKEALELLSWHAFRKNYP~NEE~~~~~~~~~~~~YVELSRKAVGCCGGFPLALKI~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516621   KIIITTGYAGLLNTDH~~QVKFHCVETWNYVESMKLFSLHAFGQGHPLKR~~~~~~~~~~~~~YMDHSRRLVQHCEGLPFALKN~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516620   RIIITTRDEHLLKML~~GVDTIYELPVMNREEALMLLSWHAFRKNYP~EKE~~~~~~~~~~~~~YFELTRETADYCGGLPFALKI~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516619   RIIITTRDV~~QLLSG~~ADAIYSPKLFSGARALKLFRRYAFRTNQPTKD~~~~~~~~~~~~~YDDLSWCAVKYAKGLPLALKVL~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516618   *DYYNK*RFAVTKHS*~CDI*SQDFE*FWSSETL*AARLQK*PTH*RL**S~~~~~~~~~~~~LESCCRICSRSATRLQ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516617   RIIITTRDS~~QLLSI~~ADGIYNPKILSDYGALELFRRYAFRKNQPNRD~~~~~~~~~~~~~YDDLSSRAVNYAQGLPFALKE~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516616   PI~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516615   RILVTTRKQNVASMMEATSHMINLAELSEQNCLSIFNHMAFSNREICEFEV~~~~~~~~~~~~~FGEISREIVRKCKGLHSLLKY~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516614   KNYHHNKKRTYATRICS**DISGGRNGTRRSS*APKLACFRK*ALS**ISR~~~~~~~~~~~~~ARKKSC*LLWRSASRT*RY~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516613   RIILITRDEQVLNIQ~~KVDKKYKAQTMTDEEALKLLSWHAFGNHCP~DEE~~~~~~~~~~~~~YIELATDVVDYCGGLPFALKV~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516612   RIIITTRNV~~QLLRV~~ADVVYRPKVLSDYEALELFGVYAFGTNQPNIE~~~~~~~~~~~~~YDHLSRCFIQYAHGLPLALKI~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516611   RIIITTRNEHMLQEF~~AVDEIYPVEGMEQEEALELLSWHAFGSKRC~PSE~~~~~~~~~~~~~YLELARKVVDYCGGLPLPLALKV~~~~~~~~~~~~~~
AF516610   RIIITTRDEQLLHQV~~GVDKIYQLHEMNEEEALELFSRHAFSNSRPNEG~~~~~~~~~~~~~YLELSRKIVSYCGGLPLALKI~~~~~~~~~~~~~~~~
AF516609   RIIITSRDS~~QLLSI~~ADVIYNPRTLSYYGALKLFWQHAFKNDQPTRD~~~~~~~~~~~~~YYDLSNRVVEYAQGLPLALKEL~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923745   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

            RNBS-B                          RNBS-C                                  GLPL
          --------------                  -------------------                     ---------

DQ923739   KIIITTRDQQVLNIH~~KVNKRYKA*ND**RSS*AP*LACLWKSLSQ~*RI~~~~~~~~~~~~Y*THKR~~~~~CC*LLWRLATS~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923737   RIIITTRDEHQLRN~~~~VDKAYPAQKLNKGEALELFSWHAFRKSCPNEE~~~~~~~~~~~~~YLEP*KKVVSYCGGVPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923732   GVESSLQLETQVCQSIMTYRYHIELKD*IMMRLLSYLARTPFRRISLTKVF~~~~~~~~~~~~WNRPSVL*IMPKASPSPS~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923744   RIIITTRDEHLLHQV~~GVDKIYRLREMKEDEALELFSWHAFRNSRPNEG~~~~~~~~~~~~~YLELSRKIVSYCGGVPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923743   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923742   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923741   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923740   QIIITTRDKRLLKRS~~~VDKIYEVKGLSWEESLELFHLHAFKNNSTESC~~~~~~~~~~~~~CAELLGTVVDYAGGVPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923738   RIIITSRDKGVLLKGG~~VDEINQVKALTNNEALQLFNWKAFRSDQVGKD~~~~~~~~~~~~~FFQLSKKFVKNAYGLPFTL~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923736   GVELL**QETNTCSRYLKWIRHVPHK**IKKKLLSSFVAMPLRRVIPLMKN~~~~~~~~~~~~~ILNCRAKLSITAEDCH*HH~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923735   RIIITSRDEHLLRTFG~~VDIMYKVKALTDAEALQLFCRKAFKKGQVSED~~~~~~~~~~~~~FLKLANNVVEYANGLPLAL~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923734   KIIFTTRSEDVCG~QMDAHKKTKVECLAWDKAWNLFQEKVGRETLGIHPD~~~~~~~~~~~~~IQRLAQTVAKECGGFPLAF~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923733   RIIITTRDEHLLKQG~~KVNKTYLAQELNKEEALELLSWHAFENRRPKEEG~~~~~~~~~~~~~YLELSKKVVSYCGGLPLTL~~~~~~~~~~~~~~~~~~
DQ923731   RIIFTTRNERLLVEHG~~ITLCHNVEVLNDDEALALFSLHAFKKNMPEDG~~~~~~~~~~~~~FLELSECFIKYAGGLPFAF~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY378697   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY378696   KIIITTRDQQVLNIH~~KVNKRYKA*ND**RSS*AP*LACLWKSLSQ~*RI~~~~~~~~~~~~Y*THKR~~~~~CC*LLWRLATS~~~~~~~~~~~~~~~
AY378695   RIIITTRDEHQLRN~~~~VDKAYPAQKLNKGEALELFSWHAFRKSCPNEE~~~~~~~~~~~~~YLEP*KKVVSYCGGVPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369235   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369234   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369233   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369232   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369231   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369230   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369229   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369228   KIIVTTRDLNVAKIMGATGFHN~LECMANDDCLEIFERHAFGEVNSGKPVN~~~~~~~~~~~~~YELIRTKIVEKCCGFPFTL~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369227   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369226   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369225   RIIITTRDEQVLNIK~~KVDKRYKAQEMTNEEAFELFSWHAFENPSP~NEE~~~~~~~~~~~~~YIELARDIVDYCGGVPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369224   RIIVTSRNKHLLKIL~~NVDKICPLPSMSEREALELLSLHAFRKNYP~HEE~~~~~~~~~~~~~YVELSRKAVGYCGGLPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369223   RIIITTRDKHLLEIL~~KADRICHLPAMNEKEALELLSRRAN~~SY~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369222   RIIITTRDEHLLKML~~GVDTIYELPVMNREEALMLLSWHAFRKNYP~EKE~~~~~~~~~~~~~YFELTRETADYCGGVPVA~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369221   IIIITTRDQHLLNQV~~RVNMRYPAKEMNEEEALELFSWYTFENNCPKEE~~~~~~~~~~~~~YLELSKKVVSYCGGVPL~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369220   IIIITTRDEHLLNQW~~KVNMRYPTWVMNEEEALELFSWHAFGNSLPNEE~~~~~~~~~~~~~YHELSKKVVSYCGGVPLAI~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369219   RIIITTRDEHLLKQ~~~~VDKTYPAQKLNEREALGLFSWHALGNNWPNEE~~~~~~~~~~~~~YLELSKEVVSYCGGVPVA~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369218   KLLLTSREIKVIRSDMRTQKEFQLGFLTEQESWNLFEKMAG~DVKDNR~~~~~~~~~~~~~~~ILKEATQLAKKCGGVPL~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369217   EVELS*RHEISIYY*MWTKY~~IRLRN*RIENL*SSLAGMPLEIVG~LIKN~~~~~~~~~~~~ILN~~~~~~~~IE~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369216   RIILTTRDEHLLKRG~~KVHNIYPAQKFNEGEALELFSWHAFGNGCPNKG~~~~~~~~~~~~~YHELSKKVFLLWR~FATS~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369215   RIIITTRDK~~LVLSR~~ADAIYSPKVLSGDGALELFSQYAFRTKQPKRD~~~~~~~~~~~~~YDHLLKTCCTICSRPPLRL~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369214   RIVITTRDEHLLVKHD~~IEMVYEVKPLTQDEALFLFCRNAFKDDELEED~~~~~~~~~~~~~FLELSKCFISYASGLPLAL~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369213   RIVITTRNEGLLVQHG~~IATSYKMRGLNDCEALELFSLNAFRKEQPKKD~~~~~~~~~~~~~FLELSKHFLKYARGLPLTL~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369212   RIIITTRNERLLVEHD~~ITLCHNVQVLDKGAALALFSLHAFKKNLPEDG~~~~~~~~~~~~~FWALSSYFINYAGGLPLAF~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369211   RIIITTRNERLLVEHD~~ITLCHNVQVLDKGAALALFSLHAFKKNLPEDG~~~~~~~~~~~~~FWALSSYFINYAGGLPFAF~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369210   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
AY369209   ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
```